CC BY

College of Basic Education Research Journal

www.berj.mosuljournals.com

Isolation and purification of diamine oxidase from green peas and study its properties

Nada I. Abdulrazzaq
Sukayna H. Rashed
Department of Chemistry, College of Science, Mosul University, Mosul – Iraq.

Article Information

Article history:
Received: November 24,2024
Reviewer: December 20,2024
Accepted: December 20,2024
Available online

Keywords:
headache, DAO, pea, purification, gel filtration

Correspondence:
a) nada.23scp88@student.uomosul.edu.iq
b) Corresponding Author: sukaynarashed@uomosul.edu.iq

Abstract

This research included isolating diamine oxidase from green pea extract and partially purifying it, as well as determining its approximate molecular weight, after diamine oxidase was isolated using different biotechnologies. The protein compounds of ammonium sulphate precipitate solution were separated at a saturation rate of 65%, using gel filtration chromatography technology on a separation column containing Sephadex G-100 gel. Results show two clear bands. Band A was excluded, because its activity of diamine oxidase was very low compared to band B. Specific concentration of diamine oxidase in B peak reached (61.32 ng/ml), number of purification times was (3.58 times) and recovery rate was (14.25%) for pea extract. Also, gel filtration technique using G-100 was used to estimate approximate molecular weight of diamine oxidase, which showed that enzyme has a molecular weight of approximately 112,201 daltons. In addition, effect of inhibitors and stimulants on activity of isolated enzyme was studied. Therefore, when using Zolmitriptan and the commonly used headache medicine - Panadol - it was found that former achieved greatest ability to increase effectiveness of diamine oxidase, while elements such as lead and potassium showed that lead has Greater ability to reduce activity of diamine oxidase compared to potassium, which is a less severe inhibitor of diamine oxidase isolated and purified from green peas.

ISSN: 1992 – 7452

عزل وتنقية إنزيم داي أمين أوكسيديز من البازلاء الخضراء ودراسة خواصه

ندى ادريس عبدالرزاق سكينة حسين رشيد

قسم الكيمياء/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

الملخص

تضمن البحث عزل إنزيم داي أمين أوكسيديز من مستخلص البازلاء الخضراء وتنقيته جزئياً، وكذلك تعيين وزنه الجزيئي التقريبي، إذ تم عزل إنزيم داي أمين أوكسيديز باستخدام تقانات حيوية مختلفة، إذ تم فصل المركبات البروتينية لمحلول راسب كبريتات الأمونيوم بنسبة تشبع 65% وباستخدام تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي على عمود الفصل الحاوي على الهلام سيفاديكس G-100 . وقد حصلنا على حزمتين واضحتين، إذ تم استبعاد الحزمة A ، لأن فعالية إنزيم داي أمين أوكسيديز فيها قليلة جدا مقارنة بالحزمة B التي تم الاعتماد عليها، إذ بلغ التركيز النوعي لإنزيم داي أمين أوكسيديز في هذه الحزمة (61.32 ng/ml) وإن عدد مرات التنقية هي(3.58 مرة) ونسبة الاستعادة هي(14.25%) لمستخلص البازلاء . كذلك تم استخدام تقنية الترشيح الهلامي باستخدام الهلام من نوع G100 لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم حيث بلغت 112201 دالتون تقريبا, فضلا عن ذلك فقد تمت دراسة تأثير المثبطات والمنشطات على فعالية الانزيم المعزول لذلك عند استخدام دواء Zolmitriptan و دواء الصداع الشائع الاستعمال-البانادول- فقد وجد إن الاول يمتلك القابلية الاكبر على زيادة فعالية إنزيم داي أمين أوكسيديز في حين ان العناصر مثل الرصاص والبوتاسيوم وضحت إن الرصاص يمتلك القابلية الاكبر في خفض فعالية إنزيم داي أمين أوكسيديز مقارنة مع البوتاسيوم الذي يعد مثبطا أقل حدة لفعالية إنزيم داي أمين أوكسيديز المعزول والمنقى من البازلاء الخضراء.

الكلمات المفتاحية: داي امين اوكسيديز، البازلاء، الترشيح الهلامي، الصداع

المقدمة:

إنزيم داي أمين أوكسيديز(EC.1.4.3.22) والذي كان يسمى سابقًاhistaminase ، وكما يطلق عليه اسم (AOC1) "amine oxidase, copper-containing, 1، يتواجد في أنسجة الجسم المختلفة ، ولكنه نشط بشكل خاص في الغشاء المخاطي للأمعاء. إذ يساهم في أكسدة العديد من البولي امينات (وهي مواد أساسية لتكاثر الخلايا) وبالتالي فإن DAO هو إنزيم منظم في الأنسجة مثل نخاع العظم والغشاء المخاطي المعوي. وقد تم العثور على إنزيم DAO في الخلايا الظهارية للأمعاء، والمشيمة، والكلى، الغدة الصعترية(1). الوظيفة الفسلجية لإنزيم DAO تشمل تنظيم عمليات الاستجابة التحسسية ونقص التروية ، أثناء عملية الهضم، يتم تصنيع إنزيم DAO بشكل مستمر في الغشاء

المخاطي للأمعاء الدقيقة ويعمل كحاجز أيضي ضد ثنائي الأمينات الخارجية، بما في ذلك الهستامين(2). ان تراكم الهستامين المبتلع واختراقه لاحقًا في الدورة الدموية نتيجة لانخفاض أو تباطؤ عملية الهدم بواسطة إنزيم DAO في مستوى ظهارة الأمعاء الدقيقة والذي يعد سببًا محتملاً لمتلازمة عدم تحمل الهستامين Histamine intolerance HIT ، ويعد قياس نشاط إنزيم DAO في المصل جزءاً من الفحوصات التكميلية في حالات معينة(3). وان عدم تحمل الهيستامين هو اضطراب في توازن الهستامين بسبب انخفاض التحلل المعوي لهذا الأمين، والذي يحدث بشكل رئيسي بسبب نقص إنزيم داي امين أوكسيديز (DAO) (4).

