تنقية أنزيم تحويل الأنجيوتنسين I (ECA I) من رئة الفأر من سلالة Wistar بإستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا : دراسة بيوكيميائية و أنزيمية

مصارحم.، طهراوي ك. ، بوزرنة ن ، بولقودم.ص.
كلية العلوم، جامعة باجي مختار - عنابة

Article Info.

Article history:

Received: 18/11/2024
Revised: 17/04/2025
Accepted: 08/04/2025

الكلمات الدالة : أنزيم تحويل الأنجيوتنسين، التنقية، الكروماتوغرافيا، PAGE-SDS، مواصفات الأنزيم

keywords: Angiotensin - converting enzyme; Purification ; chromatography; PAGE-SDS; Enzyme characterizations

ملخص

يقوم أنزيم تحويل الأنجيوتنسين I أ و Peptidyl dipeptide hydrolase بدور هام في النظام رينين- أنجيوتنسين - ألدوستيرون، و ذلك بتحويل الأنجيوتنسين I إلى مركب فعال و هو الأنجيوتنسينI . الذي يمتلك فعالية كبيرة في تقلص الأوعية الدموية, كما يساهم في تشكل الأنجيوتنسينIII وهو هرمون يحث على إنتاج الألدوسترون بالإضافة إلى أدواره المتعددة الأخرى. ECAI هو جليكوبروتين يتكون من سلسلة ببتيدية واحدة. يضم عنصر الزنك في مركزه الفعال.

يهدف هذا البحث إلى تنقية أنزيم تحويل الأنجيوتنسين I من رئة الفأر Wistar بإستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا من جهة ودراسة خصائصة البيوكيميائية والأنزيمية من جهة أخرى. وذلك أنطلاقا من المستخلص الرئوي : الإستخلاص بإستعمال منظف غير أيوني Nonidet P-40 ثم تطبيق كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على هلامة DEAE - Spherodex M ، كروماتوغرافيا الألفة على هلامة Sepharose وذلك بإستخدام مثبط نوعي للأنزيم (Lisinopril MK-521) مثبت على الهلامة (MK-521/ Sepharose CL-4B) . حيث وصل النشاط الأنزيمي النوعي والمردودية 11.97 U/mg و 214.643 على الترتيب. كما تبين نتائج الهجرة الكهربائية على هلامة الأكريلاميد (PAGE- SDS) وجود شريط واحد مما يدل على نقاوة الأنزيم مع وجود بعض الشوائب. والتي تم التخلص منها بتطبيق تقنية كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العاليHPLC على هلامة Superose 12 حيث أزداد النشاط الأنزيمي النوعي والمردودية وبكيفية معتبرة و بلغ 33.43 U/mg و 596.96 على الترتيب مع ظهور شريط واحد فقط على هلامة الهجرة الكهربائية. تم تقدير تأثير بعض المثبطات على نشاط الأنزيم حيث يمتلك Enalaprilate قدرة تثبيط تفوق بـ 4 مرات قدرة Lisinopril أما EDTA فيمتلك قدرة تثبيط ضعيفة بإعتباره مثبط غير نوعي مقارنة بالمثبطين السابقين. تم تعيين كذلك الوزن الجزيئي للأنزيم والذي بلغ 170000دالتون. بينت هذه الدراسة على إمكانية تنقية أنزيم تحويل الأنجيوتنسين I من رئة الفأر Wistar بإستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا.

Abstract

The angiotensin I - converting enzyme (ACE), or peptidyldipeptide hydrolase (EC. 3.4.15.1), is an enzyme, which plays an important role in the renine- angiotensin- aldosterone system. In other words, this enzyme transfers the angiotensin I to the angiotensin II. The latter has a high capacity and effeteness in the concentration of blood vessels and it contributes in the formation of angiotensin III. Angiotensin II stimulate also the production of aldosterone hormone. In addition, the previous enzyme has a number of other different functions. ECA I is a glycoprotein, contains one peptide chain and zinc element in its active site.

