------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 20، العدد 1، ص 61-80، 2009 ------

دراسة كيموحيوية لأنزيم الريدينيز المعزول من الدم ودوره في إزالة سمية السيانيد

زينب حازم محمد **ذكرى علي علوش**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2008/6/30 ؛ تاريخ القبول 2008/10/27)

الملخص

تضمن البحث عزل انزيم الريدينيز من بلازما الدم إذ أظهرت الطريقة المحورة لعزل أنزيم الريدينيز من بلازما الدم على شكل بلورات نقية عدد مرات تنقية عالية مقارنة بتقنية الترشيح الهلامي المستخدمة لعزل أنزيم الريدينيز من محلول راسب كبريتات الامونيوم لبلازما الدم. وجد ان الحزمة البروتينية (A) المعزولة بتقنية الترشيح الهلامي والحزمة البروتينية (C) المعزولة من محلول راسب كبريتات الامونيوم باستخدام عمود الفصل الحاوي على (Sephadex G - 75) لهما وزن جزيئي (1000 ± 37153 دالتون) و (1000 ± 36307 دالتون) على التوالي.

كما درست الظروف المثلى لفعالية انزيم الريدينيز المعزول من بلازما الدم الحزمة البروتينية (A) و(C) فوجد ان لهما زمن تفاعل امثل عند الدقيقة (30) و(35) وأس هيدروجيني امثل عند (pH=8) ودرجة حرارة مثلى (45C°) و(50C°) وكان التركيز الأمثل لمادة الأساس ثايوسلفات الصوديوم (130mM) و(125mM) ولمادة سيانيد البوتاسيوم (130mM) و(135mM). وأظهرت النتائج أن البنزالديهايد يعمل على تثبيط أنزيم الريدينيز ويمكن إزالة التثبيط جزئياً باستخدام (0.1M) ثايوسلفات الصوديوم، كما وجد انخفاض في فعالية أنزيم الريدينيز عند استبدال مادة الأساس ثايوسلفات الصوديوم بأحد الأحماض الامينية (سستين، مثيونين، سستاين). كذلك أظهرت النتائج تأثير بيتا– ميركابتو ايثانول على الخواص الجزيئية لأنزيم الريدينيز من خلال اختزاله أصرة كبريت – كبريت الموجودة في كلاً من الحزمة البروتينية (A) و(C).

كما درست فعالية أنزيم الريدينيز المعزول من بلازما الدم (الحزمة A) في إزالة سمية السيانيد داخل الجسم (باستخدام حيوانات التجارب) وخارج الجسم (باستخدام الدم) إضافة الى تأثير السيانيد على عدد من المتغيرات السريرية (الكلوكوز، الهيموكلوبين، الثايوسيانيت) إذ بينت النتائج أن سيانيد البوتاسيوم يؤدي الى زيادة تركيز الكلوكوز والهيموكلوبين والثايوسيانيت داخل وخارج الجسم مقارنة بمجموعة

السيطرة، بينما لوحظ أن أنزيم الريدينيز المعزول ومادة الاساس ثايوسلفات الصوديوم يعملان معاً أو على انفراد في إزالة سمية السيانيد داخل وخارج الجسم وقد ظهر ذلك من خلال انخفاض تركيـز الكلوكـوز والهيموكلوبين وزيادة تركيز الثايوسيانيت مقارنة بمجموعة السيطرة.

Biochemical Study of Rhodanese Enzyme Isolated from Blood and it's Role in Cyanide Detoxification

Zainab H. Mohammad **Thikra A. Allwsh**

Department of Chemistry
College of Sciences
Mosul University

ABSTRACT

This research included isolation of rhodanese enzyme from blood plasma. The modification method for isolation rhodanese from plasma in form of pure crystals showed highly purification folds compared with the gel filtaration technique which used to isolate rhodanese from ammonium sulphate precipitate solution of blood plasma. It had been found that the protein peak (A) isolated from plasma and protein peak (C) isolated from ammonium sulphate precipitate solution of plasma with (65%) saturation by gel filtaration technique using (Sephadex G-75) had apparent molecular weight (37153 ± 1000 Dalton) and (36307± 1000 Dalton) respectively.

The study of optimal condition of rhodanese activity for the isolated protein peaks (A) and (C) showed optimum reaction time at (30), (35) minutes, optimal pH at (8), optimal temperature (45C°),(50C°) and optimal concentration (125mM) (130mM) of sodium thiosulphate and potassium cyanide(130mM), (135mM).

The results showed that benzaldehyde inhibit rhodanese activity and this inhibition can be removed partially by using (0.1M) sodium thiosulphate. It had been found a decrease of rhodanese activity when sodium thiosulphate replaced with amino acids (cysteine, methionine, cystine). The results showed that β - mercapto ethanol break down both of protein peak (A) and (C) to a symmetrical peaks with different molecular weights.

The study of rhodanese activity which isolated from plasma (peak A) in cyanide detoxification in vivo (using experimental animals) and in vitro (using blood) in addition to the effect of cyanide on some clinical parameters levels like glucose, hemoglobin, and thiocyanate. The results showed that potassium cyanide leading to increase in glucose, hemoglobin and thiocyanate concentrations in vivo and in vitro compared with control group, while sodium thiosulphate and rhodanese or both are act in cyanide detoxification in vivo and in vitro and this was concluded through decrease of glucose and hemoglobin concentration and an increase of thiocyanate concentration compared with control group.

المقدمة

اكتشف أنزيم الريدينيز من قبل Lang في عام (1933)، وبلور لأول مرة من كبد الثور من قبل Sorbo في عام (1953) وفي الكلية من قبل كل من Green and Westley في عام (1959) (Bowen *et al.*, 1965). يعد أنزيم الريدينيز (Cyanide: Thiosulphate sulfur transferase; E.C: 2.8.1.1) من الأنزيمات الناقلة، إذ يحفز انتقال ذرة الكبريت من المادة الواهبة للكبريت (ثايوسلفات) الى مستقبل نيكلوفيلي قوي (سيانيد) مؤديا الى تكوين الثايوسيانيت وايون الكبريتيت.

$$CN^- + S_2O_3^{-2} \xrightarrow{\textbf{Rhodanese}} SCN^- + SO_3^{-2}$$

(Buzaleh *et al.*, 1990; Agboola and Okonji, 2004)

تتكون جزيئة أنزيم الريدينيز المنقى من الكبد البقري من سلسلة منفردة متعددة الببتيد مكونة من (293) حامض أميني، في حين أن أنزيم الريدينيز المنقى من كبد الدجاج يتكون من (289) حامض أميني وان (212) من هذه الأحماض الامينية تتطابق مع تلك التي تم الحصول عليها من الكبد البقري باستخدام تحليل إدمان (Kohanski and Heinrikson, 1990). إن التركيب الببتيدي لأنزيم الريدينيز المنقى من الكبد البقري يحتوي على أربع جزيئات من الحامض الأميني سستين: إذ تقع الأولى في النصف الأول للجزيئة عند الموقع (63) أما الثلاثة المتبقية من السستين فتقع في نهاية السلسلة عند النهاية الكاربوكسيلية في الموقع (247، 254، 263)، ان الموقع الفعال لأنزيم الريدينيز يمثل مجموعة الثايول (–SH) المهمة في تحفيز الأنزيم (Baillie and Horowitz, 1976).

