مجلة جامعة بني وليد للعلوم الإنسانية والتطبيقية
Bani Waleed University Journal of Humanities and Applied Sciences
تصدر عن– جامعة بني وليد – ليبيا
Website:https://jhas-bwu.com/index.php/bwjhas/index
المجلد العاشر ـ العدد الأول ـ 2025 ـ الصفحات (36–41)
ISSN3005-3900

التأثيرات المثبطة لليكاند (1 ،1- ثنائي ميثيل - 3- (ثايازول-2آيل)- ترايازين) وبعض معقداته على انزيمات لاكتات ديهيدروجينيز(LDH) وكرياتين فوسفاتيز(CPK)

محمود محمد حواس[1]*، ناصر رمضان امعيزة[2]، رجب فرج الكازغلي[3]
[2.1] قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة المرقب، الخمس – ليبيا
[3] قسم علم الحيوان، كلية العلوم، الجامعة الاسمرية، زليتن – ليبيا
mmhowas@elmergib.edu.ly

Inhibitory effects for ligand (1,1- dimethyl -3-(thiazole -2-yl)-triazine) and some its complexes on Lactate dehydrogenase (LDH), and Creatine phosphatase (CPK) enzymes

Mahmoud M. Howas[1], Naser R. Amaizah[2], and Ragab F. Al- Kazaghly[3]
[1,2] Chemistry Department, Faculty of Science, Elmergib University, Al-khoms, Libya.
[3] Zoology Department , Faculty of Science, Alasmarya University, Zliten. Libya.

تاريخ الاستلام: 25–11–2024 تاريخ القبول: 26–12–2024 تاريخ النشر: 11–01–2025

الملخص

يهدف بحثنا دراسة حيوية لتأثير المرتبطة (الليكاند) (1، 1- ثنائي مثيل -3- (ثايازول-2-آيل) – ترايازين) ومعقديها مع النحاس (II) والنيكل على تثبيط أثنين من الأنزيمات التي لها دور في بعض الأمراض كالسرطان والتهابات العظام وأمراض القلب. وقد تم جمع 20 عينة دم مرضى بالتهابات العظام و20 عينة دم اخرى لمرضى باضطرابات القلب تراوحت اعمارهم من (50-65) سنة وتم قياس فعالية انزيم لاكتات ديهيدروجينيز (LDH) وانزيم كرياتين فوسفاتيز (CPK). وتمت دراسة تثبيط هذه الأنزيمات بتراكيز 0.1 و 0.05 و0.025 ملي مول في دم مرضى بالتهابات في العظام، ولاحظنا أن المرتبطة تثبط أنزيم CPK بنسبة 24% في التركيز 0.1% mM و 7.8% في التركيز 0.05 mM وينشط بمقدار 8.2% في التركيز 0.025 mM. أما الأنزيم LDH فإنه يُثبط بمقدار 18.7% في التركيز 0.1 mM و 6.9% في التركيز 0.05 mM وينشط بمقدار 6.5% في التركيز 0.025 mM. أما تأثير معقدات النحاس (II) والنيكل التي تمت دراستها على الأنزيمات فكانت نتيجة الدراسة أن المعقدات المعدنية لها تأثير مثبط أكبر على الأنزيمات ويتراوح التثبيط بين 47- 72 % في دم مرضى يشكون من التهاب العظام عند زيادة تركيز المادة الاساس من (0.01 – 0.02) ملي مول ولوحظ ايضا ان معقد النحاس هو اكثر تثبيط من معقد النيكل ومن المرتبطة نفسها في دم مرضى بالتهابات القلب.

الكلمات المفتاحية: الانزيمات, مثبطات الانزيمات , انزيم لاكتات ديهيدروجينيز، كرياتين فوسفاتيز

Abstract

The paper involves a biological study for the effects of ligand (1,1 – dimethyl -3- (thiazole -2-yl) – triazine) and two from its complexes on enzymes having a role in cancer, bone inflammations and heart diseases, 20 blood samples were collected for patients having bone inflammations, and 20 other blood samples from patients with heart disorders, aged (50-65) years old from Alkomes teaching hospital in Alkomes City, Libya and asses the effectiveness of enzymes Lactate dehydrogenase (LDH), and Creatine phosphatase (CPK). The study of the inhibition of these enzymes was carried out at 0.1, 0.05, 0.025mM concentrations in the blood of patients having bone inflammation. The ligand inhibits CPK by 24% at 0.1mM and 7.8% at 0.05mM, while at 0.025mM it was activated by 8.2%, while the enzyme LDH was inhibited by