This research aims to purify the angiotensin I-converting enzyme (ACE) from the lungs of Wistar rats using chromatography techniques on one hand, and to study its biochemical and enzymatic properties on the other. Starting from the lung extract : the purification was dependent on the extraction by a nonionic detergent (Nonidet P-40) and the utilization of DEAE- spherodex M in ion exchange chromatography. However, the sepharose was used in the affinity chromatography with lisinopril (MK-521) as a specific inhibitor, which was bounded to the MK-521 sepharose CL-4B. the

result indicates that the specific enzyme activity and the yield was 11.97 u/mg and 214.643 u/mg respectively. On the other hand, the polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (PAGE-SDS) resulted in only a single band, which indicates for the purity of the enzyme and a few contaminants substances. The later can be excluded by the application of HPLC on gel filtration superose 12. In which there was an increase of specific enzyme activity and the yield in considerable quantity : 33.42u/mg and 596.96u/mg respectively and the appearance of one band by the polyacrylamide electrophoresis. In this investigation was also measured the effect of some inhibitors on enzyme activity. The findings indicated also that enalaprilate inhibitor has capacity four times of lisinopril whereas EDTA has a weak inhibition. In other words, EDTA is not a specific an inhibitor. The enzyme presents a molecular weight of 170000.

Corresponding Author: *mmessarahdz@yahoo.fr*

مقدمة

نزيم تحويل الأنجيوتنسين I (ECAI) [E.C3.4.15.1] **أو** Peptidyl dipeptide hydrolase. يسمى كذلك Kininase II **هو عبارة عن** dipeptidyl carboxypeptidase . يتواجد بكميات كبيرة في الخلايا البطانية Endothéliales المكونة للشعيرات الدموية، **وفي قشرة الرئة وكذلك** على مستوى خلايا الأنابيب المجاورة للكلية وبكميات متغيرة في الأنسجة الأخرى [1] . يلعبECA دور كبير في النظام رينين – أنجيوتنسين، حيث يقوم بتحويل الأنجيوتنسين I إلى مركب فعال وهو الأنجيوتنسين II له قدرة كبيرة في تقلص الأوعية الدموية Vasoconstriction [2-5] .

ينقسم أنجيوتنسين I **هو غير نشِط أو فعّال نسبيًا، إلى أجزاء بواسطة إنزيم تحويل الأنجيوتنسين وهناك جزء آخر هو** الأنجيوتنسين II، وهو هرمون شديد الفعالية. يتسبَّب الأنجيوتنسين II بتقلُّص عضلات جدران الشرايين الصغيرة (الشُّرينات) وارتفاع ضغط الدم.كما يقوم أنجيوتنسين II بتنبيه تحرير هرمون الألدوستيرون من الغدّة الكظرية، والفازوبريسين (الهرمون المضاد لإدرار البول) من الغُدَّة النُّخامِيَّة. يؤدي الألدوستيرون Aldosterone**والفا**زوبريسين إلى احتباس الصوديوم (الملح) من قبل الكلى.كما يؤدي الألدوستيرون إلى طرح البوتاسيوم عن طريق الكلى.تؤدي زيادة الصوديوم إلى احتباس الماء، ومن ثمّ زيادة حجم وضغط الدَّم[6-9] .

فأنزيم ECA هو **عبارة عن** جليكوبروتين يضم عنصر Zn++ **في مركزه الفعال** [10-11] .**وبالتالي فإن معرفة تركيب** المركز الفعال للأنزيم يسمح بتركيب مثبطات نوعية تستخدم بشكل واسع في معالجة ارتفاع الضغط الدموي Hypertension، كما يستخدم تقدير نشاط ECA **البلازمي** كدليل على **الإصابة بمرض** Sacroïdose وهو مرض مناعي يسبب نمو التجمعات الدقيقة للخلايا الالتهابية أو الأورام الحُبيبية في أيّ **جزء من الجسم، وفي معظم** الحالات يصيب الرئتين والعقد اللمفاوية لكنه يمكن أن يؤثر أيضًا في العينين والجلد والقلب والأعضاء **الأخرى** [12-15] .

نظرا للدور الهام الذي يقوم به ECA، قمنا بتنقية الأنزيم من رئة الفأر وذلك بهدف معرفة خواصه الفيزيوكيميائية والأنزيمية، فبعد سحق الأنسجة الرئوية والحصول على الهموجينات، تطبق المراحل الكروماتوغرافية بدءا بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني على هلامة DEAE-SpherodexM، كروماتوغرافيا الألفة **على** Sepharose CL- 4B/MK -521 وأخيرا الترشيح الجزيئي على هلامة Superose 12 **في** كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي(HPLC).

