

دراسة بولاروغرافية في حساب إستقرارية المعقدات الجزيئية لمرافق الانزيم NADH مع بعض المستقبلات الالكترونية في المحاليل المائية

د. فلاح شريف عبد سهيل
كلية الصيدلة / جامعة الكوفة

رزاق عبد الزهرة إبراهيم
كلية العلوم / جامعة الكوفة

الخلاصة

أن مرافق الانزيم NADH مادة فعالة كهربائياً يمتلك موجتين بولاروغرافية ($+0.244V, +0.464V$) عند قياسه بواسطة قطب قطرة الزئبق المعلقة (HDME) المتضمن التيار النبضي التفاضلي (DPP) في محلول المنظم الفوسفاتي ($pH=7.4$) بدرجة حرارة ($37^{\circ}C$)، ومن خلال القياسات المختلفة تم ضبط الظروف المثلى لقياسه بولاروغرافياً، وعند دراسة تأثير تغير الدالة الحامضية وجد أنها تتناسب عكسياً مع جهد نصف الموجة ($E_{1/2}$) وطردياً مع تيار الانتشار (id). وتبين من بناء منحنى المعايرة القياسي أن دالة للتركيز طبقاً لمعادلة الكوفيك ($id = k C$)، وتم دراسة تكوين المعقدات الجزيئية فوجد أن إضافة (Ub_0) سبب ازاحة جهد مرافق الأنزيم NADH إلى قيمة أعلى بمقدار ($+0.012V$)، أما بقية المواد فقد أزاحته إلى قيمة أقل بمقدار ($-0.007, -0.008, -0.012V$) لكل من (Vit.C, Caff., ATP) على التوالي، ومن حساب (k_r, k_f) وتقدير قيم (K_{eq}) التي تساوي ($3.0, 3.4, 35.3, 0.96$) وقيم (ΔG^0) المساوية إلى ($-2.8, -3.1, -9.1, +0.1$) لكل من ($Vit.C, Caff., ATP, Ub_0$) على التوالي، وجد أن تكوين معقد (ATP) أكثر أستقراراً من بقية المعقدات الجزيئية، بينما معقد (Ub_0) كان الأقل أستقراراً.

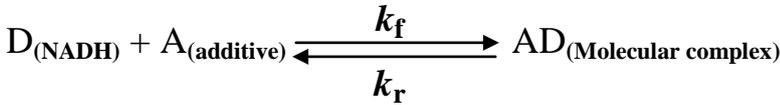
Abstract

Co-enzyme NADH is an electro active material, has two polarographic waves at ($+0.244V, +0.464V$) by (HDME) including (DPP) in $pH = 7.4$ and $T = 37^{\circ}C$, from the different measurements to optimize the ideal conditions for its Polarographic measurement. The acidity function was studied and found it's inversely proportional with ($E_{1/2}$) and directly with (id). The building standard calibration curve is Shown that diffusion current consider as function to concentration according to Ilkovic equation ($id = k C$). The study formation of molecular complexes found that (Ub_0) has shift $E_{1/2}$ of NADH to high value by ($+0.012V$), but the other substances have's shift to less value by ($-0.012, -0.008, -0.007V$) for (ATP, Caff., Vit.C) respectively, from calculation (k_r, k_f) and estimation (K_{eq}) was equal to ($0.96, 35.3, 3.4, 3.0$) as well (ΔG^0) values are ($+0.1, -9.1, -3.1, -2.8$) for

(Ub₀,ATP,Caff.,vit.C) respectively, found (ATP) complex formation is more stable than the other molecular complexes whereas (Ub₀) complex was the less stable .

