المجلة العراقية للعلوم

Iraqi Journal of Science

تأثير الرقم الهيدروجيني لتداخلات الالبومين مع النيكوتين-اميد أدنين ثنائي النيوكليوتايد NAD^+ بأستخدام البولاروكراف النبضي التفاضلي

سعد الله توفيق سليمان، ندى إسماعيل يونس

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

الاستلام: 2002/4/9 القبول: 2003/3/2

الملخص

يتضمن البحث دراسة التداخلات بين الالبومين مع النيكوتين-اميد ادنين ثنائي النيوكليوتايد +NAD وذلك من خلال تتبع الانخفاض الناتج في تيار الانتشار (Ip) لموجة اختزال +NAD (والتي تظهر عند جهد -0.88 فولت ضد قطب Ag/AgCl) بوجود (0.0052%) من الالبومين مع الزمن في محلول الفوسفات المنظم عند ارقام هيدروجيلية مختلفة تتراوح بين (4-9.5). وخلال تحليل النتائج لوحظ ان عملية التـرابط تتكون من مرحلتين (بسرعتين مختلفتين) ومن الدرجة الاولى.

وتضمنت الدراسة ايضا حساب ثوابت السرعة k1 و k2 في درجات حرارية مختلفة تتراوح بـين (288-308) درجة مطلقة عند الرقم الهيدروجيني (pH 5.5).

وقد تم حساب طاقة التنشيط ($Ea^{\#}$) وكذلك المتغيرات الثرموداينميكيـة $\Delta H^{\#}$, $\Delta S^{\#}$, $\Delta G^{\#}$ لهـذه العمليـة وتحديد طبيعة الترابط بين الالبومين و +NAD .

Abstract

This research aim to study albumin interaction with NAD^+ This was achieved by following the decreases in the diffusion currant (IP) with time of NAD^+ reduction in the presence of 0.0052% albumin in phosphate buffer at different pH (ranged between 4-9.5).

Upon the analysis of the results. It appeared that the interaction is a first order process consist of two stages (with different rate).

The study also involved calculation of the rate constants K_1 & K_2 at different temperatures that ranged between 288-308 absolute temperature at pH 5.5 .

The activation energy $E a^{\#}$ and the different thermodynamic parameters $\Delta H^{\#}$, $\Delta S^{\#}$, $\Delta G^{\#}$ of this process was calculated and the nature of NAD^+ albumin interaction was determined.

المقدمة

تعد مادة النيكوتين اميد ادنين ثنائي النيكليوتيـد +NAD احدى مرافقات الانزيمات الجزيئية الواطئة الكتلة نسبيا وتكون عادة مستقرة حرارياً وضرورية لمعظـم انزيمـات الاكـسدة الاختـزال (1) (Oxidoreductase) والتـي تـدعى بالديهيدروجينيز (Dehydrogenase) وهناك اكثر من (250) انزيماً من انزيمات الديهيدروجينيز يشترك معهـا +NAD او +NADP (2،3) . ويعتبر +NAD جزء فعال جدا في عملية نقل الالكترونات في السلسلة التنفسية(3).

في الامكان تقدير +NAD طيفيا وذلك من خلال الامتصاص عند طول موجي (nm340) او بولاروكرافيا حيث لوحظ وجود موجة اختزال جيدة جدا عند (0.88-) فولت ضد قطب (Ag/AgCl) تعود الى اختزال +NAD(5) . وقد لاحظنا حديثا (6) خلال قياس انزيم اللاكتيت ديهيدروجينيز (LDH) ان الالبومين الموجود في مصل الدم له تاثير كبير جدا على الخواص البولاروكرافية لـ +NAD حيث يؤدي الى انخفاض تيار الانتشار لحزمة الاختزال بصورة تدريجية.