I- المواد والطرق المستعملة

I- 1- أستخلاص الأنزيم

استعملت في هذا البحث فئران ذكور من سلالة Albino *Wistar* جلبت من معهد باستور بالجزائر العاصمة، فبعد نزع الرئتين تنظف من الدم والأنسجة الرابطة، وتغسل بكمية مناسبة من NaCl 0.5M ثم تجزأ إلى قطع صغيرة وتوضع في محلول منظم (KH_2PO_4 0.01 M (pH=7.5 **بنسبة** 1g من الرئة. بعدها يطحن مزيج الأنسجة الرئوية في جهاز كهربائي (RHG. RHEMA- LABORTECHNIK). يعالج الخليط المتحصل عليه بمنظف غير أيوني Nonidet P-40 بتركيز 2% **تحت الرج الدائري لمدة** 2 سا ثم يترك المزيج **لمدة** 18**سا على درجة حرارة** 4°C+، يفصل الأنزيم المذاب على البقايا الأخرى عن طريق الترشيح على ورق سليلوزي ثم بواسطة عملية الطرد المركزي (6000 **دورة**/ دقيقة، 30د ، 4°C) . يؤخذ الرائق Surnageant وتجرى عملية التناضح dialyse ضد المحلول المنظم المستخدم في كروماتوغرافيا التبادل الأيوني KH_2PO_4 0.01M (pH=7.5)

I-2- تقدير كمية البروتين

قدرت كمية البروتين باستعمال طريقة (1978) ,.Markwell et al [16] المشتقة من طريقة (1951) ,.Lowry et al [17] والتي تسمح بإزالة التداخلات interferences الكيميائية التي يسببها المنظف Nonidet P- 40 (Merck) المستخدم في إذابة البروتينات الغشائية، يستخدم مصل ألبومين العجل BSA (sigma) في انجاز منحنى المعايرة.

I-3- تقدير نشاط الـECA

أ- طريقة اللمعان الحيوي

المقترحة من طرف (1976) , Friedland and Silverstein [18] حيث يقوم ECA بتحليل المركب HHL (-L- Hippurryl histidyl- L- Leucine) إلى ثنائي الببتيد L-histidyl- L- Leucine و حمض Hippurique الذي يتفاعل مع Orthophtadialdelyde مما يؤدي إلى ظهور اللون الأصفر اللامع (المتألق). تقاس شدة الكثافة الضوئية بإستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية (طول موجة الحث Excitation 365 نانومتر) على جهاز Fluorimètre (Perkin Elmer).

ب- الطريقة السبكتروفوتومترية

وضعت هذه الطريقة من قبل Cushman and Cheng [19] . والتي تم تطويرها من طرف Baudin (1989) [20] ,حيث يعبر على النشاط الأنزيمي لـ ECA بـ (u/ml) وهي تقابل عدد النانومولات من حمض Hippurate المتكونة في الدقيقة على درجة حرارة 37°C و pH= 8.30 لكل 1ml من المحلول الأنزيمي. بعد تقدير النشاط الأنزيمي وكمية البروتين يتم حساب النشاط الأنزيمي النوعي لـECA والذي يعبر عنه بوحدة HHL لكل 1mg بروتين (u/mg).

II- مراحل التنقية: تم تنقية أزيم ECA بإستعمال طريقة (1985) ,.Bull et al [21] والتي تم تعديلها من قبل (1991) ,.Baudin et al [14] . وذلك بإتباع المراحل الآتية:

II-4-1 - كروماتوغرافيا التبادل أليوني على هلامة Spherodex M

استخدمت هلامة DEAE Spherodex M (IBF- Biotechnics) وهو مبادل أنيوني Anion exchange. فبعد موازنة العمود (3 30x cm) بمحلول الفوسفات المنظم 0.01M KH_2 PO_4 وبمعدل سريان مقداره 90ml/h، تمرر العينة على العمود وبعد تثبيتها على الهلامة يغسل العمود الكروماتوغرافي بنسبة 3 أضعاف حجمه بمحلول الفوسفات المنظم ، حتى تصل شدة الامتصاص الضوئي أقل من 0.05 على طول موجة ضوئية 280 نانومتر يشطف الأنزيم باستخدام مدرج خطي من 0 إلى 0.5M من NaCl وبزيادة في معدل السريان إلى 150ml/h ثم تجمع الأجزاء بحجم 25ml لكل جزء، حيث تقدر شدة الامتصاص الضوئي لجميع الأجزاء على طول موجة ضوئية 280 نانومتر. يسجل حجم الجزء الحاوي على أكبر نشاط أنزيمي وتقدر كمية البروتين والنشاط الأنزيمي. مع الملاحظة بأنه يجب الاحتفاظ في كل مرحلة من مراحل التنقية بجزء قليل لإجراء الهجرة الكهربائية.