المقدمة

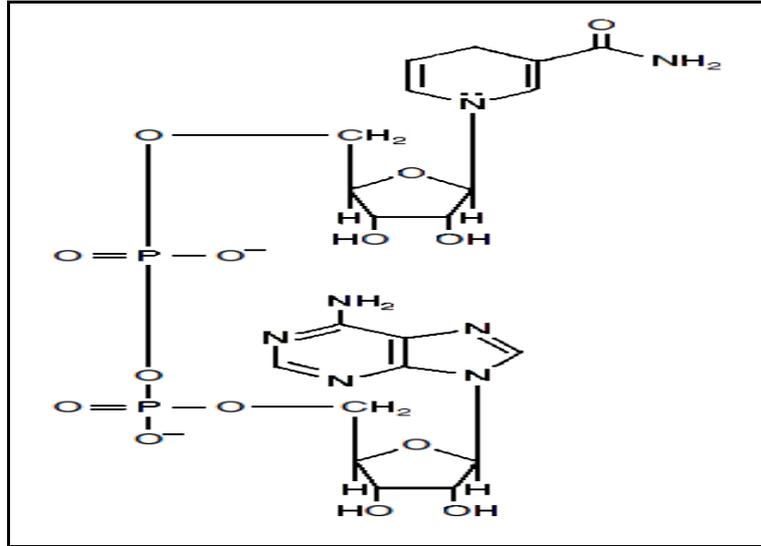
يطلق اصطلاح المعقد (Complex) بصورة عامة على ناتج تآثر (Interaction) ضعيف أو قوي عكسي يحدث بين مكونين أو أكثر⁽¹⁾. لذا فإن التآثرات التي تحصل بين مرافق الانزيم NADH والمواد المضافة تعزى إلى تكوين معقدات بينها تعرف بالمعقدات الجزيئية (Molecular Complexes) تنشأ من ارتباط اثنين أو أكثر من الجزيئات بواسطة قوى فاندر فالز أو القوى الانتشارية (Dispersion Forces) يطلق على أحدها مجازاً "بالعامل المانح للإلكترون (Donor) ويرمز لها بالرمز (D)، والأخرى بالعامل المكتسب للإلكترون (Acceptor) ويرمز لها بالرمز (A) وهذا يعني أن المعقدات الجزيئية تتكون من تآثر مركبات مانحة للإلكترونات ذات جهد تأين واطئ ومركبات أخرى مستقبلة للإلكترونات ذات ألفة إلكترونية عالية^(3,2). وفي أغلب الأحيان تعرف هذه المعقدات بمعقدات الضيف والمضيف (Host-guest Complexes)، ويكون شائع أنها غير مستقرة أو ثابتة لفترة زمنية طويلة بل تبقى في المحلول بشكل متزن مع مركباتها الأخرى^(5,4) كما في معقدات الكوينيهدرون⁽⁶⁾. وبافتراض أن مرافق الانزيم NADH يتآثر بنسبة 100 % مع المواد المضافة، فإنه يمكن تمثيل التآثر الكهروكيميائي الحاصل بينهما بالشكل الآتي :



يلاحظ أن التآثر بين مرافق الانزيم NADH والمواد المضافة عبارة عن تفاعل عكسي متوازن وبذلك فإنه يكتسب أهمية قصوى لأن من خلاله يمكن الربط بين السلوك الحركي للتفاعل والخواص الترموديناميكية^(8,7). ومن الجدير بالذكر، أنه لا يمكن فصل المعقدات الجزيئية في الحالة النقية بل يتم تشخيصها في المحلول فقط بطرائق فيزيائية وأهمها الطريقة الكهروكيميائية⁽⁹⁾. ويخضع تركيز هذه المعقدات الجزيئية إلى ثابت التوازن (K_{eq}) الذي يعتمد على درجة الحرارة ليعطي النسبة بين تركيز المعقد وتركيز أو تراكيز الجزيئات الحرة منه⁽¹⁰⁾. ويعتبر ثابت التوازن المكسب الرئيسي عند دراسة توازن المحاليل (Solution equilibrium)، حيث أن العالم (Niels bjerrum) في عام (1915) أول من اقترح ثم نجح في إثبات أن عملية تكوين المعقد تحدث بشكل تدريجي وتخضع إلى عدة توازنات⁽¹¹⁾.

أن معظم مكونات السلسلة التنفسية عبارة عن بروتينات تحتوي على مجموعة رابطة (Prosthetic group) غير بروتينية تعاني أكسدة واختزال عكسية⁽¹²⁾ ومن ضمنها مرافق الانزيم NADH، الذي يكون عبارة عن جزيئات عضوية معقدة قليلة الوزن الجزيئي مستقرة حرارياً وسهلة الذوبان في الماء تعمل على ربط تفاعلات الأكسدة والاختزال في المسارات الأيضية التأكسدية (Oxidative metabolism pathways)،

في عملية التحلل السكري (Glycolysis)، وكذلك في السلسلة التنفسية التي تحدث في الغشاء الداخلي للميتوكوندريا. حيث أن أغلب عمليات نقل الهيدروجين (أو نقل الإلكترونات) تعتمد على المرافقات الأنزيمية (Co-enzymes) وخاصة تلك الحاوية على النيكوتين أمايد مثل (NADH)، إذ يتم أخذها بمادة أساس متخصصة، أما أكسدها فتتم بواسطة مادة مناسبة مستقبلة للإلكترونات (electrons acceptor). ويمكن بيان الصيغة التركيبية له كالآتي :



الشكل (1) : تركيب النيكوتين أمايد أدنين ثنائي النيوكليوتايد (NADH) (13).