ومن المعلوم ان الالبومين له قابلية ترابط كبيرة جدا مع العديد من المواد ومن ضمنها العضوية(7)، المضادات الحيوية (8-10) وعدد كبير من ايونات العناصر (11-14). وقد تم حديثا جدا دراسة ارتباط الالبومين مع النيكوتين اميد (NA) بولاروكرافيا(15).

يتضمن هذا البحث دراسة تاثير الرقم الهيدروجيني على التداخلات بين الالبومين مع +NAD باستخدام تقنية البولاروكراف النبضي التفاضلي.

الجزء العملي

تمت القياسات البولاروكرافية باستخدام محلل بولاروكرافي مبرمج من شركة (EG &G) موديل (PAR 384B) مزدو بوحدة قطب الزئبق المتقاطر موديل (A 303) والمسجل العددي (RE 0093 digital power) او (DMP 04-44). تم استخدام الخلية ذات ثلاثة اقطاب، القطب العامل هو قطب الزئبق المتقاطر (DME)، قطب المرجع هو قطب الفضة-كلوريد الفضة (Ag/AgCl, KCl) وقطب البلاتين كقطب ثانوي.

المواد

كافة المواد المستخدمة ذات نقاوة عالية (Anal. reagent grade)، +NAD تم الحصول عليه من شركة فلوكا، وقد تم تحضير محلول (3-10) مولاري في الماء الخالي من الايونات (Deionized water) ويحفظ المحلول داخل ثلاجة ولفترة لاتزيد على (48) ساعة.

البومين مصل الدم (Bovine serum albumin) تم الحصول عليه من شركة فلوكا وتم تحضير (0.1 %) يوميا.

محلول الفوسفيت المنظم (Phosphate buffer) تم تحضيره من مزج كميات معينة من (0.2) مولاري لكل من (NaH2PO4) و (Na2HPO4)(15) .

طريقة العمل

تم تسجيل البولاروكرام النبضي المشتق لمحلول (9.09 x 10-5) مول من +NAD عند الرقم الهيدروجيني (pH 5.5)، سعة النبضة (100) ملي فولت وزمن سقوط القطرة (1) ثانية، ومنها تم حساب تيار الانتشار (Ip).

بعد ذلك تم اضافة (% 0.007) من الالبومين الى خلية القياس وتم تسجيل البولاروكرافات في ازمنة مختلفة من لحظة اضافة الالبومين وذلك للحصول على قيم تيار الانتشار (Ip) في ازمنة مختلفة، وخلال تحليل النتائج لوحظ ان سرعة التداخل بين الالبومين و +NAD كانت من الدرجة الاولى (First order) وقد تم اعادة نفس الطريقة بدرجات حرارية مختلفة (288- 308 K) وذلك لحساب المتغيرات الثرموداينميكية ΔH#, ΔS#, ΔG# لهذه العملية.

النتائج والمناقشة

من خلال الدراسات السابقة لاحظنا(5) بان البولاروكراف النبضي المشتق لمحلول +NAD في محلول الفوسفيت المنظم عند (pH= 8.0) يظهر موجة اختزال جيدة ومستقرة عند جهد (0.88-) فولت ضد قطب الفضة/كلوريد الفضة. ويتناسب تيار موجة الاختزال مع التركيز حسب علاقة الكوفك.

قد بينا حديثا(16) ان موجة اختزال +NAD تتاثر كثيرا بوجود الالبومين حيث ينخفض تيار الانتشار (Ip) تدريجيا مع زيادة تركيز الالبومين واخيرا تختفي كليا عند جهد (0.88-) فولت وفي نفس الوقت لوحظ ظهور موجة جديدة عند جهد اكثر سالبية عند (1.1-) فولت وهذا يعزى الى الترابط بين +NAD مع الالبومين وكان هذا الترابط من الدرجة الاولى وعلى شكل مرحلتين (Two steps) ويتضمن هذا البحث:

1- دراسة تاثير الرقم الهيدروجيني pH على سرعة الترابط:

تم تسجيل البولاروكراف النبضي المشتق لمحلول يحتوي على (5) مل من محلول الفوسفات بارقام هيدروجينية تتراوح بين (pH = 4-9.5) و (0.5) مل من محلول (3-10) مولاري +NAD كلا على انفراد عند سعة نبضة (100) ملي فولت وزمن سقوط القطرة (1) ثانية وهذه البولاروكرامات تمثل المرجع (Blank) قبل اضافة الالبومين عند الزمن (t= 0).