II-4-2- كروماتوغرافيا الألفة على Sepharose CL- 4B /MK-521

استعملت هلامة Sepharose CL-4B (Pharmacia) وذلك بعد تثبيت مثبط نوعي لأنزيم ECA على الهلامة وهو(MK -521) Lisinopril. وذلك بإتباع المراحل الآتية:

II-4-2-1 - تحضير هلامة Sepharose CL-4B/MK-521

أ- تنشيط هلامة Sephrose CL-4B وتثبيت الذراع

- تغسل 50ml من هلامة Sephrose CL-4B بلتر من الماء المقطر و يضاف 50ml من محلول KBH_4 بتركيز 0.053 M المذاب في البوتاس 0.6 N.

- يضاف وبهدوء50ml من Butanediol diglycidyl ether ويوضع المزيج على درجة حرارة 23°C لمدة 8 سا.

ب- عملية ربط أو تثبيت المثبط النوعي للإنزيم (MK-521) Lisinopril

يغسل المزيج بواسطة 2ml من الماء المقطرأولا ثم باستعمال حجم يتراوح من 50 إلى 100ml من بيكربونات البوتاسيوم 0.3 N (pH=11). توضع الهلامة في حوجلة محكمة الإغلاق. ويضاف إليها 50ml من محلول MK-521 (22mM) المذاب في نفس المحلول المنظم. تترك الهلامة لمدة 72سا على درجة حرارة 37°C+ تحت الرج الهادئ.

جـ - تثبيط مجاميع الـ Epoxy الحرة وحفظ الهلامة

تغسل الهلامة بـ40ml من المحلول المنظم Gly 1 M (pH=10) ثم توضع في حوجلة محكمة الإغلاق، ويضاف إليها 50ml من محلول glycine المنظم. وتترك لمدة 18سا على درجة حرارة 37°C+. يغسل المزيج من جديد بـ450ml من المحلول المنظم (pH=8.0) NaCl 1M، $NaHCO_3$ 0.1 M . تحفظ هلامة الألفة التي تم تحضيرها في 50ml من محلول ملحي على درجة حرارة 4°C+.

II-4-2-2 - تنقية الـ ECA على هلامة Sephrasore Cl-4B/MK-521

يتم موازنة عمود الألفة الحاوي على Sepharose CL-4B/MK-521 بالمحلول المنظم (pH=7.5) Hepes 0,01 M, KCl 0.33, Zn Cl_2 1M في عمود حجمه 20ml (20 x 1.6 cm) وبمعدل سريان 20ml/h، فبعد إجراء عملية التناضح باستخدام محلول الألفة المذكور سابقا، تمرر الأجزاء الغنية بالنشاط الأنزيمي بعد مرحلة التبادل الأيوني على عمود الألفة وبنفس معدل سريان عملية الموازنة.

يغسل العمود بالمحلول المنظم حتى الحصول على شدة امتصاص اقل من 0.01 على طول موجة ضوئية 280 نانومتر، بعد أن يثبت الأنزيم بالمثبط المرتبط بهلامة الـ Sepharose CL-4B يشطف نوعيا وذلك بإضافة مثبط تنافسي لـECA في المحلول المنظم السابق وهو Enalaprilate 1mM وبزيادة معدل السريان إلى 30ml/h. ثم تقدر شدة الامتصاص الضوئي للأجزاء المتحصل عليها على طول موجة ضوئية 280 نانومتر، ثم تجرى عملية

التناضح في وجود المحلول المنظم المتكون من : Tris 0.002 M. NaCl 0.1M. EDTA 0.1mM (pH=8) لمدة 48 سا للأجزاء الغنية بالنشاط الأنزيمي لأجل إزالة المثبط المرتبط بالأنزيم، ثم التناضح باستعمال الماء المقطر لأجل التخلص من EDTA.

تجري عملية Lyophilisation للعينة المتحصل عليها وتطبق كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) في المرحلة الموالية من مراحل التنقية.