ان أنزيم الريدينيز يعمل على مركبات تدعى Sulfane sulfur وهي مركبات تحتوي على ذرة كبريت فعالة جداً غير مستقرة في حالة تكافؤ (صفر او سالب واحد) ترتبط تساهمياً بذرة كبريت اخرى وبهذه الصفات فانها تنتقل الى مستقبلات مثل (CN^-) Cyanide، (SO_3^{-2})Sulfates (Iciek and Wlodek, 2001).

يعد أنزيم الريدينيز من الأنزيمات المسؤولة عن إزالة سمية السيانيد من خلال مسار الإزالة الطبيعية إذ يتفاعل السيانيد مع الآصرة ثنائية الكبريت الموجودة في الثايوسلفات كمصدر للـ Sulfane sulfur لتكوين الثايوسيانيت الأقل سمية الذي يطرح بالإدرار (Westley *et al.*, 1983) وأشار (Smith and Urbanska, 1986) الى انه في النباتات هنالك علاقة بين فعالية أنزيم الريدينيز ومركبات سيانوجينيك كلايكوسيد والتي تقترح بان الأنزيم يزود هذا النوع من النبات بميكانيكية كفؤة لإزالة سمية السيانيد.

ونظراً لعدم وجود سابقة حول انزيم الريدينيز في دم الانسان فقد هدف البحث الحالي الى عزل الانزيم من الدم ودراسة خواصه الجزيئية، فضلاً عن اختبار فعاليته في إزالة سمية السيانيد.

المواد وطرائق العمل

عزل أنزيم الريدينيز من بلازما الدم:

تحضير العينة:

تم الحصول على بلازما الدم من متبرع ذكر سليم بعمر 26 سنة وبمساعدة مركز نقل الدم، وقدر تركيز البروتين فيه بطريقة لأوري كما قدرت فعالية الأنزيم فيه وحفظ في المجمدة لاستخدامه في عمليات التنقية اللاحقة، وقد استخدمت طريقتين لعزل انزيم الريدينيز من بلازما الدم:

1. تحضير بلورات أنزيم الريدينيز: الطريقة الاولى:

اعتمدت الطريقة على ترسيب الأنزيم بكبريتات الامونيوم بتراكيز ودوال حامضية مختلفة الى أن تم الحصول على بلورات نقية من الأنزيم وتم تحوير الطريقة التي ذكرت في المصدرين (Westley and Green, 1959 ; Horowitz and Detoma, 1970) من قبلنا للحصول على أفضل النتائج بعد الأخذ بالملاحظات التي ذكروها والتي تتضمن تنشيط الانزيم في بلازما الدم بثايوسلفات الصوديوم بتركيز (10 mM). ان التحوير الذي اجري من الدراسة الحالية تضمن ضبط الدالة الحامضية في كل خطوة وإجراء عملية الديازة بعد كل خطوة ترسيب بكبريتات الامونيوم لتجنب ترسيب كبريتات الامونيوم مع بلورات الأنزيم (Kado, 2007).

2. ترسيب البروتين وفصله بإستخدام كبريتات الامونيوم: الطريقة الثانية:

تم استخدام (25ml) من بلازما الدم وأضيف لها ثايوسلفات الصوديوم بتركيز (10 mM) لتنشيط الانزيم بعدها اضيف كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة وبتشبع (65%) (Agboola and Okonji, 2004) وبصورة تدريجية مع تحريك المزيج بالمحرك المغناطيسي عند درجة ($4C^o$) ولمدة (60min) ثم فصل الراسب عن الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي لمدة (20min) وبسرعة (4000Xg) بعد ذلك تم الحصول على الراسب وأذيب بأقل كمية ممكنة من المحلول المنظم، ذو الدالة الحامضية (pH = 7.9) والمكون من (10^{-3}M) Tris – HCl (10 mM), ($Na_2S_2O_3$) بعدها قدرت فعالية الأنزيم (Urbanska *et al.*, 2002) وكمية البروتين في المحلول ثم اجريت له عملية الفرز الغشائي.

الفرز الغشائي:

تمت عملية الفرز الغشائي اعتماداً على طريقة الباحث (Plummer, 1978) من خلال وضع المحلول البروتيني المستحصل من الترسيب بكبريتات الامونيوم بتشبع (65%) في كيس الفرز الغشائي ثم وضع الكيس في وعاء حجمي حاوٍ على لتر واحد من المحلول المنظم ذو الدالة الحامضية (pH =7.9) والمكون من (NH_4HCO_3(0.1M), $Na_2S_2O_3$(10mM), Tris–HCl (10^{-3}M) وبعد الانتهاء من عملية الفرز الغشائي التي استغرقت (24) ساعة تم حساب الحجم النهائي للمحلول الناتج وقدرت فعالية الأنزيم وكمية البروتين.

تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

استخدمت هذه التقنية لعزل انزيم الريدينيز وتقدير وزنه الجزيئي التقريبي (Andrews, 1965) إذ استخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (100×2cm) الذي يحتوي على مادة الهلام من نوع (Sephadex G-75) وتم وضع مادة الهلام على ارتفاع (95cm)، وتم إمرار المحلول المائي لبلورات أنزيم الريدينيز الناتجة من الطريقة الأولى وكذلك المحلول المائي لراسب كبريتات الامونيوم بتشبع (65%) الناتج من الطريقة الثانية (بعد أن اجري له فرز غشائي) على عمود الفصل بإستخدام (3ml) من النموذج وتبع ذلك (3ml) من الماء المقطر للغسل بعد ذلك تم استرداد المواد البروتينية باستخدام الماء المقطر كمحلول منظم لروغان الاجزاء البروتينية وبمعدل جريان (54ml/hour) وبمعدل (3min) لكل جزء باستخدام جامع الأجزاء الذي يعمل على نظام الدقائق. إذ تمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قراءة شدة الامتصاص عند الطول الموجي (280nm) باستخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية فضلاً عن ذلك تمت متابعة فعالية أنزيم الريدينيز في الأجزاء المفصولة (Urbanska *et al.*, 2002) بعد ذلك جمعت الأجزاء البروتينية التي تمثل الحزم الحاوية على أعلى فعالية لأنزيم الريدينيز.

تقنية التجفيد بواسطة التجميد:

تم تجفيد الحزمة البروتينية الناتجة من عملية الترشيح الهلامي باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) لغرض الحصول على هذه الحزمة بشكل مسحوق جاف.

دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية انزيم الريدينيز المنقى جزئيا من بلازما الدم:

تم دراسة تأثير العوامل التالية على فعالية الانزيم لتحديد الظروف المثلى لعمل الأنزيم وتتضمن: تركيز الأنزيم، زمن التفاعل، الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم (Tris - HCl)، درجة حرارة التفاعل، تركيز مادة الأساس وتأثير المثبطات والمنشطات.