ان إنزيم داي امين أوكسيديز (DAO) هو إنزيم يحلل الهستامين ، وانخفاض نشاط DAO يعني انخفاض تحلل الهستامين، والذي يمكن أن يسبب تراكم الهستامين ويؤدي إلى أعراض مختلفة، بما في ذلك الصداع والصداع النصفي (5) ، وقد يكون نقص DAO نتيجة طفرة وراثية أو مرتبطة ببعض الأمراض التي تحدُّ من إفراز هذا الإنزيم (6).

تعد البازلاء (Pisum sativum L.) الكاملة غنية بالبروتينات والنشويات والألياف الغذائية، بالإضافة إلى ذلك تعد مادة البولي فينول وخاصة الفلافونويد والأحماض الفينولية من المكونات المهمة والتي تظهر فوائد صحية مختلفة، مثل مضادات الأكسدة، ومضادات الالتهاب، ومضادات الميكروبات، ومضادات التليف الكلوي، وتنظيم تأثيرات متلازمة التمثيل الغذائي (7).

وتعد شتلات البازلاء مصادر مناسبة لتركيب مكمل DAO. على النقيض من DAO من أصل حيواني، يُعتقد أن DAO النباتي (Vegetarianism DAO) له نشاط محدد أعلى، فضلاً عن كونه أكثر قبولًا وأكثر أمانًا من حيث الآثار الجانبية لذلك، تم اقتراح vDAO باعتباره إنزيمًا علاجيًا فعالًا للإعطاء عن طريق الفم لعلاج الهستامين الغذائي والحساسية والاختلالات المعوية المرتبطة بالهستامين. وقد تم العثور على vDAO في أنسجة مختلفة (البذور، البراعم، الجذور، الشتلات، محاور الأجنة، النبتات، القمم، الأوراق) لمجموعة متنوعة من الأنواع النباتية (8).

وتعد البازلاء مصدرًا ممتازًا للعديد من العناصر الغذائية بما في ذلك الألياف وفيتامين K (الموجود بشكل خاص في البازلاء الطازجة) والمنغنيز والفولات والنحاس والفوسفور. كما أنها مصدر جيد للفيتامينات B6 وB2 والنياسين والزنك والبروتين والمغنيسيوم والحديد والبوتاسيوم والكولين (9).

ولقد تضمنت الدراسة الحالية عزل وتنقية جزئية لإنزيم DAO من البازلاء الخضراء باستخدام التقنيات الكيموحيوية المتنوعة، وبعد عزل الإنزيم تمت دراسة تأثير المثبطات والمنشطات على فعاليته.

المواد المستعملة وطرائق العمل:

النبات المستعمل: تم أخذ (100غرام) من البازلاء الخضراء وسحقت باستخدام ال blender ، وأجريت فيما بعد خطوات التنقية، باستعمال التقانات الحياتية المختلفة التي سوف يتم وصفها كما يأتي:

1. الترسيب بالإزاحة الملحية بوساطة كبريتات الأَمونيوم:

تمت إضافة كبريتات الأَمونيوم Ammonium sulphate إلى البازلاء بحالتها الصلبة وبنسبة تشبع (65%)، وكانت الإضافة بصورة تدريجية مع التحريك المستمر بالمحرك الكهربائي لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 4 °م ، ومن ثَمَّ ترك المحلول لمدة (24 ساعة) عند درجة حرارة 4°م (في الثلاجة) لإتمام عملية الترسيب بصورة كاملة ، إذ تُعدُّ عملية الترسيب بكبريتات الأَمونيوم من المراحل الأُولى للتنقية التي يتم خلالها ترسيب البروتينات الموجودة في المستخلص اعتماداً على درجة تشبع المستخلص بكبريتات الأَمونيوم (10).

2. الفصل بالطرد المركزي المبرد Cooling centrifuge separation

فُصِلَ الراسب عن السائل الرائق بعد إتمام عملية الترسيب بالملح وذلك باستعمال جهاز الطرد المركزي المبرد إذ أُستعملت السرعة 13000 xg ولمدة 35 دقيقة ، و أُذيب الراسب الذي حُصِلَ عليه في أَقل كمية من الماء المقطر، وبعد حساب حجم محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق الناتج قدرت كمية البروتين بطريقة Modified Lowry method (11) ، وبعدها تم قياس فعاليَّة إنزيم داي أمين أوكسيديز في محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق ثَمَّ حفظ محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق في الثلاجة عند درجة حرارة −20 °م لحين استعماله في الخطوات اللاحقة.

3. الفرز الغشائي Dialysis

اجريت هذه العملية للتخلص من كبريتات الأمونيوم المضافة في عملية الترسيب والمواد ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة وقد تمت عملية الفرز الغشائي بوضع المحلول البروتيني المحضر في الخطوة (2 السابقة) في كيس السلوفان المحكم الربط من الأسفل ومن ثم ربط من الأعلى ربطا

محكما ووضع الأنبوب في وعاء حجمي يحتوي على (1) لتر من محلول (NH_4HCO_3) Ammonium bicarbonateبتركيز (0.1N) ، وتمت عملية الفرز الغشاء عند درجة حرارة (4) مئوية مع التحريك المستمر بالمحرك المغناطيسي واستمرت العملية لمدة (24) ساعة مع مراعاة تبديل محلول الفرز الغشاء كل ساعتين(12) ، وبعد الانتهاء من عملية الفرز الغشائي قدر الحجم النهائي للمحلول الناتج وكمية البروتين وفعالية الإنزيم للمحلول الناتج من الفرز الغشائي، ثم حفظ المحلول عند درجة حرارة (20− درجة مئوية) لحين استخدامه في الخطوات اللاحقة.

4. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي : Gel filtration chromatography

الهلام المستخدم في هذه التقنية (SephadexG-number) (Seweden Pharmacy Dextran) إذ إنَّ (G-number تمثل رقم أَو قياس الفجوات الداخلية) ، وتم استخدام عمود الفصل ذو الأَبعاد (51 X 2.5) سم الَّذي يحتوي على هلام السفاديكس G-100، إذ وضعت مادة الهلام بارتفاع (46) سم ، إذ تم في هذا العمود تحديد حجم الروغان للمواد القياسية التي تحقن في العمود لغرض تحديد صفات العمود وإيجاد منحني قياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي (للحزمة البروتينية ذات الفعاليَّة العالية الناتجة من حقن المواد في عمود الفصل الَّتي تم تحديد حجوم الروغان أَيضًا) برسم العلاقة الخطية بين احجام الروغان ولوغاريتم أَوزانها الجزيئية المعلومة (13). تم تحضير المحاليل القياسية بإذابة (0.1) غرام من المواد القياسية في (10) مل من الماء المقطر، وبعدها تجرى عملية حقن محاليل المواد القياسية المذكورة آنفًا وبحجم 5 مل في عمود الفصل وعلى الجدران الداخلية للعمود يتبعها الغسل بالمحلول المنظم الَّذي استخدم أَيضًا بدوره كمحلول روغان (Elution solution) . تم إجراء عملية الجمع للعمود بمعدل جريان 60مل/ ساعة بفاصل زمني مقداره 2 دقيقة إذ تم جمع الأجزاء يدويا، وتمت متابعة المحتوى البروتيني بقياس الامتصاصية للأجزاء المفصولة بجهاز المطياف الضوئي (UV-VIS Spect.) عند الطول الموجي (280) نانوميتر ، إضافة لذلك تمت متابعة فعاليَّة إنزيم DAO في كل الأجزاء المفصولة ليتم جمع الأجزاء الحاوية على أَعلى فعاليَّة للإنزيم ، تم جمع وتحديد حجم الروغان للمادة القياسية التي حقنت في العمود لتحديد صفات العمود وإيجاد منحني قياسي لتحديد الوزن

الجزيئي التقريبي, وذلك من خلال رسم العلاقة الخطية بين حجوم الروغان و لوغاريتم أَوزانها الجزيئية المعلومة .

5. تقانة التجفيد (التجميد والتجفيف) بوساطة جهاز اللايفولايزر

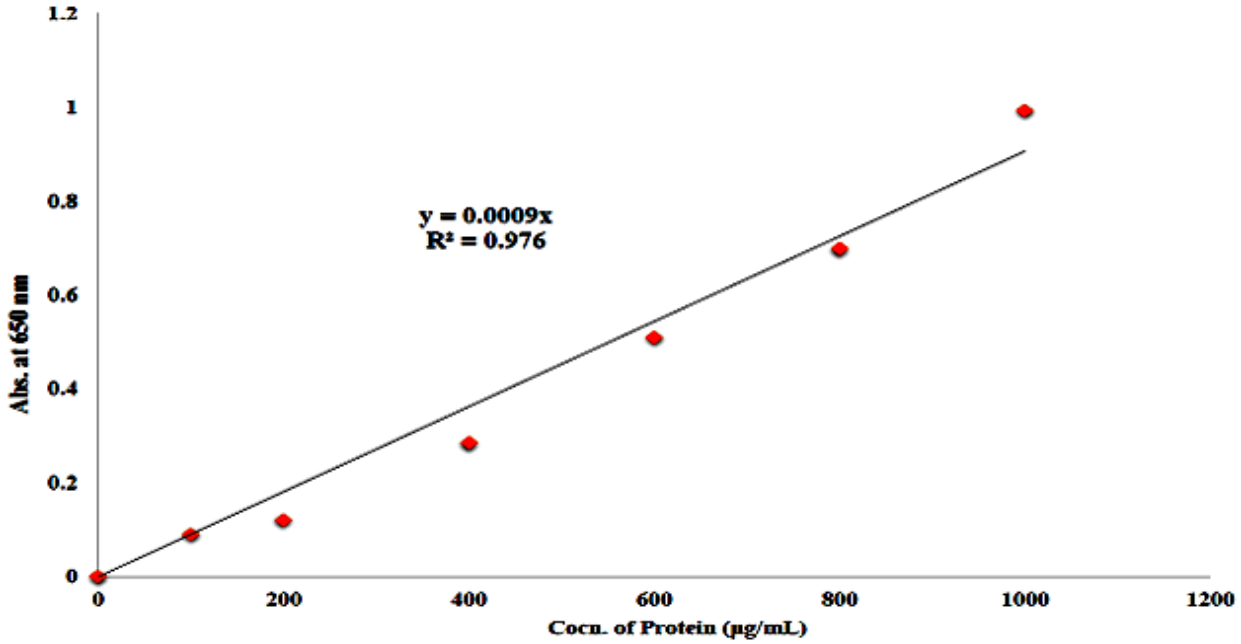
Freeze-Drying technique lyophilizer (Lyophilization)

استعملت هذه التقانة في تقليص حجم القمم الناتجة من عمود الفصل سيفادكس G-100 الَّتي أَظهرت فعاليَّة عالية لإنزيم DAO لغرض الحصول على الإنزيم بهيئة مسحوق جاف، تمت بوضع المحاليل المراد تجفيفها في دوارق بلاستيكية وتجميدها بدرجة حرارة −20°م لمدة 72 ساعة تقريباً وضعت بعد ذلك في جهاز التجفيد Lyophilizer إلى حين التخلص من الماء ، ثَمَّ حُفظت مواد الرواسب البروتينية الخام بعد ذلك في أَنابيب محكمة الغطاء، وضعت في المجمدة بدرجة حرارة −20°م لحين استعمالها في دراسة تأثير بعض المواد والادوية على فعاليَّة إنزيم DAO المعزول من البازلاء(14).

6. تقدير كمية البروتين بطريقة العالم لاوري المحورة

قدرتّ كمية البروتين باستعمال طريقة Foline-Lowery method (11)، حضر المحلول القياسي (Stock Solution) للبروتين بتركيز 1ملغم/مل وذلك بإذابة 100 ملغم من ألبومين مصل البقر (BSA) في 100 مل من الماء المقطر ثَمَّ قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتراً فإذا كانت القراءة أَقل من (0.67) يجب إذابة حبيبات عدة من ألبومين مصل البقر في المحلول وقراءة الامتصاصية، إذ يجب أن تكون الامتصاصية مساوية لـ 0.67 أي إن التركيز 1 ملغم/ مل.

تم تحضير المنحنى القياسي بأَخذ تراكيز مختلفة من المحلول القياسي تتراوح بين (0-450 مايكروغرام/مل) ، و قرأت الامتصاصية ضد محلول الكفء Blank عند طول موجي يساوي 650 نانوميتر كما هو مبين في **الشكل (1)** يحضر محلول الكفء من إضافة الكواشف المذكورة آنفًا إلى 1 مل من الماء المقطر.