II-4-3 - الترشيح الجزيئي في كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) على هلامة Superose 12

تم تطبيق تقنية HPLC على جهاز من نوع Gilson الذي يتكون من: مضخة من نوع 302، كاشف للأشعة فوق البنفسجية (UV) من نوع 111LC ومجمع للأجزاء Collector من نوع 201، حيث استخدمت هلامة Superose12 (pharmacia) يذاب المسحوق الجاف من الأنزيم في اقل كمية ممكنة من المحلول المنظم المتكون من: Tris 0.05 M. NaCl 0.1 M (pH=7) ثم يطرد مركزيا (10.000 دورة /دقيقة ، 10د) و يرشح على مصفاة خاصة ذات ثقوب دقيقة (Millipore). بعد موازنة جهاز الـHPLC بالمحلول المنظم السابق وبمعدل سريان مقداره 0.25ml/h ، يتم حقن المحلول الأنزيمي بحجم مقداره 200µl.

II-4-4 - الهجرة الكهربائية على هلامة البولي أكريلاميد في وجود SDS (PAGE-SDS)

استخدمت طريقة Laemmli (1970) [22]، لأجل معرفة مدى نقاوة الأنزيم في كل مرحلة من مراحل التنقية، وكذلك في تعيين الوزن الجزيئي (MW) باستعمال مجموعة من البروتينات القياسية (Bio-rad): SDS – PAGE molecular weight standards-high، في جهاز الهجرة الكهربائية (Hofer scientific instrements–San fransisco,CA) vertical Slab. Unit model SE 400 المتصل بمولد كهربائي (Rhema labortechnik desaga desatronic x) 5000v/100v.

III - النتائج والمناقشة

يبين الشكل (1) منحنى شطف الأنزيم ECA على هلامة Spherodex M بتطبيق مدروج خطي من NaCl (0-0.5 M). يلاحظ من خلال هذا المنحنى وجود جزء كبير في بداية عملية الشطف (320ml) والذي يضم أكبر قيمة للنشاط الأنزيمي النوعي والتي بلغت 0.543 u/mg. أدى تطبيق تقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني إلى زيادة النشاط الأنزيمي النوعي بحوالي 10 مرات مقارنة بالنشاط الأنزيمي لمستخلص الأنزيم الخام Homogenate حيث ازداد النشاط النوعي من 0.056 u/mg إلى 0.5 u/mg يقابله زيادة في عامل التقنية Facteur de purification من 0.638 إلى 9.70 مرة. مع نقص في المردودية Rendement de purification كما هو مبين في الجدول (1) ، مما يدل على فعالية هده المرحلة في تنقية الأنزيم. يلاحظ توافق في النتائج التي تحصلنا عليها مع نتائج بعض الباحثين، حيث تحصل كل من (1991) ,.Baudin et al [14] على نشاط نوعي لـ ECA رئة الخنزير مقداره 0.22 u/mg وزيادة في عامل التنقية وصل 4.8 مرة بتطبيقهم لنفس مراحل التقنية بينما تحصل كل من (1977) Nishimura et al., [23] على نشاط نوعي مقداره 0.684 u/mg . ودلك من خلال تنقية ECA من رئة الإنسان على هلامة Cellulose M - DEAE وهي قيمة تقارب تلك التي وجدها كل من (1975) ,Das and Soffer [24] التي بلغت 0.42 u/mg بتطبيق نفس المبادل الأيوني. يعود الاختلاف في النتائج التي تحصلنا عليها مع نتائج الأبحاث الأخرى إلى نوع المصدر الأنزيمي المستخدم في تنقية الـECA بالدرجة الأولى وإلى نوع المبادل الأيوني المستخدم.

يوضع الشكل(2) منحنى شطف الأنزيم على هلامة الألفة Sepharose CL- 4B/MK-521. والذي يبين على شطف الأنزيم في جزء واحد فقط، حيث تحصلنا على زيادة كبيرة في قيمة النشاط الأيزيمي والتي بلغت 11.9u/mg مقارنة مع المرحلة السابقة يقابله ارتفاع هام في عامل التنقية الذي بلغ 214,643 مرة وبمردودية 29.971 % (الجدول 1) وهي نتيجة تتوافق نسبيا مع تلك التي توصل إليها كل من (1986) ,.Ehlers et al [25] حيث تحصلوا على نشاط نوعي مقداره 104 u/mg وبعامل تنقية يساوي 347 مرة لأنزيم ECA المنقى من رئة الإنسان،