تقدير كمية البروتين:

استخدمت طريقة لاوري (Lowry *et al.*, 1951) المحورة من قبل العالمين (Schacterle and Pollack, 1973) لتقدير البروتين.

تقدير فعالية أنزيم الريدينيز في بلازما الدم:

قدرت فعالية أنزيم الريدينيز حسب طريقة (Urbanska *et al.*, 2002).

$$CN^- + S_2O_3^{-2} \xrightarrow{\textbf{Rhodanese}} SCN^- + SO_3^{-2}$$

وتم قياس شدة الامتصاص عند طول موجي قدره nm (460) لمادة الثايوسيانيت الناتجة، وقدرت الفعالية: على إنها عدد وحدات الأنزيم الموجود في مللتر من بلازما الدم.

إذ أن الوحدة الأنزيمية (U): هي كمية الأنزيم التي تعمل على تكوين مايكرومول من المادة الناتجة الثايوسيانيت (Thiocyanate) في الدقيقة الواحدة.

أختبار فعالية أنزيم الريدينيز في إزالة سمية السيانيد :

1. خارج الجسم (In vitro):

تم سحب الدم من وريد متبرع سليم بعد تعقيم المنطقة بالهبتين Heptin باستخدام إبرة (محقنة) بحجم (10ml) ثم وضع في أنبوبة بلاستيكية (Plane tube) جديدة ونظيفة وجافة حاوية على المادة المانعة للتخثر (EDTA)، ثم قسم الدم الى خمس مجاميع كل مجموعة تحتوي على (2ml) من الدم.

المجاميع التجريبية:

1. مجموعة السيطرة:

أضيف (1ml) من الماء المقطر الى (2.5ml) من الدم وترك لمدة (15min) بعدها تم سحب (20µl) من الدم لقياس الهيموكلوبين ، ثم فصلت البلازما من جزء من الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة (3000 Xg) ولمدة (10 min). وقدر تركيز الكلوكوز في البلازما وكذلك قدر تركيز الثايوسيانيت أما الكمية المتبقية من الدم فتركت (15min) أيضاً وبعدها فصلت البلازما لتقدير المتغيرات السريرية المذكورة أنفاً .

2. المجموعة المعاملة الاولى:

أضيف (1ml) من سيانيد البوتاسيوم بتركيز 2mg/1ml الى (2ml) من الدم وترك لمدة (15min) بعدها تم إجراء القياسات نفسها المشار إليها في الفقرة أعلاه لمجموعة السيطرة.

3. المجموعة المعاملة الثانية:

أضيف (1ml) من سيانيد البوتاسيوم بتركيز 2mg/1ml الى (2ml) من الدم وترك لمدة (5min) ثم بعدها أضيف (1ml) من ثايوسلفات الصوديوم بتركيز 3mg/1ml وترك لمدة (10min) بعدها تم إجراء القياسات نفسها المشار إليها في الفقرة أعلاه لمجموعة السيطرة.

4. المجموعة المعاملة الثالثة:

أضيف (1ml) من سيانيد البوتاسيوم بتركيز 2mg/1ml الى (2ml) من الدم وترك لمدة (5min) ثم بعدها أضيف (1ml) من أنزيم الريدينيز بتركيز (8µg) وترك لمدة (10min) بعدها تم إجراء القياسات نفسها المشار إليها في الفقرة أعلاه لمجموعة السيطرة.

5. المجموعة المعاملة الرابعة:

أضيف (1ml) من سيانيد البوتاسيوم بتركيز 2mg/1ml الى (2ml) من الدم وترك لمدة (5min) ثم بعدها أضيف (1ml) من مزيج يتكون من أنزيم الريدينيز بتركيز (8µg) وثايوسلفات الصوديوم بتركيز 3mg/1ml ثم ترك لمدة (10min) بعدها تم إجراء نفس القياسات المشار إليها في الفقرة أعلاه لمجموعة السيطرة.

2. داخل الجسم (In vivo):

استخدمت في هذه الدراسة (12) من ذكور الفئران البيض Albino male mice بعدد (3) ذكور في كل مجموعة وبعمر (3-4) اشهر وبوزن (20 - 30) غم.

المجاميع التجريبية:

1. مجموعة السيطرة:

تضم مجموعة الفئران التي حقنت في التجويف البريتوني (Intraperitoneally) بـ (0.25ml) من المحلول الملحي (Normal Salin) ثم تركت لمدة (15min) بعدها تم سحب الدم.

2. المجموعة المعاملة الاولى:

تضم مجموعة الفئران التي حقنت في التجويف البريتوني (Intraperitoneally) بـ (0.25ml) من 1.5mg/kg سيانيد البوتاسيوم المذاب في المحلول الملحي ثم تركت لمدة (15min) بعدها تم سحب الدم.

3. المجموعة المعاملة الثانية:

تضم مجموعة الفئران التي حقنت في التجويف البريتوني (Intraperitoneally) بـ(0.25ml) من 1.5mg/kg سيانيد البوتاسيوم المذاب في المحلول الملحي ثم تركت لمدة (5min) بعدها تم حقنها ايضاً بـ (0.25ml) من (25%) ثايوسلفات الصوديوم المذاب ايضاً في المحلول الملحي، وتركت لمدة (10min) بعدها تم سحب الدم.

4. المجموعة المعاملة الثالثة:

تضم مجموعة الفئران التي حقنت في التجويف البريتوني (Intraperitoneally) بـ (0.25ml) من 1.5mg/kg سيانيد البوتاسيوم المذاب في المحلول الملحي ثم تركت لمدة (5min) بعدها تم حقنها ايضاً بـ (0.25ml) من (0.5µg) أنزيم الريدينيز وتركت لمدة (10min) بعدها تم سحب الدم.

الحصول على عينات الدم:

نهاية كل تجربة خدرت الحيوانات بالايثر لبضع ثواني ثم سحب الدم من جيب محجر العين وذلك باستخدام أنابيب شعرية خاصة (Capillary tubes) إذ جمع الدم في أنابيب جافة ونظيفة بعدها تم قياس الهيموكلوبين في الدم. وضعت الأنابيب في الحمام المائي بدرجة ($37C^{o}$) لمدة (10min) لفصل مصل

الدم باستعمال جهاز الطرد المركزي وبسرعة (4000Xg) ولمدة (10min) ثم سحب المصل بواسطة الماصة الدقيقة (Wilson *et al.*, 1972). تم تقدير تركيز الكلوكوز وكذلك تركيز الثايوسيانيت في عينات المصل.

تقدير المتغيرات السريرية:

1. تقدير الهيموكلوبين في الدم:

تم استخدام طريقة (Drabkin and Austin, 1935) في تقدير الهيموكلوبين في الدم.

2. تقدير الكلوكوز في مصل وبلازما الدم:

استخدمت الطريقة الانزيمية للباحثين (Burtis and Ashwood, 1999) لتقدير تركيز الكلوكوز في مصل وبلازما الدم باستخدام عدة التحليل الجاهز (Kit) من شركة (Biolabo France).