18.7% at 0.1mM concentration and 6.9% at 0.05mM.While at 0.025mM activated by 6.5%.The effects of the Cu(II) and Ni complexes studied on these enzymes were that these complexes have greater inhibition effects on these enzymes, the inhibition ranged between 47-72 % in the blood of a patients having bone inflammations، There was an when substrate concentration[S] was increased from (0.01-0.02 mM) and also Cu complex was more inhibited than Ni complex and ligand in the blood of patients having heart diseases.

Keywords: Enzymes, Enzyme Inhibitors, CPK, LDH.

المقدمة

الانزيمات هي بروتينات خاصة او خميرة مخلقة حيويا والتي تحفز تفاعلات كيميائية حيوية دون تغير في توازن التفاعل او دون ان تستهلك او تتلف او تعاني من تغير في تركيبها [1]. لا تجرى التفاعلات الانزيمية اعتياديا ادا ما تداخلت مادة معينة تدعى مثبط (Inhibitor) في سير التفاعل فالمثبطات جزئيات ترتبط بالإنزيمات وتخفض فعاليتها. وبما ان اعتراض او عرقلة فعل الانزيم يمكن ان يقتل مسبب المرض (Pathogen) او يصحح تفاعل ايضي غير متوازن (Metabolic imbalance) [2]. إنزيم لاكتات ديهيدروجينيز (LDH) هو إنزيم رباعي الأكسيدوروكتاز المؤكسد كما يوجد منه خمسة إيزوانزيم. ويمكن ملاحظة ارتفاعات واضحة منه في معظم مرضى فقر الدم اللمفاوي (Lymphoblastic leukemia) وخاصة في الأورام الخبيثة وبسبب الظروف العديدة التي تسهم في ازدياد فعاليته فقيمة LD العالية الكلية ليست نتيجة دقيقة أو خاصة (non-specific finding)، لذلك فإيجاد مستويات LDH له أهمية سريرية أكبر عندما يمكن فصله إلى أجزاء تعود لمتناظرات (Isoenzymes) الأنزيمات ، ويمكن فصل الأنزيم إلى خمسة أجزاء رئيسية، كل منها متكونة من أربع وحدات ثانوية، وله وزن جزيئي يقارب 128,000 دالتون (Daltons). وكل متناظر أنزيم يتكون من أربع سلاسل من الببتيدات ولكل منها وزن جزيئ يقارب 32,000 دالتون، وتتحد سلسلتين من البوليببتيد المختلفتين تسميان H (Heart) (قلب) و M (Muscle) (عضلة)، تتحد بخمسة أشكال لتعطي الأجزاء الخمسة
من متناظرات الأنزيم الرئيسية [3].

$$\text{Lactate} + NAD^{+} \xrightleftharpoons{LDH} \text{Pyruvate} + NADH^{+} + H^{+}$$

يتم التعبير عن LDH بشكل كبير في الأنسجة العضلية الملساء [4]. LDH يحفز الحد من مجموعة الكيتو في البيروفيت لمجموعة الهيدروكسيل التي تعطي اللاكتات بسبب أكسدة NADH إلى NAD^{+} في الخطوة الأخيرة من انحلال السكر [6,5]. للمركبات العضوية غير المتجانسة دورًا مهمًا في مجال المستحضرات الصيدلانية مثل أنشطتها البيولوجية مثل آثارها كمضادة للالتهابات ، ومضادات للميكروبات ومضادات الدسم [8,7]، تحديد هذا الانزيم مفيد في تشخيص الأمراض التي تنطوي على تلف الأنسجة. خمسة انزيمات LDH وخصائصها النسبية تتغير بشكل كبير في بعض الحالات المرضية [9] . كرياتين كاينيز (CPK) أنزيم مترافق مع استعادة ATP في الأنظمة المتقلصة أو المنقبضة أو الناقلة، إن وظيفته الفسيولوجية الأساسية تحدث في خلايا العضلات حيث أنه المسئول في خزن كرياتين فوسفات ذات الطاقة العالية فكل دوره تقلص في العضلة ينتج من استخدام كرياتين فوسفات مع إنتاج ATP، وهذه تُنتج مستويات ثابتة نوعاً ما من ATP في العضلات ، فالتفاعل العكسي المحفز بالأنزيم كرياتين كاينيز (CPK) موضح في المعادلة التالية:

$$\text{Creatine} + ATP \xrightleftharpoons{CPK} \text{Creatine phosphate} + ADP$$