الشكل (1) المنحني القياسي لتقدير البروتين

7. التحليل الإحصائي Statistical analysis

حُللت نتائج الفحوصات السريرية جميعها باستعمال البرنامج الإحصائي SPSS 25 لتحديد المعدل Mean والانحراف القياسي Standard Deviation (SD)، وتم اختيار اختبار t – (t-test) للمقارنة بين متغيرين واستخدام اختبار Anovaللمقارنة لأكثر من متغيرين وإيجاد الاختلاف بين القيم التي ظهرت بقيمة الاحتمالية(P) P-value التي تحدث عند P≤0.05 اختلاف معنوي Significant، وعند P>0.05 اختلاف غير معنوي Non-Significant (15)

.

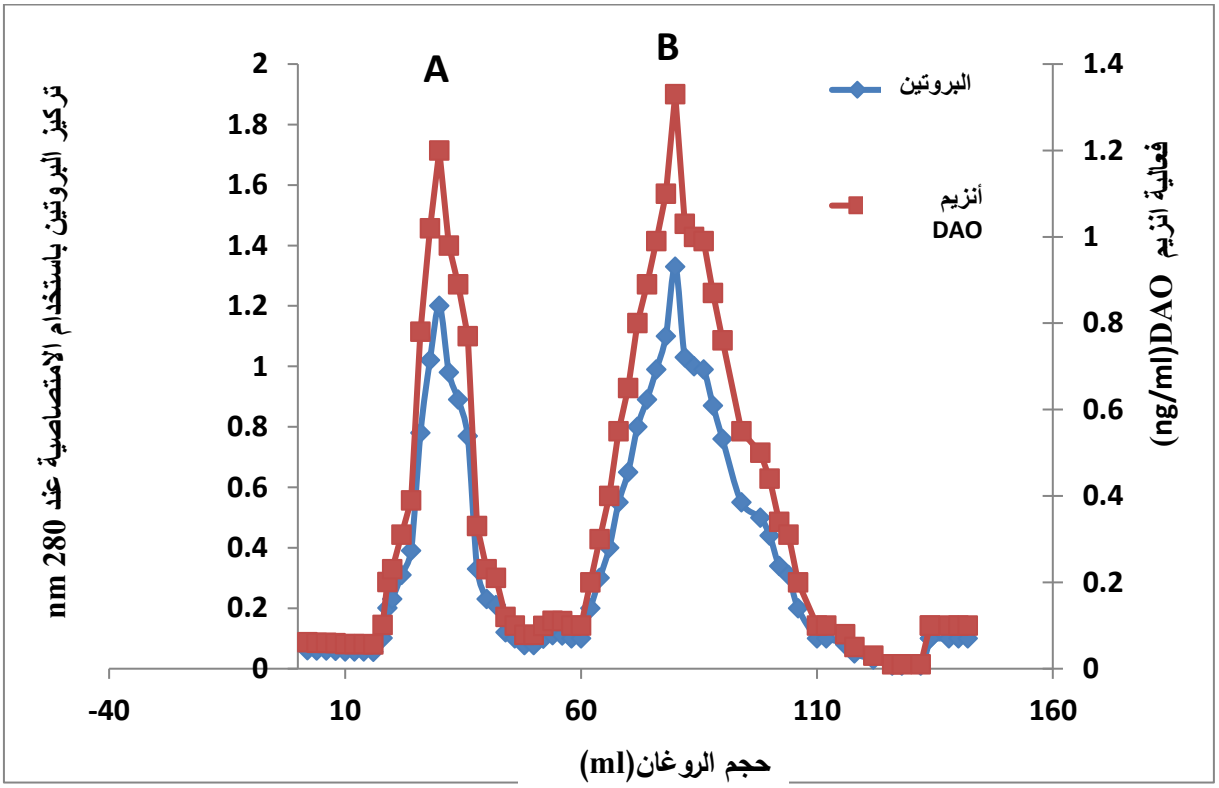
النتائج والمناقشة:

عند تمرير الراسب البروتيني المعزول من مستخلص البازلاء الخضراء بينت النتائج ظهور حزمتين بروتينية (A,B) كما في **الشكل (2)** وتم حساب فعالية انزيم DAO في الحزم البروتينية التي ظهرت بعد الفصل وِجُدَ أنَّ الحزمة البروتينية الثانية (B) هي الحزمة البروتينية الفعالة الرئيسية لإنزيم DAO ، إذ وِجُدَ أن التركيز النوعي لإنزيم DAO في هذه الحزمة هو (62.57ng/mg) وأن عدد مرات التنقية هي 3.58 مرة ونسبة الاستعادة هي (14.25) كما موضح في **الجدول (1)**.

الجدول (1) خطوات التنقية لإنزيم DAO من مستخلص البازلاء

خطوات التنقية	الحجم ml	تركيز البروتين (mg/ml)	فعاليةDAO (ng/ml) (*unit/ml)	الفعالية الكلية للإنزيم (unit)	الفعالية النوعية ng/mg (protein)	عدد مرات التنقية	الأستعادة%
المستخلص الخام	200	4.67	81.75	16350	17.50	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم65% (قبل التجفيد)	151	3.23	84.95	12827.45	26.30	1.5	78.46
الراشح (بدون تجفيد)	193	0.51	5.99	1156.07	11.74	0.49	7.07
الفرز الغشائي للراسب	89	2.53	89.20	7938.8	35.26	2.01	48.6
القمة A الناتجة من عمود الفصل الترشيح الهلامي سيفاديكس-G 100	20	1.06	10.81	216.2	10.19	0.58	1.32
القمة B الناتجة من عمود الفصل الترشيح الهلامي سيفاديكس-G 100	**28**	1.33	83.23	**2330.44**	**62.57**	**3.58**	**14.25**

*وحدة الانزيم enzyme unit: كمية إنزيم داي أمين أوكسيديز بوحدة النانوغرام التي تحول مادة الاساس الى ناتج في الدقيقة الواحدة لكل مليلتر تحت الظروف المثلى لعمل الانزيم.



الشكل (2) روغان الحزم البروتينية لإنزيم داي أمين اوكسيديز الناتجة من عمود الفصل الهلامي نوع سيفاديكس G-100 والعائد لمستخلص البازلاء.

1. تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم داي أمين أوكسيديز المعزول والناتج من كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

استخدمت تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم DAO (الحزمة البروتينية B) والحاوية على أعلى تركيز نوعي مقداره (62.57 ng/ml) وذات نقاوة وصلت إلى3.58 مرة لمستخلص البازلاء، لذلك تم استخدامها في تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم DAO بإمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي التي تتراوح أوزانها الجزيئية من 204 إلى 2000000 دالتون على العمود ولتعيين خواص عمود الفصل من حيثُ الحجم الداخلي (V_i) وكذلك الحجم الخالي من الحبيبات (V_o) ، إذ أن **الجدول (2)** يبين المواد القياسية التي تم امرارها على عمود الفصل الحاوي على الهلام G-100 مع أوزانها الجزيئية وأحجام الروغان.

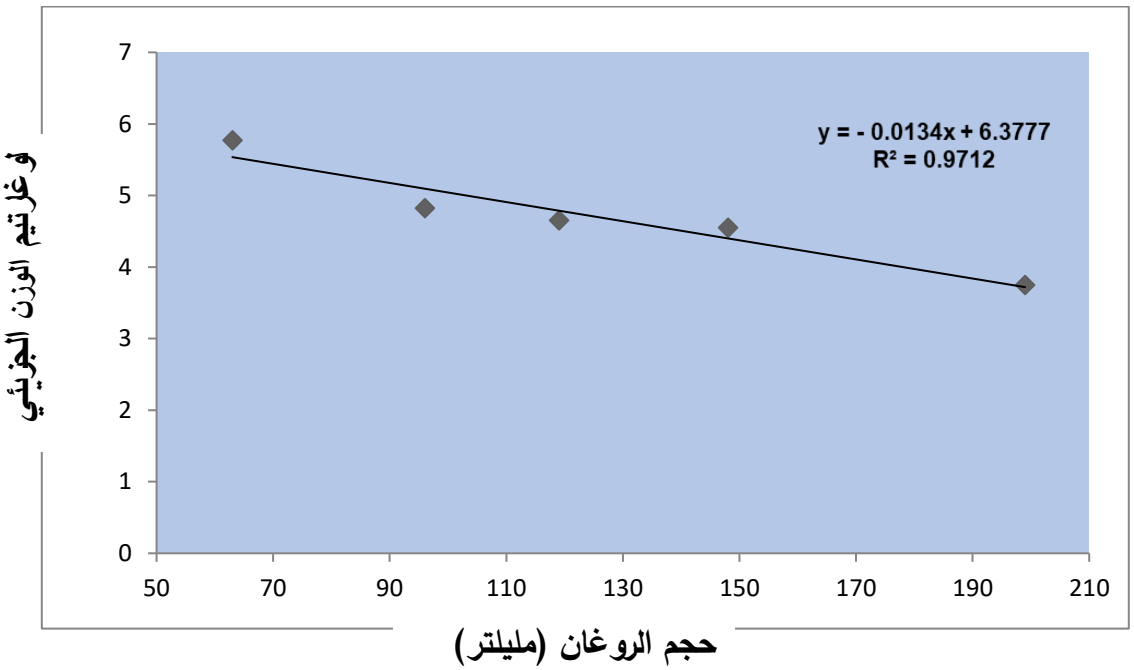
وعند رسم حجم الروغان لكل مادة قياسية مقابل لوغارتم وزنها الجزيئي ظهر لدينا خط مستقيم كما يلاحظ في **الشكل (3)** الذي حدد به الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم DAO الذي بلغ بحدود

117489 دالتون عند قمة حجم روغان 97ml بالنسبة لعينة مستخلص البازلاء وهو مقارب لما وجده (16) حيثُ وجدو أن الوزن الجزيئي لإنزيم DAO يبلغ 118000دالتون.

الجدول (2) الوزن الجزيئي مع أحجام الروغان للمواد القياسية المستخدمة في تقنية الترشيح الهلامي باستخدام الهلام G-100 لتحديد الوزن الجزيئي لإنزيم DAO

المادة	الوزن الجزيئي (Dalto)	حجم الروغان(ml)
الدكستران الأزرقblue dextran (الحجم الخالي V_o)	2000000	24
إنزيم اليوريز Urease	590000	63
البومين مصل البقر Bovin serum albumin (BSA)	67000	96
ألبومين البيضEgg albumin	45000	119
الببسينPepsin	36000	148
الأنسولين Insulin	5750	199
التربتوفان Tryptophan (الحجم الداخلي V_i)	204	219
مستخلص البازلاء (القمةB)	**117489**	**97***

* أُخذت هذه القيمة من الشكل (2) الذي يظهر فيه حجم روغان القمة B المفصولة لإنزيم DAO من مستخلص البازلاء بوساطة تقنية الترشيح الهلامي لعمود الفصل G-100.



الشكل(3) المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم DAO بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل الهلامي نوع سيفاديكس G-100

وقد وُجِدَ أَنَّ الوزن الجزيئي لهذا الإنزيم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي Gel Filtration يبلغ 186000 دالتون، وباستعمال تقنية الترحيل الكهربائي وبأستخدام هلام اكرايلامايد -SDS (Sodium Dodecyl Sulphat Acrylamide Gel Electrophoresis) ، وجد أنه يحوي حزمةٌ واحدة ذات وزن جزيئي قدرهُ 104000 دالتون(17). وفي دراسة ثانية تمت تنقية DAO من الباقلاء الذي تم إنباتها لمدة 5 أيام وتم دراسة خواصه في المختبر، وجد إن وزنه الجزيئي بمقدار 121000 دالتون، وباستعمال تقنية الترحيل الكهربائي وجد أنه يحوي حزمة واحدة ذات وزن جزيئي قدره 52000 دالتون، وكانت الكتلة الجزيئية للإنزيم المقدرة بترشيح هلام G-100 Sephadex 121كيلو دالتون، وأظهر التحليل الكهربائي لهلام بولي أكريلاميد كبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS-PAGE) شريطًا واحدًا عند كتلة جزيئية قدرها 52 كيلو دالتون، وكان للإنزيم نشاط مثالي عند 40 درجة مئوية واحتفظ بنشاطه بعد تحضينه عند 30 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة ، وأظهر نشاطًا أعلى عند درجة الحموضة 6.5 مقارنةً بقيم الأس الهيدروجيني الأخرى، وتم تثبيط الإنزيم بشكل ملحوظ بواسطة (+Mg(2، (+Cu(2، (+)Fe(3، Aminoguanidine ، Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)، Disodium salt of ethylene tetraacetic acid (EDTA-Na(2))، L-Cysteine and beta-