بعد ذلك تم اضافة (% 0.00517) من الالبومين ومباشرة تم تسجيل البولاروكرامات بازمنة مختلفة ومتابعة الانخفاض في تيار الانتشار (Ip) لموجة +NAD والتي تظهر عند

(0.88-) فولت. والنتائج التي تم الحصول عليها تلاحظ في الجدول (1).

وعند رسم العلاقة بين (Log Ip) ضد الزمن تم الحصول على خطوط مستقيمة الشكل (1) ويلاحظ من الشكل (1) ان علاقة السرعة تتكون من مرحلتين (Two step)، المرحلة الاولى، السريعة وبثابت سرعة (k1) والمرحلة الثانية بطيئة جدا وبثابت سرعة (k2). وتلاحظ قيم (k1 و k2) عند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في الجدول (2).

ومن مقارنة النتائج في الجدول (2) يلاحظ ان عملية التداخل بين +NAD والالبومين تتكون من مرحلتين لكافة الارقام الهيدروجينية (4-9.5) وان ثابت السرعة للمرحلة الاولى دائما اسرع بكثير (5-10 مرة) من ثابت السرعة للمرحلة الثانية ومن جهة ثانية لوحظ ان قيم ثوابت السرعة (k1 و k2) تنخفض في البداية مع زيادة الرقم الهيدروجيني لحد (pH = 6.5) ثم تزداد بعد ذلك ثانية.

2- تاثير درجة الحرارة لعملية تداخلات الالبومين مع +NAD عند (pH = 5.5)

ان اختيار الرقم الهيدروجيني (5.5) خلال هذه الدراسة وذلك لاجل مقارنة النتائج مع البحث السابق والذي تضمن تداخلات النيكوتين اميد +NAD مع الالبومين عند الرقم الهيدروجيني (pH 5.5) والتوصل الى الميكانيكية المقترحة لتداخلات +NAD مع الالبومين.

وعليه فقد تم تسجيل البولاروكرام النبضي المشتق لمحلول يتكون من (5) مل من محلول الفوسفات المنظم عند الرقم الهيدروجيني (5.5) و (0.5) مل من محلول (3-10) مولاري من +NAD ثم اضيف الى الخلية مباشرة (0.007%) من الالبومين وتم تسجيل البولاروكرامات بازمنة مختلفة. وقد تم اعادة هذه التجربة بدرجات حرارية مختلفة تتراوح بين (288-308) مطلقة والنتائج التي تم الحصول عليها موضحة في الجدول (3).

وعند رسم العلاقة بين (Log Ip) مقابل الزمن تم الحصول على خطوط مستقيمة وعلى شكل مرحلتين (Two step) لكافة الدرجات الحرارية (الشكل 2) وبسرعتين مختلفتين.

وتلاحظ قيم ثابت السرع (k1 و k2) التي تم الحصول عليها في الجدول (4) وعند رسم العلاقة بين (Log k1) و (Log k2) مقابل مقلوب درجة الحرارة المطلقة تم الحصول خطين مستقيمين كما موضح في الشكل (3) لكلا السرعتين وكانت قيم معامل الارتباط (R) تساوي (0.94) بالنسبة للسرعة الاولى و (0.95) للسرعة الثانية.

ومن قيم الميل تم الحصول على قيم طاقات التنشيط (Ea) وكانت (55.7) و (87.5) (كيلو جول مول-1) لكلا المرحلتين على التوالي.