تزداد مستويات CPK في مرضى القلب ومرضى عضلات الجمجمة بسبب التركيز العالي لأنزيم CPK في أنسجة العضلات ويعتبر مستوى CPK إشارة حساسة جداً في مرضى القلب الحاد (myocardial infarction) (AMI) وضمور العضلات (muscular dystrophy)، وفي الحقيقة هناك زيادة كبيرة في CPK لبعض أنواع ضمور العضلات حيث يصل من 50-100 ضعف من الحد الأعلى الطبيعي (upper limit of normal) (ULN) ورغم أن مستويات CPK الكلي مؤشرات حساسة لتلك الاعتلالات المرضية فهي ليست كلياً مؤشرات خاصة بسبب أن ارتفاع CPK يلاحظ أيضاً في الشواذ الأخرى من أمراض عضلات القلب والجمجمة. ويلاحظ كذلك ارتفاع مستويات CPK أحياناً في اضطرابات الجهاز العصبي المركزي كما في حوادث الأوعية الدموية الدماغية ويجب حدوث أضرار لحواجز الدماغ والدم ليسمح للأنزيمات أن تنطلق إلى جهاز الدوران الخارجي، ويوجد أنزيم CPK كمزدوج (Dimer) يتكون من وحدتين ثانويتين اللتان يمكن فصلهما بسهولة إلى ثلاث أشكال جزيئية، وقد تم التمييز بينها بالعلامات CPK-BB (النوع الموجود في الدماغ) و CPK(MB) (من النوع الهجيني) وCPK(MM) (النوع الموجود في العضلات) ، إن المتناظر CPK-MM هو النوع الرئيسي الموجود في العضلات ومصل الدم الاعتيادي، وتحتوي عضلات الجمجمة كلياً تقريباً CPK-MM مع كمية صغيرة من CPK-MB، إن معظم فعالية

CPK في عضلة القلب تعزى أيضاً إلى CPK-MM مع تقريباً 20% من CPK-MB [10]. يتكون مصل الدم الاعتيادي من حوالي 94%-100% CPK-MM، وتعزى الزيادة في معظم حالات ازدياد مستويات CPK-MM إلى أمراض عضلات القلب والجمجمة، وينتج كذلك من التهاب الغدة الدرقية ارتفاع كبير في مستويات CPK-MM ولذلك بسبب تدخل أنسجة العضلات (زيادة في نضوج الأنسجة)، وقد وجد حديثاً أنه يمكن ارتفاع مستويات CPK-BB في مرضى السرطان في مختلف الأعضاء، وقد وجد في مرضى سرطان البروستات وكذلك سرطان الجلد قبل أخذ العلاج ، وتشير هذه النتائج أن CPK-BB مهم كمؤشر ومرافق للسرطان [11].

المواد وطرق العمل:

المواد الكيمائية:

تم الحصول على الليكاند (1، 1- ثنائي مثيل -3- (ثايازول-2آيل)- ترايازين) وبعض معقداته من النحاس (II) والنيكل من معامل قسم الكيمياء كلية العلوم الخمس جامعة المرقب- ليبيا

طريقة العمل:

(1) تؤخذ عينات من الدم البشري في أنابيب خاصة معقمة لمنع تخثر الدم وتترك في درجة حرارة 37م^0 لمدة نصف ساعة لكي تترسب خلايا الدم الحمراء.

(2) تؤخذ الطبقة العليا الغنية بخلايا الدم البيضاء ثم توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة نصف ساعة لفصل خلايا الدم البيضاء وتؤخذ الطبقة العليا كمصدر للأنزيمات (LDH , CPK).

(3) يؤخذ 0.1 مل من المرتبطة أو المعقد (المثبط) بتراكيز 0.1، 0.05، 0.025 mM و 0.02 مل من الدم (السيرم).

(4) يبدأ التفاعل بإضافة المادة الأساس (1مل) إلى مزيج من الأنزيم والمادة المراد دراسة تأثيرها (المثبطات، المعقد) والتي تم تركها مع الأنزيم لمدة 15 دقيقة في درجة 37م^0

(5) تقاس سرعة التفاعل بالطريقة الطيفية بقياس الانخفاض في الامتصاصية في الطول الموجي 340 نانومتر للأنزيمين (nm).