mercaptoethanol ، وكانت قيمة K(m) لـ DAO هي 0.23 مليمول لتر (−1) للبوتريسين و0.96 مليمول لتر (−1) للسبيرميدين، ومع ذلك فإن الإنزيم لم يحلل السبيرمين(18). أفاد سوزوكي وهاجيوارا أن إنزيم DAO من براعم Zea mays المقدرة بواسطة ترشيح الهلام كان 118 كيلو دالتون، بينما أنتج SDS-PAGE نطاقًا واحدًا معDAO 55 كيلو دالتون، وفي المقابل كان DAO من الكلى والأمعاء الخنازير 186 كيلو دالتون، وتشير هذه النتائج إلى أن إنزيم DAO يختلف بين النباتات والحيوانات(19).

2. تأثير بعض الادوية والمركبات الكيميائية على فعالية إنزيم DAO

The effect of some drugs and chemical compounds on the activity of an enzyme DAO

إنَّ الانزيمات ممكن ان يزداد نشاطها أو أن يحصل لها تثبيط (تقل فعاليتها) بوساطة عدد من المركبات الدوائية والكيميائية، تم استخدام العلاج الشائع الاستخدام لدى مرضى الصداع النصفي المسمى Zolora (Zolmitriptan) والمعروف بتأثيره المهدئ لنوبة الصداع والمتوفر في الصيدليات المحلية في مدينة الموصل، أما الدواء الثاني الذي تمت دراسة تأثيراته على فعالية انزيم DAO فقد كان دواء البانادول والذي يشكل الباراسيتامول المكون الرئيس فيه ، في حين تم اقتراح مركبات خلات الرصاص وكلوريد البوتاسيوم كمثبطات لفعالية إنزيم DAO.

- بلغت قيمة فعالية إنزيم DAO المعزول والمنقى من مستخلص البازلاء بوساطة تقنية الترشيح الهلامي لعمود الفصل G-100 بمقدار (83.23 نانوغرام/ مليلتر).

تشير النتائج المثبتة في **الجدول (3)** دراسة تأثير كلوريد البوتاسيوم Potassium chloride (KCl) على نشاط ديامين أوكسيديز (DAO) المنقى من البازلاء الخضراء ، وجد أَن محلول KCL وبتركيز(25مايكرومول/لتر) كان قادرًا على خفض نشاط الإنزيم بشكل ملحوظ بنسبة تثبيط قدرها 13.30% ، وفي هذا السياق يُعتقد أن التأثير المثبط لـ KCl على نشاط DAO يرجع إلى الطبيعة الأيونية لـ KCl، والتي يمكن أن تتداخل مع الموقع النشط للإنزيم أو تغير البيئة الأيونية اللازمة لنشاط الإنزيم الأمثل ، وقد تتضمن هذه الآلية تغييرات في الرقم الهيدروجيني أو القوة الأيونية، والتي يمكن أن تؤثر على بنية الإنزيم أو ارتباط المادة الاساس وبالتالي تقليل الكفاءة التحفيزية لـ DAO ، ومن المحتمل أن تؤدي إلى انخفاض تحلل الهستامين(20) .

نتائجنا هي في نفس المسار لبعض الدراسات التي أجريت على الجسم الحي(*in vivo*)، والتي وجدت أيضا التأثير المثبط لـ KCl على نشاط DAO بسبب تأثيرات KCl على توازن الإلكتروليت في الجسم، وهذا يمكن أن يؤثر نظريًا على أنشطة الإنزيم ويمكن أن تتغير البيئة الأيونية الفسيولوجية ، وأيضا ربما تؤثر على قدرة DAO على تحلل الهستامين(21) .

الجدول (3) تأثير المواد الكيميائية على فعالية إنزيم DAO المنقى من البازلاء الخضراء بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام الهلام G-100

العينة	المادة	الفعالية(ng/ml)	التثبيط (%)
البازلاء الخضراء	KCL	56.09	**-32.6**
	$Pb(CH_3COO)_2$	41.69	**-49.9**

وكشفت أيضا النتائج الموضحة في **الجدول (3)** ، أن محلول خلات الرصاص (Lead acetate) $Pb(CH_3COO)_2$ وبتركيز (25مايكرومول/ لتر) له تأثير مثبط على نشاط DAO خارج جسم الكائن الحي (*in vitro*) ، مع نسبة تثبيط قدرها 49.9 % لنشاط DAO في البازلاء الخضراء ، وقد يكون التغيير الملحوظ في نشاط DAO مرتبطًا بقدرة أيونات الرصاص (Pb^{2+}) من خلات الرصاص كمعادن ثقيلة على التفاعل مع الإنزيمات من خلال الارتباط بمواقعها النشطة ، مما يعطل قدرتها على تحفيز تفكيك الثياميناتِ(ثنائي الأمين) مثل الهيستامين، وقد ينجم هذا التثبيط عن تفاعل الرصاص مع sulfhydryl groups أو مجموعات وظيفية أخرى داخل موقع الإنزيم النشط (22). تفسير آخر للتأثير المثبط لخلات الرصاص خارج جسم الكائن الحي (*in vitro*) على نشاط DAO قد يُعزى أيضًا إلى قدرة خلات الرصاص على زيادة مستويات الأنواع التفاعلية من الأكسجين (ROS) وبالتالي تحفيز الإجهاد التأكسدي، الذي يمكن أن يؤثر أيضًا على نشاط DAO ، ويمكن أن يتسبب زيادة الإجهاد التأكسدي في تلف بنية الإنزيم أو إضعاف وظيفته، مما يؤدي إلى تثبيط نشاطه (23).
وبالإضافة إلى ذلك، قد يؤثر التعرض للرصاص على النشاط الإنزيمي بما في ذلك DAO ، وأيضًا التغيرات في البيئة الأيونية ومستويات الpH ، ويمكن أن يؤدي الرصاص إلى تعطيل التوازن الأيوني في الأنظمة البيولوجية، وهو أمر حاسم للحفاظ على الظروف المثلى اللازمة لعمل الإنزيم بشكل فعّال، ويمكن أن تؤدي التغيرات في القوة الأيونية وال pH إلى تثبيط قدرة