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة

جهاز التحليل البولاروغرافي (797VA Computrace - Metrohm ,Switzerland ,2004)،
 لأجراء القياسات البولاروغرافية، حمام مائي دوار (Julabo-Germany,2005) للتحكم بدرجة الحرارة،
 جهاز تحضير الماء المقطر الاعتيادي (GFL-Germany,2001)، جهاز تحضير الماء اللأيوني (-SG-
 Germany,2001)، جهاز قياس التوصيلة (Cond.720,WTW-Germany,2004)، جهاز (pH
 720,WTW-Germany,2004) وميزان حساس (Mettler Toledo-Switzerland).

المواد المستخدمة و تحضير المحاليل

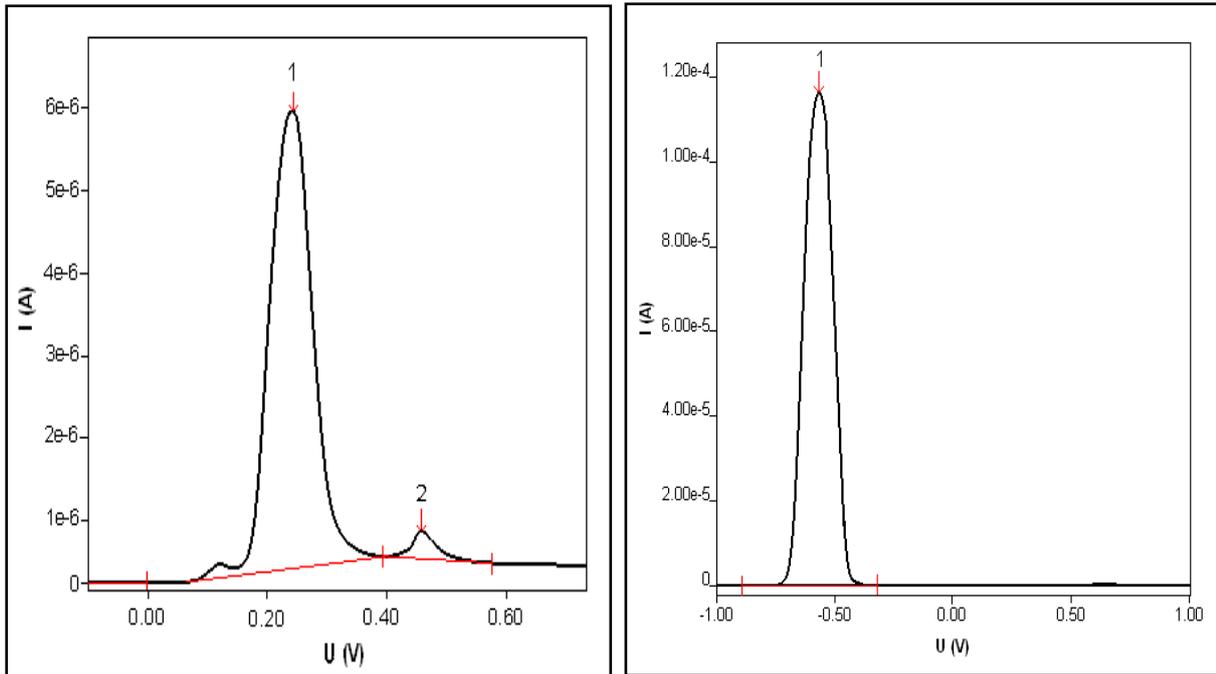
جميع المواد كانت بدرجة عالية من النقاوة (99.9%)، ومجهزة من (Fluka, GCC, and BDH) . وقد تم تحضيرها جميعاً باستخدام الماء اللأيوني عالي النقاوة وكالاتي :

تم تحضير محلول من أيونات (Cd^{2+}) بتركيز $(1 \times 10^{-3} M)$ من كلوريد الكاديوم $(CdCl_2)$ وحضر محلول كلوريد البوتاسيوم بتركيز $(0.1M)$ كألكتروليت ساند (Supporting electrolyte)، وأستخدم كلا المحلولين لغرض معايرة جهاز التحليل البولاروغرافي المستخدم في القياس .