تحضير مصل الدم:

تم تجميع 20عينة دم لمرضى يعانون التهاب العظام وتجميع 20عينة اخرى دم لمرضى يعانون من اضطراب في القلب تراوحت اعمارهم (50-65) سنة من مستشفى الخمس التعليمي وتم سحب 5 مل من عينات الدم في انابيب بلاستيكية جافة ونظيفة وفصل الجزء المتخثر عن المحلول الرائق باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة اذ يمثل المحلول الرائق مصل (سيرم) الدم. استخدم مباشرة لقياس قياس فعالية انزيمي LDH, CPK.

1- قياس فعالية انزيم اللاكتيت ديهايدروجينيز LDH

تم قياس فعالية انزيم الـ LDH بحسب الطريقة المتبعة من قبل [12] باستخدام عدة التحليل الجاهزة المحضرة من شركة Randox laboratories Ltd. وتحسب فعالية انزيم LDH حسب المعادلة التالية الواردة في كُتيب الشركة المصنعة: والقيمة الطبيعية (normal values) هي 230-460 U/L في 37 ^{0}C،عبرت عن فعالية الانزيمات بالوحدة العالمية / لتر (U/L) اذ ان وحدة الفعالية الواحدة (U) هي كمية الانزيم التي تحلل واحد مايكرو مول من المادة الاساس في الدقيقة الواحدة عند الظروف المثالية.

2- قياس فعالية انزيم كرياتين كاينيز CPK

ولحساب فعالية CPK تستخدم المعادلة التالية الواردة في كُتيب الشركة المصنعة في درجة الحرارة 37م^0:

$$U/L = 8095 \times \Delta A\ (at\ 340nm)$$

والقيم الطبيعية هي 24 – 195 U/L في الرجال و 24 – 170 U/L في الإناث.

النتائج والمناقشة

المركبات الحلقية غير المتجانسة والترايازينات والاحماض الامينية بمقدرتها تكوين معقدات مع المعادن تعيق تكوين DNA في خلايا الانسان ودلك بتثبيطها الانزيمات [14,13].

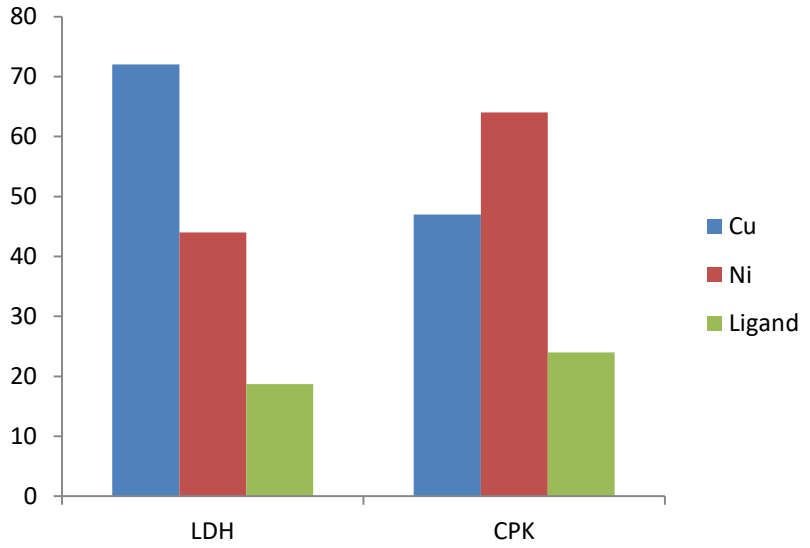
تمت دراسة التأثير المثبط للمرتبطة 1,1- ثنائي مثيل -3- (ثايازول – 2- آيل)- ترايازين ومعقديها مع النحاس (II) والنيكل على الأنزيمين المذكورين في الدم البشري لمرضى يشكون من التهابات في العظام وآلام في القلب. يوضح الجدول (1) تأثير المرتبطة في تثبيط الأنزيمين تحت الدراسة بتراكيز 0.1، 0.05، 0.025 mM في دم مرضى بالتهابات في العظام، نلاحظ أن المرتبطة تثبط أنزيم CPK بمقدار 24% في التركيز 0.1 mM و 7.8% في التركيز 0.05 mM ، بيتما ينشط الأنزيم في التركيز الأقل 0.025 mM بمقدار8.2%. أما الأنزيم LDH فإنه يثبط بمقدار 18.7% بتركيز 0.1 mM و 6.9 % في التركيز 0.05 mM، بينما ينشط الانزيم عند التركيز 0.025 mM بمقدار 6.5 ويشير الجدول (1) ايضا ان الليكاند قيد الدراسة له تأثير اكبر على انزيم CPK مما على انزيم LDH حيث يحتوي انزيم LDH على معدن الزنك Zn^+ في مركز نشاطه ويظهر ان الليكاند في التركيز الواطي ليس له القدرة على سلب ايون الزنك من الانزيم ويترواح التثبيط من 6-8 % وهو