3. تقدير الثايوسيانيت في مصل وبلازما الدم:

استخدمت طريقة الباحثين (Rubab and Rahman, 2006) في تقدير الثايوسيانيت في مصل وبلازما الدم وذلك بتفاعل ايون الحديديك المضاف وبوجود وسط حامضي مع ايون الثايوسيانيت الموجود في مصل وبلازما الدم ليتكون معقد قهوائي – محمر من ثايوسيانيت الحديديك $Fe(SCN)_3$ الذي تقاس له الامتصاصية عند طول موجي قدره nm (455).

التحليل الاحصائي:

تم تحليل النتائج إحصائياً بأستخدام اختبار (Duncan-test) كذلك تم استخدام اختبار (t-test).

النتائج والمناقشة

عزل أنزيم الريدينيز من بلازما الدم:

تم عزل أنزيم الريدينيز من بلازما الدم باستخدام طريقتين إذ اظهرت الطريقة الأولى لتحضير بلورات الأنزيم عدد مرات تنقية عالية ويبين الجدول (1) خلاصة نتائج مراحل تنقية أنزيم الريدينيز من بلازما الدم.

الجدول 1: تنقية أنزيم الريدينيز من بلازما الدم

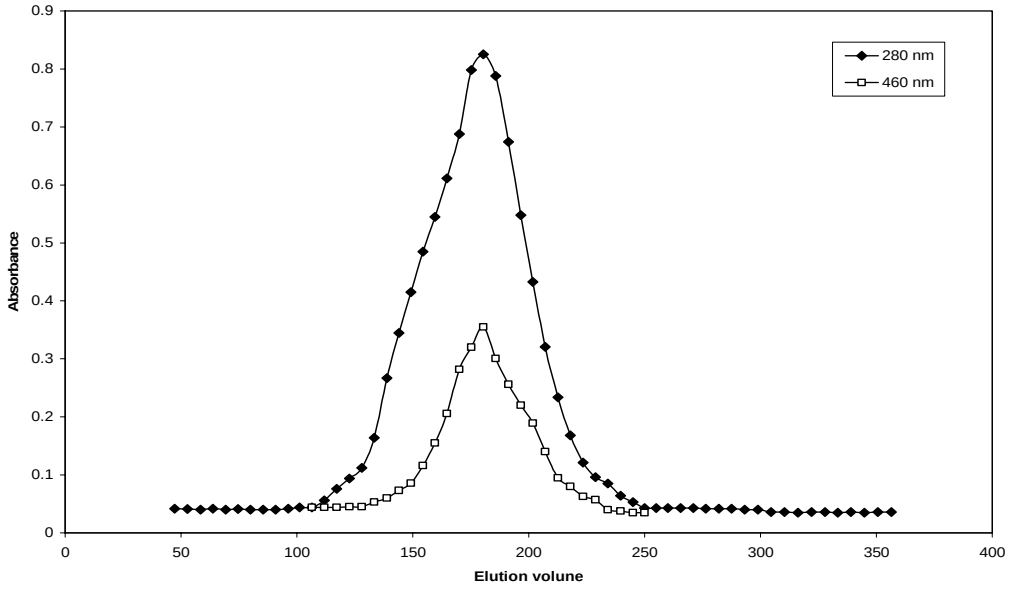
مراحل التنقية	البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية U	الفعالية النوعية U/mg	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
بلازما الدم	11217.3	246.78	0.021	100	1
التنشيط بثايوسلفات الصوديوم(10 mM)	11217.3	336.5	0.029	136.35	1.38
إضافة كبريتات الامونيوم بتركيز (0.4M)	148.02	22.17	0.14	6.58	4.82
رفع تركيز كبريتات الامونيوم الى (3.6M)	1.97	6.45	3.27	1.91	112.75
الفرز الغشائي	0.97	6.05	6.23	1.79	214.82
إضافة كبريتات الامونيوم بتركيز (1.8M)	0.57	4.96	8.70	1.47	300
إضافة كبريتات الامونيوم بتركيز (3.25M) بعدها تم الحصول على البلورات	0.35	4.73	13.51	1.40	465.86

بينت النتائج المذكورة في الجدول (1) أن عدد مـرات التنقيـة لأنـزيم الريـدينيز ازداد بمقـدار (465.86) مرة عن بلازما الدم ، وهذا يعزى الى الطريقة المحورة المستخدمة في التنقيـة. فقـد وجـد (Sorbo, 1953) أن عدد مرات تنقية أنزيم الريدينيز المعزول من الكبد البقري تـساوي (249.5) بينمـا وجد (Westley and Green, 1959) أن عدد مرات تنقية أنزيم الريدينيز المعزول من الكبـد البقـري تساوي (176) ومن الكلية (666.6).

إن بلورات أنزيم الريدينيز التي تم عزلها من بلازما الدم كانت على شكل مواشير مستطيلة وهـذا يتفق مع ماذكره (Horowitz and Detoma, 1970) وكما موضح في الشكل (1).

الشكل 1: بلورات أنزيم الريدينيز النقية

وعند إمرار المحلول المائي لهذه البلورات على عمود الفصل تبين ظهور حزمة بروتينيـة واحـدة وكما موضح في الشكل (2) وكان حجم روغان الحزمة البروتينية (A) مساوياً (180.4ml).



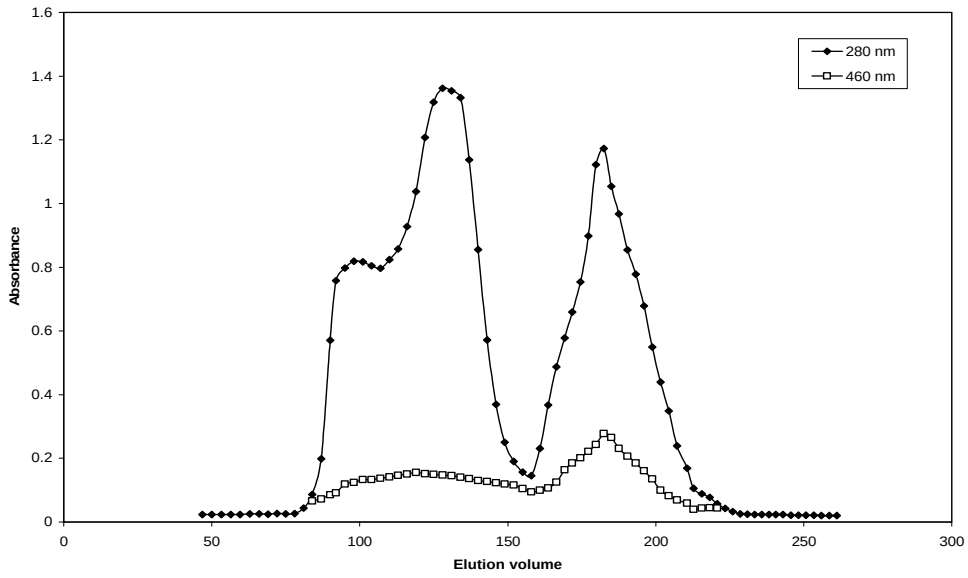
الشكل 2: المظهر الجانبي لأنزيم الريدينيز بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفـصل ذي الأبعـاد (100×2 cm) والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95 cm) حيـث أن (A) الحزمة البروتينية.