DAOعلى تحفيز التفاعلات بكفاءة، إذ أن الإنزيمات حساسة لهذه العوامل وتُظهر الدراسات حول السموم البيئية والإنزيمات آليات مشابهة، إذ يمكن أن تؤدي الملوثات مثل الرصاص والمعادن الثقيلة الأخرى إلى تغيير النشاط الإنزيمي بسبب تفاعلها مع الأيونات الخلوية وتغيير بنية البروتين(24). وأظهرت بعض الدراسات الحيوانية أن التعرض للرصاص يمكن أن يغير مجموعة متنوعة من المتغيرات البيوكيميائية، بما في ذلك علامات الإجهاد التأكسدي وأنشطة الإنزيمات، بينما الدراسات المحددة في الجسم الحي(*in vivo*) التي تركز فقط على تأثيرات خلات الرصاص على نشاط DAO محدودة ، في الواقع تشير الدراسات الحالية إلى أَن التعرض للرصاص يمكن أن يثبط DAO ، ويزيد من مستويات الهيستامين، ويؤدي إلى أعراض فيزيولوجية ذات صلة (25). وبشكل عام، تعكس تأثيرات خلات الرصاص على نشاط DAO تأثيرها السمي، مما يؤثر ليس فقط على الإنزيم نفسه ولكن أيضًا على المسارات الفسيولوجية الأوسع المتعلقة بأيض الهيستامين وعلى عكس النتائج التي تم الحصول عليها من خلال متابعة التأثير المثبط لكل من كلوريد البوتاسيوم وخلات الرصاص على نشاط DAO ، تشير التحليلات الإحصائية الموضحة في **الجدول (4)** إلى أنه عند مقارنة تأثيرzoloraz (مضاد الهيستامين) على نشاط DAO خارج جسم الكائن الحي(*in vitro*)، لوحظ ارتفاع في نشاط DAO في وجود دواء zoloraz ، في البازلاء الخضراء وبتركيز (100 مايكرومول/لتر) وبمقدار 45.12% ، وهنا يمكن أن يُنسب التنشيط الذي لوحظ في نشاط DAO في وجود دواء zoloraz إلى allosteric activation وارتباط zoloraz بإنزيم DAO مما يؤدي إلى تغييرات في الشكل البنيوي تؤدي إلى تحويل أسرع للهيستامين إلى نواتجه ، وقد يعمل zoloraz كمنظم ألوستيري allosteric modulator، معززًا النشاط الإنزيمي لـ DAO دون التنافس مباشرةً مع المادة الاساس أو قد يعزز توفر المادة الاساس لـ DAO أو يعدل من ارتباطها ، مما يؤدي إلى زيادة النشاط الإنزيمي(26). تفسير آخر محتمل لزيادة نشاط DAO في وجود دواء zoloraz قد يكون مرتبطًا بتأثيره على المسارات الأيضية التي تؤثر بشكل غير مباشر على نشاط DAO ، مما يؤدي إلى زيادة نشاطه (27). ومن الجدير بالذكر أيضًا أن الدراسات السابقة أظهرت أن zoloraz قد يعدل التعبير الجيني ويزيد من توافر أو فعالية النحاس كعامل مساعد للإنزيم، مما يؤدي إلى زيادة تخليق DAO أو بروتيناته التنظيمية، مما يعزز نشاطه (28) .

الجدول (4) تأثير الادوية على فعالية إنزيم DAO المنقى من مصل الدم والبازلاء الخضراء بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام الهلام G-100

العينة	المادة	الفعالية (ng/ml)	التنشيط (%)
البازلاء الخضراء	**Zoloraz**	120.78	**+45.12**
	Panadol	97.99	**+17.74**

كما أظهر دواء البانادول (أسيتامينوفين) دوره في تحسين نشاط إنزيمDAO المنقى من المصل والبازلاء الخضراء، وفي هذا السياق أشارت التحليلات الإحصائية أيضًا إلى أن البانادول زاد من نشاط DAO وبنسبة تصل إلى 17.74% من البازلاء الخضراء وكما موضح في **الجدول (4)** قد يُعزى ارتباط البانادول بزيادة نشاط DAO إلى عدة آليات محتملة، تشمل هذه الآليات تقليل الإجهاد التأكسدي بسبب خصائص الأسيتامينوفين (acetaminophen's) المضادة للأكسدة (29) وقد تساعد خصائص البانادول المضادة للأكسدة بجرعات منخفضة في تقليل الإجهاد التأكسدي، إذ أَن إنزيم DAO يشارك في تكسير الهيستامين والبولي أمينات، وهي عمليات قد تنتج نواتج أكسدة ، وقد يؤدي تقليل الإجهاد التأكسدي إلى تعزيز نشاطDAO من خلال خلق بيئة خلوية أكثر ملاءمة لوظيفة الإنزيم(30). وكما يمكن أن يُعزى زيادة نشاط DAOإلى احتمال أن البانادول يزيد من توفر المادة الاساس في عملية أيض الهيستامين(31)، أو قد يقوم بتثبيط إنزيمات أيضية أخرى تتنافس على المادة الاساس معDAO من خلال تقليل العبء الأيضي على هذه المسارات، وقد توفر المزيد من المادة الاساس لـDAO، مما يزيد من نشاطه ، وبشكل عام قد تسهم هذه العوامل مجتمعة في تعزيز نشاط DAO في وجود البانادول.

الاستنتاجات Conclusions

أوضحت النتائج أن الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم DAO بتقنية الترشيح الهلامي 117489 دالتون تقريبا لمستخلص البازلاء. كما ان دواء Zoloraz كان الأكثر كفاءة في تنشيط إنزيم DAO من دواء البانادول.