وباستخدام الطريقة المثبتة في البحث السابق(15) تم حساب قيم المتغيرات الثرموداينميكية للتنشيط #ΔH, #ΔS, #ΔG والنتائج التي تم الحصول عليها موضحة في الجدول (5).

وعند مقارنة قيم المتغيرات الثرموداينميكية لتداخلات الالبومين و +NAD والموضحة في الجدول (5) مع تداخلات الالبومين والنيكوتين اميد (NA) المأخوذة من المرجع(15) نلاحظ بان القيم الثرموداينميكية وخاصة طاقة التنشيط (#Ea) لتداخلات الالبومين مع (NA) والتي تساوي (88.2) (كيلوجول مول-1) مشابهة جدا للمرحلة الثانية من ظاهرة تداخلات الالبومين مع +NAD والتي تساوي (87) كيلوجول مول-1 (الجدول 5) وهذا يعطي دليلا على ان ميكانيكية التداخلات بالنسبة لـ (+NAD) تكون على مرحلتين والمرحلة الثانية مطابقة جدا لتداخلات الالبومين مع النيكوتين اميد وان المرحلة الاولى تعود الى امتزاز (+NAD) على سطح قطب الزئبق والمرحلة الثانية يمثل الترابط بين الالبومين مع (+NAD) على شكل (ايون-ايون) وان القيم السالبة لتغيير الانتروبي (-) ΔS (الجدول 5) تعزى الى ان المعقد الناتج من تداخلات الالبومين مع +NAD اكثر انتظاما من الحالة قبل التنشيط.

الجدول (1): الانخفاض في تيار الانتشار لمحلول (9.09 x 10-5) مولاري +NAD بوجود (0.00517%) من الالبومين عند الارقام الهيدروجينية (4-9.5)

Time	PH					
	4.0	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
	Ip (nA)					
1	221.8	178.3	319.0	309.8	361.5	218
3	141.3	162.2	285.5	250.8	291.8	177.7
6	91.7	108.4	258.6	208.8	231.8	113.6
9	85.5	97.5	246.6	182.0	209.8	90.9
12	81.7	89.8	241.6	151.4	201.8	84.0
15	77.3	81.7	234.5	145.8	194.6	81.3
18	---	83.6	---	142.3	---	76.9

الجدول (2): قيم ثوابت السرع (k1) و (k2) عند أرقام هيدروجينية مختلفة

pH	k1 x 10-3 sec-1	k2 x 10-4 sec-1
4.0	2.896	2.758
5.5	1.369	1.804
6.5	0.686	1.343
7.5	1.081	1.727
8.5	1.465	1.983
9.5	1.893	2.494

الجدول (3): الانخفاض في تيار الانتشار (Ip) لموجة الاختزال (9.09 x 10-5) مولاري +NAD بعد اضافة (0.007 %) من الالبومين عند (288-308) مطلقة وعند (pH 5.5)

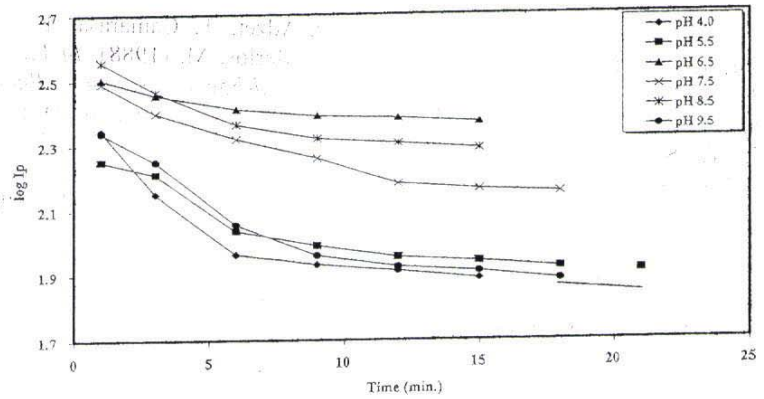
$T\,^{o}K$									
288		293		298		303		308	
Time (min)	Ip (nA)	Time (min)	Ip (nA)	Time (min)	Ip (nA)	Time (min)	Ip (nA)	Time (min)	Ip (nA)
1	277.3	1	215.6	1	375.8	1	136.0	1	145.8
3	260.0	3	185.7	3	298.6	3	125.9	3	98.3
6	244.9	6	147.3	5	263.0	6	101.2	5	85.8
9	247.4	9	132.8	8	262.0	8	99.5	7	82.3
12	246.2	12	128.8	10	260.0	---	---	10	79.6
---	---	14	124.8	---	---	---	---	13	80.4
---	---	17	129.3	---	---	---	---	---	---