كذلك تم عزل أنزيم الريدينيز من بلازما الدم بالطريقة الثانية، إذ تم فصل المركبـات البروتينيـة لمحلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (65%) وأظهرت النتائج الموضحة فـي الـشكل (3) ظهـور حزمتين بروتينيتين وتم قياس فعالية أنزيم الريدينيز للحزمتين ووجد أن الحزمة البروتينية (C) لديها أعلى

فعالية نوعية فعدت الحزمة البروتينية الفعالة الرئيسية والممثلة لأنزيم الريدينيز وخلاصة نتـائج مراحـل تنقية أنزيم الريدينيز من محلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (65 %) مدرجة في الجدول (2).

الجدول 2: مراحل تنقية انزيم الريدينيز من محلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (65%)

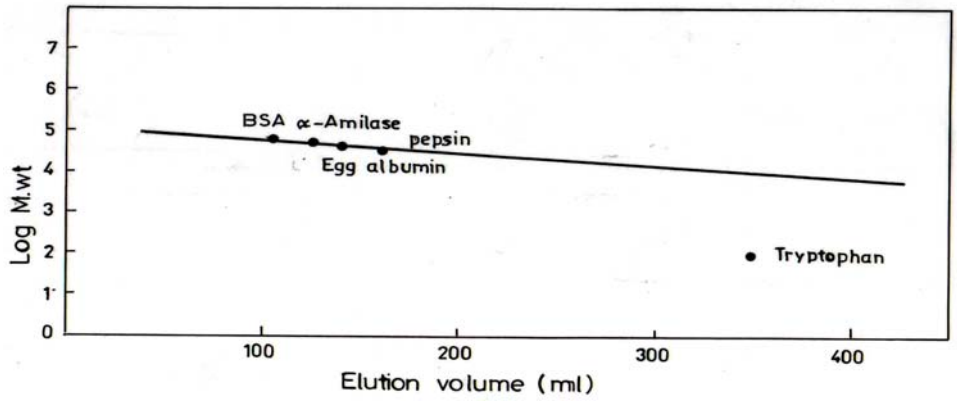
مراحل التنقية		البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية U	الفعالية النوعية U/mg	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
بلازما الدم		1420.6	69.99	0.049	100	1
التنشيط بثايوسلفات الصوديوم (10 mM)		1420.6	78.13	0.054	111.63	1.10
الترسيب بكبريتات الامونيوم بتشبع (65%)		223.5	54.65	0.244	69.94	4.51
الفرز الغشائي		27.98	54.0	1.929	69.11	35.72
الترشيح الهلامي	الحزمة الأولى (B)	34.99	114.82	3.28	146.96	60.74
	الحزمة الثانية (C)	3.72	27.7	7.44	35.45	137.77



الشكل 3: المظهر الجانبي لروغان محلول راسب كبريتات الامونيوم بتقنية الترشيح الهلامـي (الطريقـة الثانية) باستخدام عمود الفـصل ذي الأبعـاد (100×2 cm) والحـاوي علـى مـادة الهـلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95 cm)، حيث أن(B وC) الحزم البروتينية.

تقدير الوزن الجزيئي لانزيم الريدينيز بتقنية الترشيح الهلامي:

تم الاعتماد على طريقة الباحث (Andrews, 1965) باستخدام تقنية الترشيح الهلامي في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم الريدينيز(الحزمة A) و(الحزمة C) وقد استخدم لهذا الغرض عمود الفصل ذو الأبعاد (100×2 cm) الحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95 cm)، وتم إمرار عدد من المركبات المعلومة الوزن الجزيئي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (204 – 2000000 دالتون) لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (Internal Volume, Vi) لكل مادة وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات (Void Volume, Vo) والشكل (4) يبين حجم الروغان (Elution volume) لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي، إذ تبين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم الريدينيز المنقى من بلازما الدم (الحزمة A) و(الحزمة C).



الشكل 4: المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي

وتشير النتائج من المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي أن الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم الريدينيز (الحزمة A) (1000 ± 37153 دالتون) و(الحزمة C) (1000 ± 36307 دالتون) وهذا يتفق مع ما وجده (Kenneth and Robert, 1971) بأن الوزن الجزيئي لأنزيم الريدينيز المنقى من الكبد البقري (37000 دالتون).

دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية أنزيم الريدينيز:

تم دراسة العوامل المؤثرة على فعالية الانزيم وإيجاد الظروف المثلى التي يعمل بها الانزيم وتبين ان الظروف المثلى لفعالية انزيم الريدينيز (الحزمة A) و (الحزمة C) هي المدرجة في الجدول (3). وبإستخدام رسم لاينويفر_ برك وجد ان قيمة السرعة القصوى V_{max} للحزمتين (A) و(C) (3.33U/ml) و(3.84U/ml) لمادة ثايوسلفات الصوديوم و(5.55 U/ml) و(5.88 U/ml) لمادة سيانيد البوتاسيوم على

التوالي، أما قيمة ثابت ميكيلس – منتن K_m فكانت (178.5mM) و(250mM) لمادة ثايوسلفات الصوديوم و(285.7mM) و(312.5mM) لمادة سيانيد البوتاسيوم على التوالي.

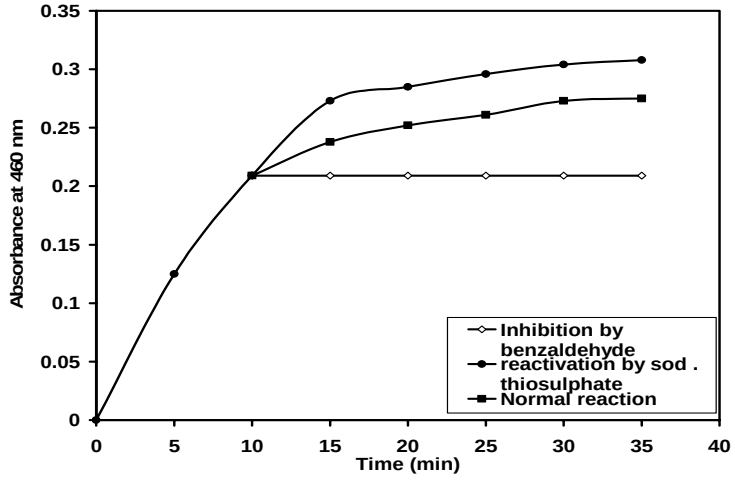
الجدول 3: الظروف المثلى لفعالية أنزيم الريدينيز المنقى من بلازما الدم ومحلول راسب كبريتات الامونيوم

أنزيم الريدينيز	تركيزالانزيم µg /ml	زمن التفاعل min	pH المحلول المنظم Tris-HCl (10^{-3} M)	درجة الحرارة C°	تركيز مادة الأساس mM		الامتصاصية at 460 nm
					$Na_2S_2O_3$	KCN	
(الحزمة A)	8	30	8	45	130	130	0.28
(الحزمة C)	8	35	8	50	125	135	0.21
بلازما الدم	–	30	–	30	125	125	0.31