حضر محلول المنظم الفوسفاتي $(PH = 7.4)$ بمزج أحجام معينة من (K_2HPO_4) بتركيز $(0.0662M)$ و (Na_2HPO_4) بتركيز $(0.2M)$ ⁽¹⁴⁾ .

تم تحضير محلول قياسي $(1 \times 10^{-3} M)$ من مرافق الانزيم NADH بإذابة $(0.01908 gm)$ منه بمحلول المنظم الفوسفاتي $(pH = 7.4)$ وحضر منه محاليل مخففة بتركيز تتراوح بين $(2 - 0.02 \times 10^{-4} M)$ لغرض بناء منحني المعايرة القياسي وأجراء القياسات البولاروغرافية المختلفة .

تم تحضير محلول قياسي $(4 \times 10^{-3} M)$ لكل من المستقبلات الالكترونية قيد الدراسة (اليوبيكوينون Ub_0 ، الاديوسين ثلاثي الفوسفات ATP، الكافئين Caff.، حامض الاسكوربيك Vit.C) بمحلول المنظم الفوسفاتي $pH = 7.4$.



طريقة العمل

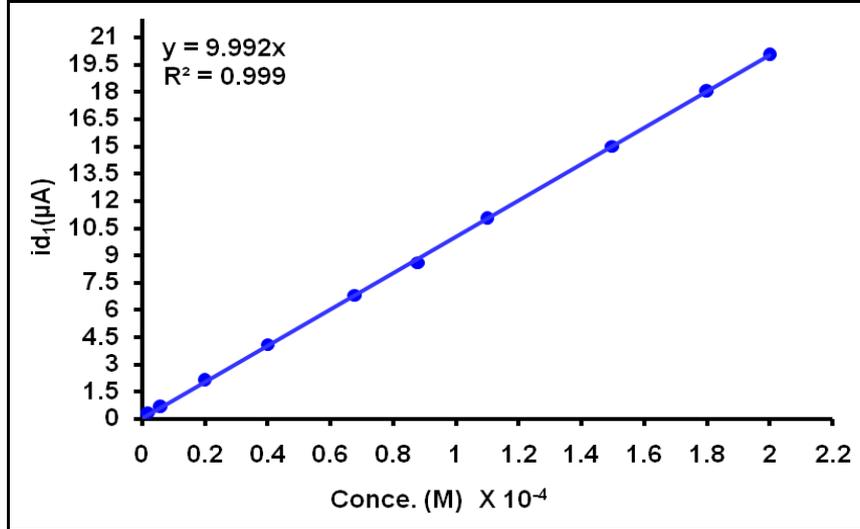
5.0	0.339	0.550	15.44	0.100
5.5	0.315	0.529	17.09	0.161
6.0	0.309	0.529	17.48	0.203
6.5	0.291	0.512	17.96	0.289
7.0	0.262	0.511	21.90	0.455
7.4	0.244	0.464	22.60	0.541
8.0	0.232	0.463	24.40	0.734

يلاحظ من الجدول (1) بأن جهد نصف الموجة حصل له انخفاض بزيادة الدالة الحامضية، وعلى العكس من ذلك فإن تيار الانتشار حصلت له زيادة عند زيادة الدالة الحامضية. وهذا يعني أن الدالة الحامضية تتناسب عكسياً مع جهد نصف الموجة وطردياً مع تيار الانتشار. حيث يلاحظ أنه في الوسط القاعدي تكون عملية الأكسدة أكثر سهولة مما في الوسط الحامضي، وذلك نتيجة لقلّة تركيز أيونات الهيدروجين (H^+) في الوسط القاعدي مقارنة مع وفرتها في الوسط الحامضي. وهذا يفسر تماماً التناسب العكسي بين الدالة الحامضية مع جهد نصف الموجة الأولى والثانية.