اقل من 10% حيث ان النسبة المتفق عليها للتثبيط او التنشيط تكون اكبر من 10% [15].

الجدول (1) : النسب المئوية لتثبيط وتنشيط الانزيمين في ثلاث تراكيز من المرتبطة في دم مرضى بالتهابات العظام :

النسب المئوية لتثبيط او تنشيط انزيم CPK بوجود المرتبطة (المثبط)			النسب المئوية لتثبيط او تنشيط انزيم LDH بوجود المرتبطة (المثبط)		
0.025mM	0.05mM	0.1mM	0.025mM	0.05mM	0.1mM
- 8.2	7.8	24.0	- 6.5	6.9	18.7

الاشارة السالبة تعني تنشيط



الشكل (1): تأثير الليكاند ومعقديه مع النحاس والنيكل بتركيز 0.1 mM في تثبيط الانزيمينLDH و CPK في دم مرضى يشكون من التهابات العظام

وتمت دراسة تأثير معقدين النحاس والنيكل لليكاند على الانزيمين CPK، LDH في دم يشكو من التهابات العظام عمره 65 سنة، نلاحظ من الشكل (1) بالنسبة لانزيم LDH ان التثبيط الاعلى لمعقد النحاس حيث بلغ 72% اما معقد النيكل فيثبط الانزيم بمقدار 44 % اما المرتبطة (الليكاند) تثبط الانزيم بمقدار 18.7% وفي حالة انزيم CPK فانه يتأثر بمعقد النيكل بشكل اكبر حيث بلغ التثبيط 64% اما معقد النحاس فيثبط الانزيم بمقدار 47% والليكاند نسبة 24%. ودلت الدراسات ان ميكانيكية او الية فعل هده المركبات تتضمن ارتباطها بالفلز الموجود في المركز الفعال للإنزيم [15].

الجدول (2): النسب المئوية قبل وبعد اضافة الليكاند ومعقداته من النحاس والنيكل وبثلاثة تراكيز من المادة الاساس في دم مريض يشكو من اضطرابات في القلب عمره 52 سنة:

نوع الانزيم	الليكاند ومعقداته	فعالية الانزيم U/L قبل اضافة المثبطات [I]=0.1mM [S]=0.01 mM	فعالية الانزيم U/L بعد اضافة المثبطات [I]=0.1mM [S]=0.01 Mm	(%) للتثبيط	فعالية الانزيم U/L بعد اضافة المثبطات [I]=0.1mM [S]=0.015 mM	(%) للتثبيط	فعالية الانزيمU/L بعد اضافة المثبطات [I]=0.1mM [S]=0.02 mM	(%) للتثبيط
CPK	الليكاند	40	26	35.00	21	47.50	16	60.00
	معقد النحاس		21	47.50	17	57.50	13	67.50
	معقد النيكل		24	40.00	16	60.00	14	65.00
LDH	الليكاند	280	165	41.07	152	45.71	130	53.57
	معقد النحاس		147	47.50	126	55.00	112	60.00
	معقد النيكل		152	45.71	132	52.85	122	56.42

يبين الجدول (2) النسب المئوية لتثبيط الانزيمين المذكورين قبل وبعد اضافة المثبط [I] بتركيز0.1 mM وبتركيزين من المادة الاساس [S] في دم يشكو من اضطرابات في القلب وقد لاحظنا ان معقدات النيكل والنحاس تثبط الانزيمين بمقدار اكبر قليلا من الليكاند نفسه وقد لاحظنا ايضا انه عند زيادة تركيز المادة الاساس من 0.01 mM - 0.02 mM تزداد درجة التثبيط بنسبة من 20%- 30%.