تأثير المثبطات والمنشطات:

تأثير البنزالديهايد على فعالية انزيم الريدينيز:

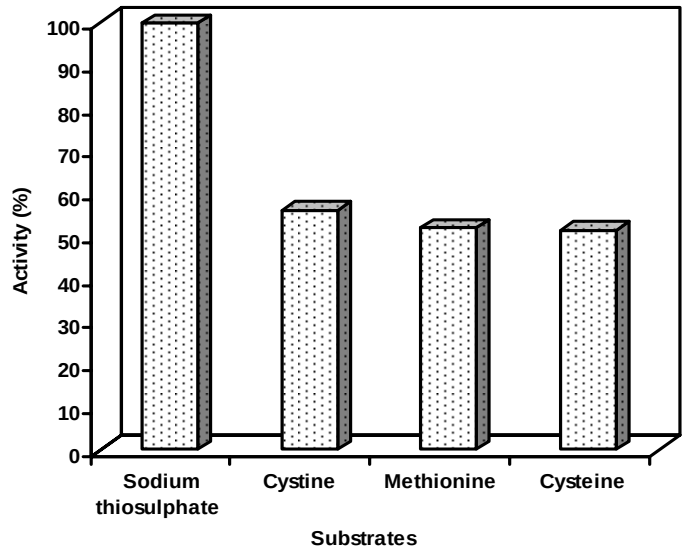
تم قياس فعالية أنزيم الريدينيز المنقى جزئيا من بلازما الدم (الحزمة A) بوجود البنزالديهايد بتركيز (10mM) وعند فترات زمنية مختلفة ولوحظ انخفاض الفعالية مقارنة بعدم وجود البنزالديهايد، ولكن بعد إضافة (0.1M) ثايوسلفات الصوديوم لوحظ زوال تأثير البنزالديهايد كعامل مثبط وإعادة تنشيط التفاعـل مرة أخرى وهذا يتفق مع ما ذكره (Cannella *et al.*, 1975).



الشكل 5: تأثير البنزالديهايد على فعالية أنزيم الريدينيز المنقى جزئيا من بلازما الدم (الحزمة A)

تأثير استبدال المادة الواهبة للكبريت (ثايوسلفات الصوديوم) بأحد الأحماض الامينية:

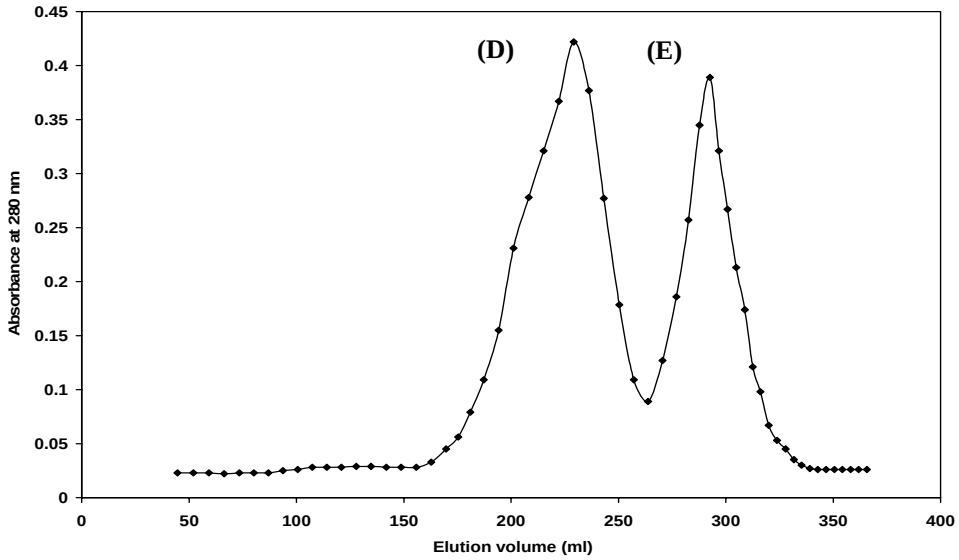
لدراسة تأثير استبدال المادة الواهبة للكبريت (ثايوسلفات الصوديوم) بأحد الأحماض الامينية الحاوية على الكبريت، تم إجراء التفاعل المحفز بواسطة أنزيم الريدينيز الموجود في بلازما الدم وبوجود سـيانيد البوتاسيوم وأحد الأحماض الامينية (سستين، مثيونين، سستاين) كمواد أساس واهبة للكبريت، واظهـرت النتائج أن أعلى نسبة للفعالية كانت باستخدام مادة الأساس ثايوسلفات الصوديوم لذلك تعتبر افـضل مـادة أساس لأنزيم الريدينيز.



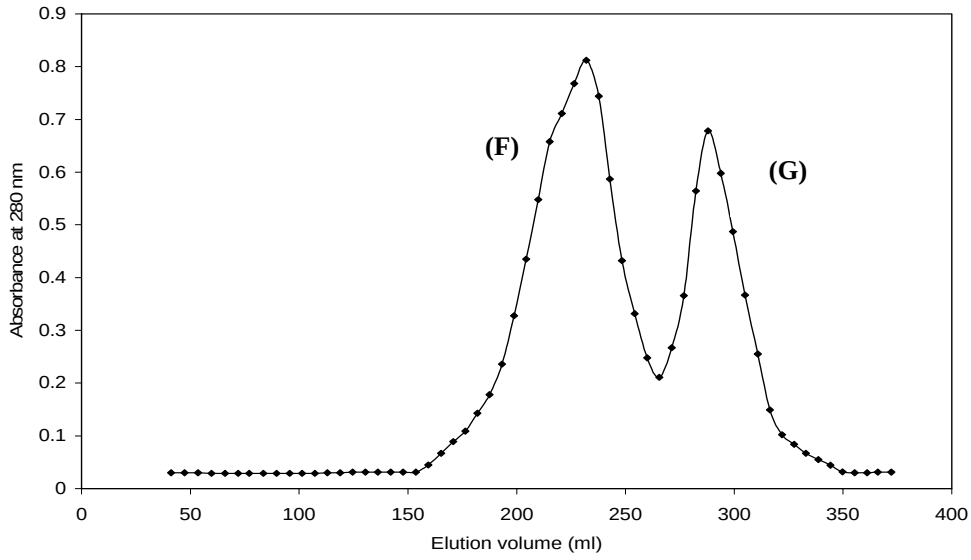
الشكل 6: تأثير استبدال المادة الواهبة للكبريت على فعالية أنزيم الريدينيز

تأثير بيتا – ميركابتو ايثانول على الخواص الجزيئية لأنزيم الريدينيز:

يعد مركب بيتا – ميركابتو ايثانول من المركبات التي تعمل على اختزال أصرة كبريت - كبريـت الموجودة في البروتين وقد وجد أن إضافته بتركيز (1%) الى الحزمة البروتينية (A) والحزمة البروتينية (C) عمل على اختزال أصرة كبريت- كبريت الموجودة في أنزيم الريدينيز وتحويلها الـى أصـرة SH حيث انفصلت الحزم البروتينية (A) و(C) الى حزمتين (D,E) و(F,G) كما في الشكلين وهذا يتفق مع ما ذكره (Bowen *et al.*, 1965).