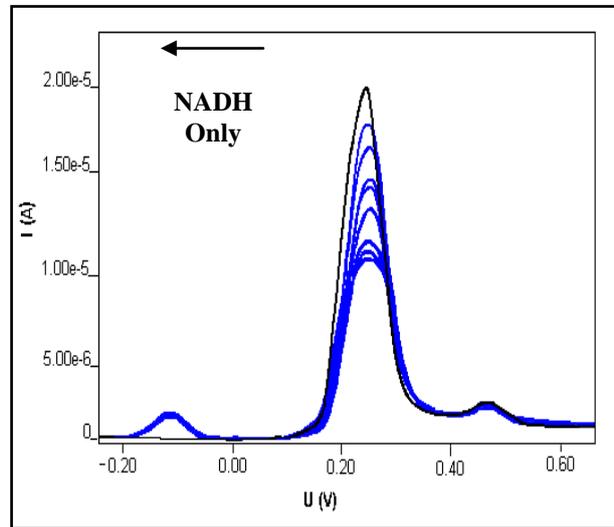
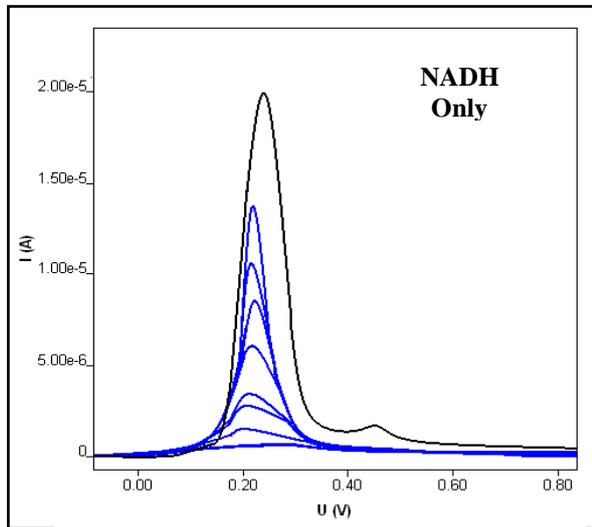
أما بالنسبة للتناسب الطردي بين الدالة الحامضية وتيار الانتشار، يرجع إلى أن مرافق الانزيم NADH في الوسط القاعدي يكون على هيئة تجمعات جزيئية (Molecular Associations) نتيجة لقلّة تركيز أيونات الهيدروجين (H^+)، وهذا يعني أن عدد الجزيئات الواصلة إلى سطح القطب تكون كثيرة مما يؤدي إلى زيادة تيار الانتشار. أما في الوسط الحامضي فإن مرافق الانزيم يكون على هيئة جزيئات أحادية مفردة (Monomers) نتيجة لوفرة أيونات الهيدروجين (H^+) في المحلول قيد الدراسة، وهذا يعني أن عدد الجزيئات الواصلة إلى سطح القطب تكون قليلة مما يؤدي إلى انخفاض تيار الانتشار⁽¹⁶⁾، مع ملاحظة الزيادة العظمى التي تحصل لتيار انتشار الموجة الثانية مقارنةً بتيار انتشار الموجة الأولى.

على هذا الأساس، فإن مرافق الانزيم NADH يتواجد في المحاليل المائية بأكثر من صنف واحد، ونظرياً فإن هذا يحتم ظهور أكثر من موجة بولاروغرافية واحدة⁽¹⁷⁾. ويفسر سبب ظهور موجتين بولاروغرافية في البولاروغرام النبضي التفاضلي [الشكل (3)]، حيث أن الموجة البولاروغرافية الصغيرة (0.464V) تعود إلى التجمعات الجزيئية لمرافق الانزيم والتي تحتاج إلى جهد أعلى لحصول عملية الأكسدة مقارنة مع الموجة البولاروغرافية الكبيرة (0.244V) والعائدة إلى الجزيئات المفردة والتي سيتم اعتمادها في القياسات اللاحقة. وقد أختير الأس الهيدروجيني (7.4) لهذه الدراسة، لأنه يمثل الأس الهيدروجيني لسوائل الجسم، كما أن قيمة التيار عنده تقع ضمن المدى المرتفع للتيار.