References

1. Schwelberger, H.G.; Feurle, J.; & Ahrens, F. (2013). Characterization of diamine oxidase from human seminal plasma. J. Neural Transm.120, 983–986.
2. Ji, Y.; Sakata, Y.; Li, X.; Zhang, C.; Yang, Q.; Xu, M.; Wollin, A.; Langhans, W.; & Tso, P. (2013). Lymphatic diamine oxidase secretion stimulated by fat absorption is linked with histamine release. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 304, G732–G740.
3. Pinzer, T.C.; Tietz, E.; Waldmann, E.; Schink, M.; Neurath, M.F.;& Zopf, Y. (2017). Circadian profiling reveals higher histamine plasma levels and lower diamine oxidase serum activities in 24% of patients with suspected histamine intolerance compared to food allergy and controls. Allergy, 73, 949–957.
4. Izquierdo-Casas, J., Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M.L., Lorente-Gascón, M., Duelo, A., Soler-Singla, L., & Vidal-Carou, M.C. (2019). Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clin. Nutr.*38(1):152–158. doi: 10.1016/j.clnu.2018.01.013.
5. Tobajas, Y., Alemany-Fornés, M., Samarra, I., Romero-Giménez, J., Tintoré, M., Del Pino, A., Canela, N., Del Bas, J. M., Ortega-Olivé, N., de Lecea, C., & Escoté, X. (2023). Diamine Oxidase Interactions with Anti-Inflammatory and Anti-Migraine Medicines in the Treatment of Migraine. Journal of clinical medicine, 12(23), 7502. https://doi.org/10.3390/jcm12237502.
6. Joan Izquierdo-Casas, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Marian Lorente-Gascón, Adriana Duelo, M. Carmen Vidal-Carou, & Luis Soler-Singla. (2018). Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine. Journal of Physiology and Biochemistry .74(1) 93-99.
7. Wu, D. T., Li, W. X., Wan, J. J., Hu, Y. C., Gan, R. Y., & Zou, L. (2023). A Comprehensive Review of Pea (*Pisum sativum* L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, *12*(13), 2527. https://doi.org/10.3390/foods12132527

8. Boulfekhar, R.; Ohlund, L.; Kumaresan, K.M.; Megoura, M.; Warkentin, T.D.; Ispas-Szabo, P.; Sleno, L.; &Mateescu, M.A. (2023). Diamine Oxidase as a Therapeutic Enzyme: Study of Germination from Vegetal Sources and Investigation of the Presence of β-N-Oxalyl-L-α, β-diaminopropionic Acid (β-ODAP) Using LC-MS/MS. *Int. J. Mol. Sci. 24*, 4625.https://doi.org/10.3390/ijms24054625
9. Ruscigno, M. R.D. (2016). Issue pea protein.Today's Dietitian . Vol. 18, No. 12, P. 32.
10. Robyt, F. J., & White, J. B. (1987). Biochemical techniques theory and practice. Books / Cole Publishing Com., USA.pp:125-135,141,235-236,246,263,269.
11. 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.
12. Miltko, R., Bełżecki, G., Kasperowicz, A., & Michałowski, T. (2010). Isolation and purification of chitinolytic enzymes of rumen ciliates Eudiplodinium maggii. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, 15, 189-196.
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. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. John Wiley & Sons.
15. Hinton, P.P. (2004). Statistics Explained. 2d Edition by Routledge printed in the USA and Canada pp.85-125.
16. H. F. et al. (2010). "The Role of Diamine Oxidase in Histamine Metabolism and its Clinical Significance." European Journal of Pharmacology, 641(2-3), 114-122.
17. Schwelberger, H. G., & Bodner, E. (1997). Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. Biochimica et biophysica acta, 1340(1), 152–164. https://doi.org/10.1016/s0167-4838(97)00039-3
18. Yang, R., Chen, H., Han, Y., & Gu, Z. (2012). Purification of diamine oxidase and its properties in germinated fava bean (Vicia faba L.). Journal of the science of food and agriculture, 92(8), 1709–1715. https://doi.org/10.1002/jsfa.5536

19. Suzuki, Y. & Hagiwara, M. (1993). Purification and characterization of diamine oxidase from Zea mays shoots. Phytochemistry 33:995–998.
20. Elmore, B.O., Bollinger, J.M., et al. (2002a). Ionic strength and its effect on enzyme activity: A study of ion-enzyme interaction in diamine oxidase. Journal of Biological Chemistry.277(47):45420-45425. doi:10.1074/jbc.M206625200.
21. Giebisch, G., & Wang, W. (1996). Potassium transport: From clearance to channels and pumps. Kidney International. 49(6):1624-1631. doi:10.1038/ki.1996.229.
22. Flora, S.J.S., Gupta, D., &Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. Interdisciplinary Toxicology. 5(2):47-58. doi:10.2478/v10102-012-0009-2.
23. Patra, R.C., Rautray, A.K., & Swarup, D. (2011). Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. Veterinary Medicine International. 457327. doi:10.4061/2011/457327.
24. Elmore, B.O., Bollinger, J.A., & Dooley, D.M. (2002b). The effects of heavy metals on enzymatic activity. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 7(6), 565-579. https://doi.org/10.1007/s00775-002-0342-x:contentReference[oaicite:0] {index=0}
25. Siddiqui, M.K.J., Ahamed, M., et al. (2013). Low-level lead exposure: A review of its effects on health and the environment. Environmental Toxicology and Pharmacology. 36(2):198-204. doi: 10.1016/j.etap.2013.02.005.
26. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2012). Biochemistry. 7th ed. W.H. Freeman.
27. Wang, Y., Zhang, T., et al. (2017). Interplay of metabolic pathways in the regulation of enzyme activity. Molecular Systems Biology. 13(4): 853. doi:10.15252/msb.20167443.
28. Wang, J., Zhang, R., et al. (2015). Role of metal ions in enzyme activity: A review. Journal of Inorganic Biochemistry. 152:51-56. doi: 10.1016/j.jib.2015.07.006.
29. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed. Oxford University Press; T.

30. Riley, R.J., & Workman, P. (1992). Inhibition of aldehyde dehydrogenase by paracetamol (acetaminophen) and its role in inhibiting oxidative stress Biochemical Pharmacology, 44(12), 2507-2512.

31. Schwelberger, H.G. (2009). Histamine N-methyltransferase (HNMT) and diamine oxidase (DAO): Key enzymes in histamine metabolism. Inflammation Research. 58(1):3-8. doi:10.1007/s00011-008-0073-2. 27. Wang, Y., Zhang, T., et al. (2017). Interplay of metabolic pathways in the regulation of enzyme activity. Molecular Systems Biology. 13(4): 853. doi:10.15252/msb.20167443.