الجدول (4): قيم الميل وثوابت السرع الناتجة في حالة اضافة (0.007 %) من الالبومين الى محلول (9.09 x 10-5) مولاري +NAD عند (pH 5.5)

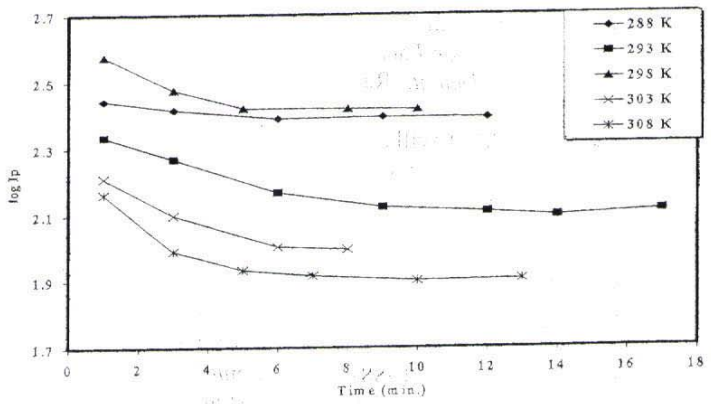
Temp °K	Slop1 x 10-2	k1 x10-3	Slop2x1 0-3	k2 x 10-4
288	1.066	0.409	0.500	0.192
293	2.680	1.028	0.763	0.293
298	3.875	1.485	0.974	0.374
303	4.063	1.559	3.999	1.535
308	5.750	2.207	4.500	1.727

الجدول (5): قيم المتغيرات الثرموداينميكية لتداخلات الالبومين مع +NAD عند (pH 5.5) وبدرجات حرارية مختلفة

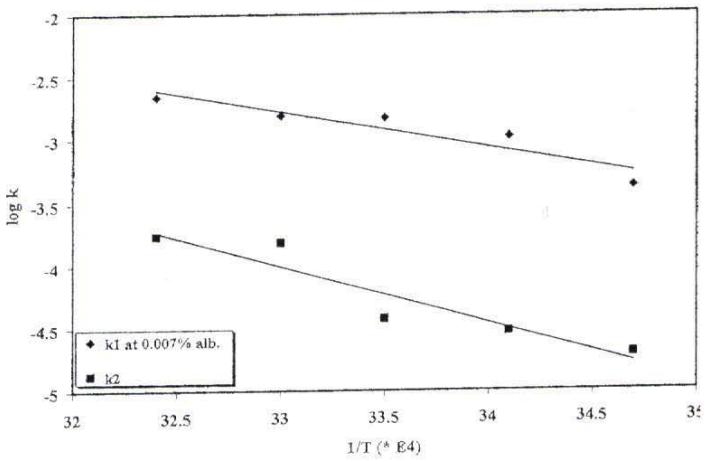
	Temp °K	Ea KJ. mole-1	ΔG# KJ. mole-1	ΔH# KJ. Mole-1	ΔS# J. mole-1 K-1
1	288	55.70	89.13	53.31	-122.9
	293		88.47	53.27	
	298		89.12	53.22	
	303		90.53	53.18	
	308		91.18	53.14	
2	288	87.46	96.46	85.05	-34.161
	293		97.14	85.02	
	298		98.24	84.98	
	303		96.37	84.94	
	308		97.7	84.90	