بعد ذلك درس تأثير التركيز على تيار الانتشار وجهد نصف الموجة لمرافق الانزيم NADH، لبناء منحنى المعايرة عن طريق قياس البولاروغرام النبضي التفاضلي (DPP) لعدة محاليل قياسية محضرة بتركيزات مختلفة تراوحت بين $(2 - 0.02 \times 10^{-4} \text{ M})$ ، وكما موضح في الشكل الآتي :



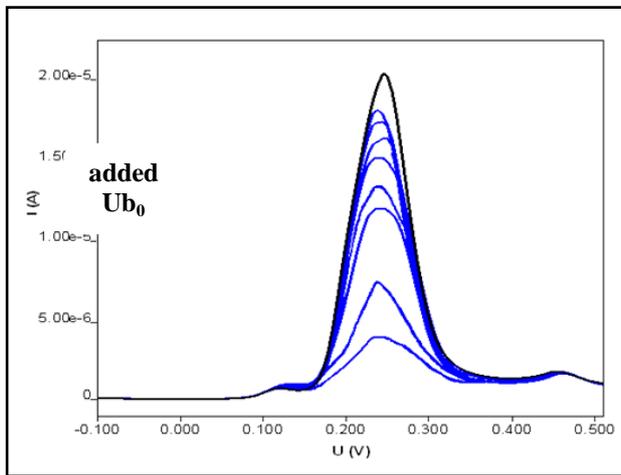
الشكل (4) : منحنى المعايرة القياسي لمرافق الانزيم NADH بعد تثبيت الظروف المثلى لقياسه في $(\text{pH} = 7.4)$ ودرجة حرارة ثابتة (37°C) .



يلاحظ من الشكل (5) أن إضافة Ub_0 لم يغير تيار الانتشار. الشكل (6): تأثير مرافق الانزيم NADH نقطة الأصل و NADH مع Ub_0 . يعني أن تيار Ub_0 مع NADH أعطى دليلاً على أن تيار الانتشار داله للتركيز طبقاً لمعادله الحوفيك $(id = kC)$.

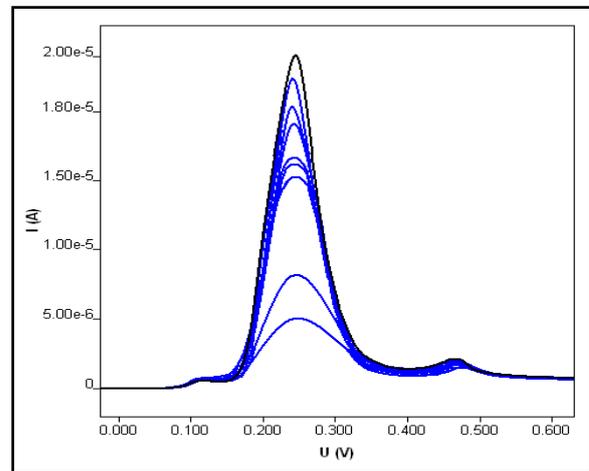
بعد أن تم تثبيت جميع ظروف القياس البولاروغرافي، درس تأثير إضافة بعض المستقبلات الالكترونية $(4 \times 10^{-3} \text{ M})$ على مرافق الانزيم NADH $(4 \times 10^{-4} \text{ M})$ ، فوجد أن إضافة اليوبيكوينون (Ub_0) وهو يمثل

أحد أهم النواقل الالكترونية في السلسلة التنفسية، والذي أثبتت الدراسات أنه مكتسب جيد للالكترونات بسبب الموقع المنخفض لأوطأ مدار جزيئي غير محجوز بالالكترونات (LUMO) له (18). قد أزاحت قيمة جهد إحدى الموجتين البولاروغرافية العائدة الى مرافق الانزيم NADH الى قيمة أعلى من القيمة المقاسة (0.244V) بمقدار (+0.012 V) وكما مبين في الشكل (5)، أما بقية المواد فقد أزاحت الى قيمة أقل بمقدار (- 0.007, - 0.008 , - 0.012 V) لكل من (Vit.C, Caff., ATP) على التوالي، مع بقاء الموجة البولاروغرافية الثانية (0.464V) على حالها بدون تغير لجميع المعقدات الجزيئية باستثناء (ATP) الذي عمل على إختفاءها، وكما مبين أدناه .



الشكل(8): تأثير مرافق

. الانزيم NADH مع Vit.C



الشكل(7) : تأثير مرافق الانزيم

. NADH مع Caff.