الاستنتاجات:

1- نستنتج ان للمرتبطة (1، 1- ثنائي مثيل -3- (ثايازول-2آيل)- ترايازين) ومعقديها من النحاس (II) والنيكل المقدرة على تثبيط الانزيمين قيد الدراسة (LDH، CPK).
2- ارتباط المثبطات يكون بالمعدن الموجود بالمركز الفعال للإنزيم وبدلك تعرقل وتمنع ارتباط الانزيم بالمادة الاساس (Substrate).
3- نستنتج ان هده المركبات (مركبات الترايازين ومعقداتها) هي مثبطات تنافسية لبعض الانزيمات اي انها ترتبط بنفس مركز نشاط الانزيمات.
4- نستنتج انه من خواص هده المثبطات التنافسية ان درجة التثبيط تزداد بازدياد تركيز المادة الاساس[S] عند تبوث تركيز المثبط [I].
5- معقدي النحاس والنيكل يثبط الانزيمين (LDH، CPK) اكبر من المرتبطة (الليكاند) نفسها.

ونوصي في نهاية البحث بالدراسة الحيوية للمركبات الكيميائية العديدة لتكون مضادة للأيض (antimetabolite) وبدراسة تأثيرها المثبط للإنزيمات التي لها دور في بعض الامراض الخطيرة كالسرطان والقلب والتهاب العظام وغيرها.

References

[1] Bishop .M . L . Duben – Engel kirk ,J , L, and fody,E. P ." Clinical chemistry", Lippincon-raven publishers p.207 (1996).

[2] Shapiro. R , vallee, B . L. "Interaction of hurnan placental Ribonuclease with placental Ribonuclease inhibitor Biochemistry ; 26, 30 (8), 2246-55(1991).

[3] Bruns .D.E., Ernerson , J.C, Interemann , S. , Bertholf ,R. , Hill , K.E., Savory , J. " Lactate dehydrogenase isoenzyme -1:changes during the first day after acute myocardial infraction . Clin.chem , 27 , 1821(1981) .

[4] Le A.; Cooper C. R.; Gouw A. M.; Dinavahi R.; Maitra A.; Deck L. M.; et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (2010) 107:2037-2042. [PubMed: 20133848].

[5] Jennifer L. P.; Natalie E. K.; Connie M. T.; John H. B.; and Vicky L. H. B. Lactate Dehydrogenase Kinetics and Inhibition Using a Microplate Reader. Biochemistry and Molecular Biology Education (2007) 35 (4): 287-292.
[6] Nicolas C.;, Emanuela, F.; Martin W.; Frédéric V.; and Dominique M. Activity, Stability and Structural Studies of Lactate Dehydrogenases Adapted to Extreme Thermal Environments. J. Mol. Biol. (2007) 374: 547-562.
[7] Sashidhara, K.V. Novel Keto-enamineSchiffs bases from 7-hydroxy -4-methyl-2-oxo-2Hbenzo[h]chromene-8,10-dicarbaldehyde as potential antidyslipidemic and antioxidant agents. Euro J of Med Chem; (2008) 43(11): 2592-2596.
[8] Kaijal, A.; Bala, S.; Sharma, N.; and Saini, V. Schiff Bases: A Versatile. Pharmacophore J of Catalysts; (2013) 14: 893512.
[9] J. Rishpon, I. Rosen, The development of an immunosensor for the electrochemical determination of the isoenzyme LDH5, Biosensors 4 (1989) 61–74.
[10]. Galen , R.S. " The Enzyme diagnosis of myocardial infraction " , Human Pathol ; 6 , 141(1975) .
[11]. Silverman , L.M. , Dermer , G.B. , Zweig , M.H. Van Seirteghem , A.C., and Tokes , Z.A. " Creatine kinase BB: A new tumor-associated marker , Clin . Chem. ; 25 , 1432(1979) .
[12]. Wroblewski, F. and Ladue, J. Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90(1): 210-213(1955).
[13] Moore, E.C., Booth, B.A., Sartorelli, A.C., Cancer Res:31,235(1971)
[14] Sartorelli, A.C., Agrawal, K,C., and Moore, E.C, Biochem Pharmacol., 20,3119(1971).
[15] Fishman, W.H., and Sie, H.G. Enzymologia., 41, 144(1971).