شكل (1) يوضح العلاقة بين لوغاريتم تيار الانتشار والزمن لموجة (9.09 x 10-5) مولاري +NAD بوجود (0.00517%) من الالبومين عند الارقام الهيدروجينية (4.00, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5)



شكل (2) يوضح الانخفاض في تيار الانتشار لموجة (9.09 x 10-5) مولاري +NAD بعد اضافة (0.007%) من الالبومين عند o(288, 293, 298, 303, 308) مطلقة



شكل (3) يوضح العلاقة بين لوغاريتم قيم ثوابت السرع (k1,k2) ومقلوب درجات الحرارة المطلقة لـ +NAD بوجود (0.007%) من الالبومين عند الرقم الهيدروجيني (pH 5.5)

References:

1. Scrimgeour, K. G. (**1977**). "*Chemistry and Control Enzyme Reactions*", Academic Press New York.
2. Al-Najafi, T. S. (**1987**). "*Biochemistry*", Press of Mosul University, p. 160 (Arabic translation).
3. Stryer, L. (**1996**). "*Biochemistry*", 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York, U. S. A.
4. Hassan, S. S. M. and Rechnitz, G. A. (**1982**). *Anal. Chem.*, 54, 303.
5. Sulaiman, S. T. (**1986**). "*Differential Pulse Polarography as a Tool for the Determination of NAD+ and NADP+ in Aqueous Solution*", Microchem. J., 34, 254-257.
6. Sulaiman, S. T., Al-Najafi, T. S. and Hamdon, H. S., (**1997**), *Differential Pulse Polarographic Method as a Tool for Lactate Dehydrogenase Activity Measurement.* Raf. J. Sci., Vol. 8 pp 32-36.
7. Mazzini, A. Cavatorta, P. Iori, M., Favilla, R. and Sartor, G. (**1992**). "*The binding of 4`-6-diamidino-2-phenylindole to bovine serum albumin*", Biophysical Chemistry, 42, 101-109.
8. Squella, J. A. and Papic, E. (**1986**). *The Chlordiazepoxide-Albumin binding Bioelectrochem. And Bioenerg.*; 16, 471-472.
9. Candy, T. and Sharma, C. P. (**1988**). *Inhibition of platelet adhesion to glow discharge modified surface.*
10. Adzet, T. Camarasa, T. Escubedo, E. and Merlos, M. (**1988**). *In Vitro study of caffeic acid-bovine serum albumin interaction,* European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokineties, 13, 11.
11. Arora, J. P. S., Singh, R. P., Soam, D. Singh, S. P. and Kamar, R. (**1983**). *Binding of Oxovanadium (v) anion to bovine serum albumin, Human Serum Bioelectrochem.* Bioenerg., 10, 441.
12. Arora, J. P. S., Singh, R. P. Soam and Scharma, R. (**1983**). *Comparison of binding of Vanadium (v) with bovine serum albumin and bovine pancreatic trypsin.*, Bioelectrochem. Bioenerg., 10, 57.
13. Chemelik, I. Kadlecek, J. and kalous, V. (**1979**). *Influence of calcium ion on the polarographic behavior of serum albumin,* 99, 245-250.
14. Tanford, C. (**1951**). *The effect of serum albumin on the polarographic current of cadmium*, 73, 2066-2070.
15. Sulaiman, S. T. and N. I. Younis, (**2001**), *Study of the interaction of albumin with nicotinamide by using differential pulse polarography.* Accepted for Puplication at Iraqi J. of Science.
16. Sulaiman S. T. and N. I. Younis (**2001**). *Polarographic studies on the binding of nicotinamide adanine dinucleotide with albumin.* Accepted for representation in the first arabic conference for Chemistry-Applied Science University Amman-Jordan.