يلاحظ من خلال القياسات البولاروغرافية للمعقدات الجزيئية أن جهد نصف موجة مرافق الانزيم NADH ينحرف عن موقعه بقيم مختلفة باختلاف نوع المضاف، حيث إن المواد المضافة (باستثناء اليوبيكوينون Ub_0) عند تأثيرها مع مرافق الأنزيم NADH تعمل على خفض المستوى الطاقى لأوطأ مدار جزيئي غير محجوز بالالكترونات (LUMO) لمرافق الانزيم NADH (والذي يتناسب مع جهد نصف الموجة مباشرة)، وبذلك فإن قيمة جهد مرافق الانزيم NADH سوف تنخفض وذلك نتيجة لوجود علاقة خطية بين

جهد المركبات الهيدروكاربونية غير المشبعة والمستوى الطاقي لأوطأ مدار جزيئي غير محجوز بالإلكترونات في الجزيئة (19).

ومن خلال القياسات المثبتة في الأشكال (5,6,7,8) والتي تبين تأثير مرافق الانزيم NADH والمواد المضافة مع الزمن، يمكن إستخراج تيار الانتشار الشكل المتأثر الناتج ($i_{d_{eq}}$) من خلال قيم الانخفاض التدريجي في قيمة جهد مرافق الانزيم NADH ($i_{d_{rem}}$) عند التوازن وكالاتي :

الجدول (2) : يبين تيار الانتشار لمرافق الانزيم NADH المتأثر ($4 \times 10^{-4} M$) مع المواد المضافة ($4 \times 10^{-3} M$) عند التوازن في الوسط المائي (pH=7.4) و ($37^\circ C$).

NO.	Molecular Complex	$i_{d_{rem}}$ (μA)	$i_{d_{eq}}$ (μA)
1	NADH Only	20.00	-----
2	NADH + Ub ₀	10.20	9.80
3	NADH + ATP	0.55	19.45
4	NADH + Caff.	4.50	15.50
5	NADH + Vit.C	5.00	15.00

أن التأثيرات التي تحصل بين مرافق الانزيم NADH والمواد المضافة عبارة عن تأثيرات معقدة تخضع الى حالة توازن عكسية. ومن خلال الربط بين السلوك الحركي والثرموديناميكي (المعادلة 1,2)، يمكن إستخراج (k_r , k_f) وثابت التوازن (K_{eq}) بالاعتماد على تيار الانتشار بأعباره دالة للتركيز. ويتم الحصول على الطاقة الحرة القياسية (ΔG°) وفقاً لقانون فان-هوف (Vant-Hoff law) وكالاتي (7,8) :

$$\ln i_{d_{eq}} / i_{d_{eq}} - i_{d_x} = (k_f + k_r) t \dots\dots\dots(1)$$

$$K_{eq} = \frac{[Products]}{[Reactants]} = \frac{k_f}{k_r} = \frac{i_{d_{eq}}}{i_{d_0} - i_{d_{eq}}} \dots\dots\dots(2)$$

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K_{eq} \dots\dots\dots(3)$$

الجدول (3) : يبين قيم الطاقة الحرة القياسية وثابت التوازن وثابت السرعة الامامي والعكسي لتكوين للمعقدات الجزيئية في محلول المنظم الفوسفاتي (pH = 7.4) وعند درجة حرارة ($37^\circ C$).

NO.	Molecular Complex	$k_f / 10^3$ ($min.^{-1}$)	$k_r / 10^3$ ($min.^{-1}$)	$K_{eq.}$	ΔG° ($KJ. mole^{-1}$)
1	NADH + Ub ₀	13.7199	14.2800	0.9607	+ 0.10315
2	NADH + ATP	32.0924	0.9075	35.3636	- 9.19442
3	NADH + Caff.	6.8975	2.0025	3.4444	- 3.18910
4	NADH + Vit.C	4.8000	1.6000	3.0000	- 2.83286

يلاحظ من الجدول (3) أن قيم الطاقات الحرة القياسية تكون سالبة (بإستثناء معقد اليوبيكوينون Ub₀) بمعنى أن التأثيرات تزيح نحو تكوين معقدات جزيئية مستقرة بين مرافق الانزيم NADH والمواد المضافة. إذ أنها تبدأ بعمليات فيزيائية (تحرك مادة ما نحو الأخرى) إضافة إلى عمليات توازن بسيطة وصولاً إلى الأنظمة المعقدة (تجمع الجزيئات وتأثرها وتكوين المعقدات جزيئية) وحدث بعض التحولات الجزيئية التي تميز العمليات الكيميائية مثل القوة الدافعة المؤثرة عليها التي من خلالها يميل النظام إلى التحرك من أية حالة إلى أخرى إلى حالة التوازن (equilibrium state) (8,7). وأن أختلاف قيم الطاقات الحرة القياسية للمعقدات الجزيئية المتكونة يعود إلى جملة من العوامل منها اعتماد الطاقة الحرة على درجة الحرارة وعلى ثابت الاتزان وعلى تركيب المحلول (المذاب والمذيب) ونوع التأثيرات الناشئة بين مرافق الانزيم NADH والمواد المضافة وما تحتويه من مجاميع فعالة (20).