الشكل 7: المظهر الجانبي لأنزيم الريدينيز بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (100×2 cm) الحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95 cm) بعد إضافة بيتا- ميركابتو ايثانول للحزمة (A).



الشكل 8: المظهر الجانبي لأنزيم الريدينيز بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (100×2 cm) الحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95 cm) بعد إضافة بيتا–ميركابتو ايثانول للحزمة (C).

المتغيرات السريرية لدى المجاميع المصابة بالتسمم بالسيانيد داخل وخارج الجسم مقارنة بالسيطرة:

تم دراسة تأثير السيانيد عند حقنه بحيوانات التجارب (داخل الجسم) وعند إضافته الى الدم (خارج الجسم) على بعض المتغيرات السريرية وكذلك دور ثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز في إزالة سمية السيانيد من خلال ملاحظة تركيز هذه المتغيرات ومنها:

1. الهيموكلوبين:

الجدول 4 : تأثير المواد المعطاة على تركيز الهيموكلوبين في الدم.

المجاميع التجريبية	المادة المعطاة	Conc. of hemoglobin(g/100ml) mean ± S · D		
		In vivo	In vitro	
			15 min	30 min
مجموعة السيطرة (0)	المحلول الملحي	19.606 ± 0.027	16.752 ±0.382	16.461 ± 0.171
مجموعة المعاملة الأولى (1)	سيانيد البوتاسيوم	22.225* ± 0.076	17.933* ± 0.185	17.564* ± 0.100
مجموعة المعاملة الثانية (2)	سيانيد البوتاسيوم وثايوسلفات الصوديوم	19.501 ±0.202	14.833* ± 0.100	14.095* ± 0.060
مجموعة المعاملة الثالثة (3)	سيانيد البوتاسيوم و أنزيم الريدينيز	19.558 ± 0.124	16.642 ± 0.062	14.944* ± 0.059
مجموعة المعاملة الرابعة (4)	سيانيد البوتاسيوم و ثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز	–	16.712 ± 0.189	15.940 ± 0.144

* Significant difference from control at ($p < 0.05$)

أظهرت النتائج وجود ارتفاع في تركيز الهيموكلوبين للمجموعة المعطاة سيانيد البوتاسيوم (داخل وخارج الجسم) مقارنة بمعدل تركيزه لدى مجموعة السيطرة، وهذا يتفق مع ما وجده (ATSDR, 2004) من أن التسمم بالسيانيد يؤدي الى زيادة تركيز هيموكلوبين الدم. بينما لوحظ عدم وجود فرق معنوي لدى المجموعة المعطاة ثايوسلفات الصوديوم والمجموعة المعطاة أنزيم الريدينيز (داخل الجسم) والمجموعة المعطاة ثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز (خارج الجسم)، كما لوحظ أن تأثير مادة ثايوسلفات الصوديوم يكون أكفأ من تأثير أنزيم الريدينيز في إزالة سمية السيانيد وقد لوحظ ايضاً أن تأثير المواد المعطاة يكون أوضح بعد مرور (30 min) عنها عند الزمن (15 min) وقد يعزى ذلك الى أن طول الفترة الزمنية يؤدي الى إزالة العوامل المثبطة بشكل نهائي.

2. الكلوكوز:

الجدول 5: تأثير المواد المعطاة على تركيز الكلوكوز في مصل وبلازما الدم

المجاميع التجريبية	المادة المعطاة	Conc. of glucose (mmole /l) mean ± S · D		
		In vitro		In vivo
		15 min	30 min	
مجموعة السيطرة (0)	المحلول الملحي	4.456 ± 0.324	4.247 ± 0.035	4.178 ± 0.048
مجموعة المعاملة الأولى (1)	سيانيد البوتاسيوم	6.924* ± 0.740	7.155* ± 0.037	6.715* ± 0.083
مجموعة المعاملة الثانية (2)	سيانيد البوتاسيوم وثايوسلفات الصوديوم	3.481* ± 0.418	4.370 ± 0.019	4.012 ± 0.017
مجموعة المعاملة الثالثة (3)	سيانيد البوتاسيوم وأنزيم الريدينيز	4.248 ± 0.190	4.831 ± 0.048	4.221 ± 0.027
مجموعة المعاملة الرابعة (4)	سيانيد البوتاسيوم وثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز	–	3.451* ± 0.019	3.277* ± 0.028

* Significant difference from control at ($p < 0.05$)

بينت النتائج وجود في تركيز الكلوكوز لدى المجموعة المعطاة سيانيد البوتاسيوم (داخل وخارج الجسم) مقارنة مع معدل تركيزه لدى مجموعة السيطرة وهذا يتفق مع ما ذكره (EPA, 1990) من أن التسمم بالسيانيد يؤثر على ايض الكلوكوز اذ يسبب تنشيط مسار الكلايكوجينولسز والتقليل من مسار الكلايكولسز وبالتالي زيادة تركيز الكلوكوز في مصل وبلازما الدم. بينما لوحظ وجود انخفاض معنوي في تركيز الكلوكوز لدى المجموعة المعطاة ثايوسلفات الصوديوم (داخل الجسم) والمجموعة المعطاة ثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز (خارج الجسم) ورجوع تركيز الكلوكوز في المجاميع الأخرى الى مستوى يقارب تركيزه في مجموعة السيطرة وهذا يتفق مع ما ذكره (Caianut *et al.*, 1984) وقد لوحظ ايضاً أن تأثير المواد المعطاة يكون واضحاً بعد مرور (30 min) عنها عن الزمن (15 min) وهذا يعزى الى أن طول الفترة الزمنية يؤدي الى زوال العوامل المثبطة بشكل نهائي.

3. الثايوسيانيت:

يعد الثايوسيانيت الناتج النهائي لايض السيانيد داخل وخارج الجسم إذ يتحول السيانيد الى الثايوسيانيت بوجود أنزيم الريدينيز المحفز للتفاعل ثم يطرح الثايوسيانيت عن طريق الإدرار.

الجدول 6: تأثير المواد المعطاة على تركيز الثايوسيانيت في مصل وبلازما الدم

المجاميع التجريبية	المادة المعطاة	Conc. of thiocyanate (µmole/l) mean ± S · D		
		In vivo	In vitro	
			15 min	30 min
مجموعة السيطرة (0)	المحلول الملحي	19.25 ± 0.000	75.333 ± 0.570	75.333 ± 0.570
مجموعة المعاملة الأولى (1)	سيانيد البوتاسيوم	25.583* ± 0.629	118** ± 1.520	** 130.330 ± 3.000
مجموعة المعاملة الثانية (2)	سيانيد البوتاسيوم وثايوسلفات الصوديوم	28.796* ± 0.320	254*** ± 2.280	*** 280.143 ± 3.605
مجموعة المعاملة الثالثة (3)	سيانيد البوتاسيوم وأنزيم الريدينيز	24.091* ± 0.392	126.330** ± 2.700	** 138.660 ± 3.000
مجموعة المعاملة الرابعة (4)	سيانيد البوتاسيوم وثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز	-	194.616*** ± 3.050	*** 194.900 ± 2.360

*Significant difference from control at ($p < 0.05$) , ($p<0.001$) **, ($p<0.0001$) ***.