نتيجة لما ذكر، فإن المعقد الجزيئي رقم (2) يكون الأسرع توازناً وتكوناً، أما بقية المعقدات فيلاحظ أن قيمة (ΔG°) لها متساوية نسبياً مع الفارق البسيط. ويستثنى من هذا معقد اليوبيكوينون (Ub₀) الذي تكون ألفته الكيميائية نحو التأثير ضعيفة أي أن التأثير سيزاح بالاتجاه المعاكس أكثر مما يزيح بالاتجاه الامامي. وأن تأثير مرافق الانزيم NADH مع اليوبيكوينون (Ub₀) جاء كما متوقع في عدم تلقائية حدوثه (ΔG°) (+ =، حيث أن الـ NADH المختزل في السلسلة التنفسية يتأكسد بدوره بواسطة الفلافوبروتين (metallo flavoprotein enzyme-NADH dehydrogenase)، وأن هذا الانزيم يتضمن معقد بروتين الحديد-الكبريت (Fe-S) والفلافين أحادي النيوكليوتايد (FMN) الذي يرتبط بشدة بالسلسلة التنفسية ويعمل على أمرار المكافئات المختزلة (-H or electrons) إلى اليوبيكوينون (13).

References

المصادر

- 1) Foster D. [1989] : Organic charge transfer complexes . 4th Edition . Academic press, New York .
- 2) Change R. [1990] : Chemistry. 3rd Edition . Mc Graw - Hill, London .
- 3) Mulliken R. S. [1952] : J. physical chemistry. 801, p. 56-65 .
- 4) Lodish H, Berk A. and Kaiser C. [2008] : Molecular Cell Biology 2nd Edition . John Wiley & Sons Ltd., England .
- 5) Cheng J. Zhao L. [2009] : J. Physical chemistry. 113, p. 1650-1659 .
- 6) Christian D. G. [1994] : Analytical chemistry . 5th Edition . John Wiley, New York .
- 7) Huston L. P. [2001] : Chemical Kinetics and Reaction Dynamics . Mc Graw-Hill International , Singapore .
- 8) Avery E. H. [1977] : Basic Reaction Kinetic and Mechanisms . The Macmillan Press Ltd., (U.S.A) .
- 9) Dewar S. J. and Lepely R. [1961] : J. American Society. 83, p. 4560-4573 .
- 10) Ibrahim J. N. [1998] : M.Sc. Thesis, Chemistry Department, Science College Mosul University .
- 11) Bjerrum N. [1980] : J. Chemical Review. 46, p. 381-393 .
- 12) Resmon B. M. [1987] : J. Biochemistry. 56 , p. 24-36 .
- 13) Murray K, Granner K, Mayes A. and Rodwell W. [2003] : Harper's Illustrated Biochemistry . 26th Edition . McGraw-Hill, London .
- 14) Vogel I. A. [1964] : Quantitative In Organic Analysis . 3rd Edition . Longman Group Ltd., London .
- 15) Zutshi K. [2006] : Introduction to Polarography and allied techniques . 2nd Edition . New Age International Ltd., New York .
- 16) Rily T, Watson A. [1987] : Polarography and other Voltammetric method . John Wily& sons, New York .
- 17) Garrido G, Rafols C, Bosch E. [2006] : J. Pharm. Society . 28 , p. 118-127 .
- 18) Al-Khuzzali S, Al-Rafaei M. E. , khalil M. S., and Shanshal M . [1979] : J. Native Fersch . 34 , p. 1003- 1012 .
- 19) Maccoll A. [1949] : J. Nature .63, p. 178 – 189 .

20) Patrick L. G. [2005] : Introduction to medicinal chemistry . 3rd. Edition. Oxford university press, New York .