أظهرت النتائج وجود ارتفاع في تركيز الثايوسيانيت لدى المجموعة المعطـاة سـيانيد البوتاسـيوم (داخل وخارج الجسم) مقارنة بمعدل تركيزه لدى مجموعة السيطرة، كذلك لوحظ وجود ارتفاع واضح في تركيز الثايوسيانيت لدى المجموعة المعطاة ثايوسلفات الصوديوم والمجموعة المعطـاة أنـزيم الريـدينيز (داخل وخارج الجسم) والمجموعة المعطاة ثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز (خارج الجسم) مقارنـة بمعدل تركيزه لدى مجموعة السيطرة وهذا يتفق مع ما ذكره (Tulsawani *et al.*, 2005) من أن معالجة التسمم بثايوسلفات الصوديوم يؤدي الى زيادة تركيز الثايوسيانيت فـي الـدم، وهـذا يعـزى الـى دور ثايوسلفات الصوديوم وأنزيم الريدينيز في إزالة سـمية الـسيانيد بتحويلـه الـى مركـب اقـل سـمية (الثايوسيانيت)، كما لوحظ أن تأثير ثايوسلفات الصوديوم يكون اكبر في إزالة السمية مقارنة بتأثير أنـزيم الريدينيز وهذا يتفق مع ما ذكره (Caianut *et al.*, 1984) وقد لوحظ ايضاً أن تأثير المواد المعطاة يكون واضحاً بعد مرور (30 min) عنها عن الزمن (15 min) وهذا يعزى الى أن طول الفترة الزمنية يـؤدي الى إزالة السيانيد بتحويله الى الثايوسيانيت الأقل سمية.

يستنتج من الدراسة ان الطريقة المحورة لتحضير الانزيم بشكل بلورات نقية اعطت عـدد مـرات تنقية أعلى من استخدام طريقة الترسيب والترشيح الهلامي في عزل الانزيم من الدم كذلك تبين ايـضاً أن

الانزيم المعزول له القابلية على إزالة سمية السيانيد داخل وخارج الجسم وعليه نوصي بمحاولة استخدام الانزيم كأحد طرائق معالجة التسمم بالسيانيد.

المصادر الاجنبية

Agboola, F.K., and Okonji, R.E., 2004. Presence of Rhodanese in the Cytosolic Fraction of the Fruit Bat (Eidolon Helvum) liver. J. Biochem. Mol. Biol. 37(3): pp.275-281.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2004.

Andrews, P., 1965. The gel Filtaration Behavior of Proteins Related to their Molecular Weight Over Awide rang. J. Biol. Chem. 96: 595p.

Baillie, R.D., and Horowitz, P.M., 1976. The Aromatic Residue Content of the Enzyme Rhodanese. Biochem. Biophys. Acta. 427(2): pp.894-899.

Bowen, T.J.; Butter, P.J., and Happold, F.C., 1965. Some Properties of the Rhodanese System of Thiobacillus Denitrificans. Biochem. J. 97: pp.651-657.

Burtis, C.A., and Ashwood, E.R., 1999. Tietz Test Book of Cinical Chemistry. 3rd Edn., W. B. Saunders Company, London, PP.840-841.

Buzaleh, A.M.; Vazquez, E.S., and Battle, A.M., 1990. The Effect of Cyanide in Toxication on Hepatic Rhodanese kinetics. Gen. Pharmacol. 21(2): pp.219-222.

Caianut, B.; Schnebil, H.; Rhyner, K., and Furrer, J., 1984. Decrased Thiosulphate Sulfurtransferase (Rhodanese) in Lebers Hereditary Optic Atrophy. J. Mol. Med. 62(18): pp.850-854.

Cannella, C.; Pecci, L.; Costa, M., and Pensa, B., 1975. Inactivation of Rhodanese by Pyridoxal 5-Phosphate. Eur. J. Biochem. 56: pp.283-287.

Drabkin, D.L., and Austin, J.H., 1935. Determination of Hemoglobin. J. Biol. Chem. 112: 51p.

Environment Protection Agency (EPA). 1990.

Horowitz, P., and Detoma, F., 1970. Improved Preparation of Bovine Liver Rhodanese. Biol. Chem. 245(5): pp.984-985.

Iciek, M., and Wlodek, L., 2001. Biosynthesis and Biological Properties of Compound Containing Highly Reactive Reduced Sulfane Sulfur. Pol. J. Pharmacol. 53: pp.215-225.

Kado, Z.H., 2007. Biochemical Study of Rhodanese Enzyme Iisolated from Blood and it's Role in Cyanide Detoxification. College of Sciences. University of Mousl. Iraq.

Kenneth, M.B., and Robert, L.H., 1971. Structural Studies of Bovine Liver Rhodanese. J. Biol. Chem. 246(8): pp.2430-2437.

Kohanski, R.A., and Heinrikson, R.L., 1990. Primary Structure of Avian Hepatic Rhodanese. J. Protein**.** Chem. 9(4): pp.369-378.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin - Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: pp.265-275.

Plummer, T.D., 1978. An Interaction of Practical Biochemistry. 2nd Edn., Mc Graw – hill Book Co. V.K., 48, 53, 174, 270, 294p.

Rubab, Z., and Rahman, A., 2006. Serum Thiocyanate Level in Smokers, Passive Smoker and Never Smokers. J. Pak. Med. Assoc. Jul. 56(7): pp.323-343.

Schacterle, G.R., and Pollack, R.L., 1973. Asimplified Methed for the Quantive Assay of Small Amont of Protein in Biological Material. Anal. Biochem. 51: pp.654-655.

Smith, J., and Urbanska, K., 1986. Rhodanese Activity in Lotus Corriculatus Sensu - lato. J. Nat. Histol. 20(6): pp.1467-1476.

Sorbo, B.H., 1953. Rhodanese. Acta. Chem. Scand. 7: 1132p.

Tulsawani, R.K.; Debnath, M.; Pant, S.C., and Bhattacharya, R., 2005. Effect of Sub-acute Oral Cyanide Adminstration in Rats: Protective Efficacy of Alpha-ketoglutarate and Sodium Thiosulphate. Chem. Biol. Interact. 10(156): pp.1-12.

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

Westley, J., and Green, J., 1959. Crystalline Beef Kideny Rhodanese. J. Biol. Chem. 234(9): pp.2325-2326.

Westley, J.; Adler, H.; Westley, L., and Nishida, C., 1983. The Sulfurtransferase. Fundam. Appl. Toxicol. 3(7): pp.377-383.

Wilson, S.S.; Guillon, R.A., and Hokor, E.V., 1972. Studied of the Stability of 18 Chemical Constituents of Human Serum. Clin. Chem. 18(12): pp.1498-1503.