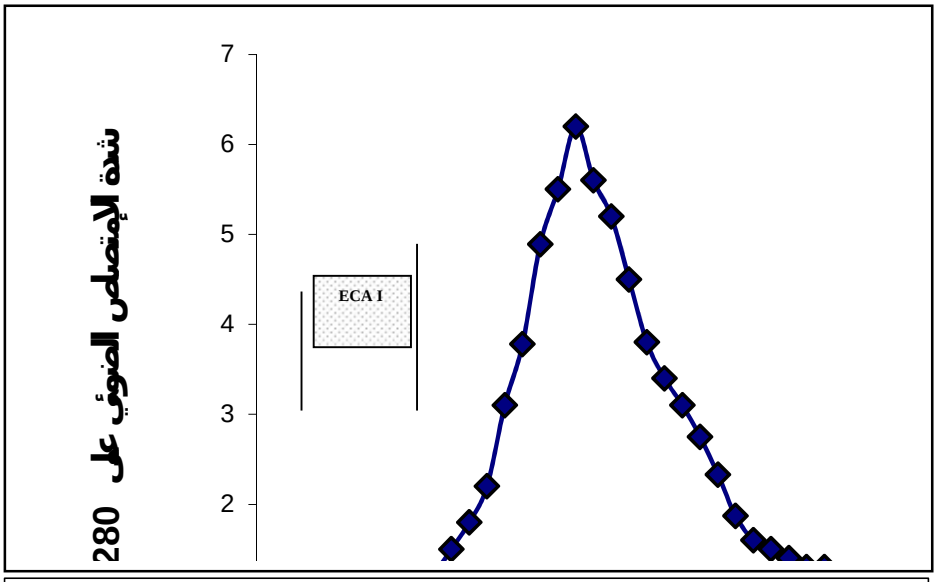
بينما تمكن (1984) ,.Pantoliano et al [26] من التوصل إلى نشاط نوعي مقداره 82u/mg مقابل عامل تنقية يساوي 356 مرة لـ ECA المنقى من رئة الأرنب. غير أن (Sakharov et al., 1987) [27-28] تحصلوا على قيمة قليلة للنشاط النوعي والتي وصلت إلى 38 u/mg بالنسبة لـ ECA قلب الإنسان وعلى 40 u/mg لأنزيم ECA الكبدي البشري

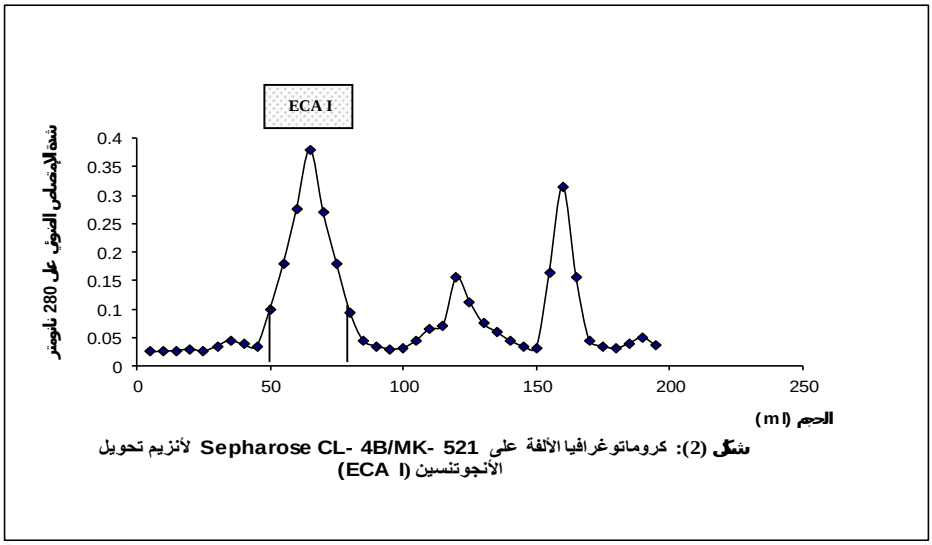
الشكل(3) يوضح منحى كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء(HPLC) على هلامة الترشيح الجزئي Superose 12 لأنزيم ECA. والدي يبين على شطف الأنزيم في جزء (Pic) واحد دقيق ومتناظر بأقصى شدة امتصاص ضوئي له تساوي 0.335 على طول موجة ضوئية 280 نانومتر، حيث بلغ نشاطه النوعي 33.43 u/mg (الجدول 1). وبالتالي حصول زيادة كبيرة في النشاط النوعي مقارنة بالمرحلة السابقة.

يبين **الشكل(4)** الهجرة الكهربائية لأنزيم ECA على هلامة الأكريلاميد في وجود SDS للأجزاء الأنزيمية: يمثل كل جزء مرحلة من مراحل التنقية الثلاثة (مستخلص الأنزيم الخام، التبادل الأيوني، الألفة).

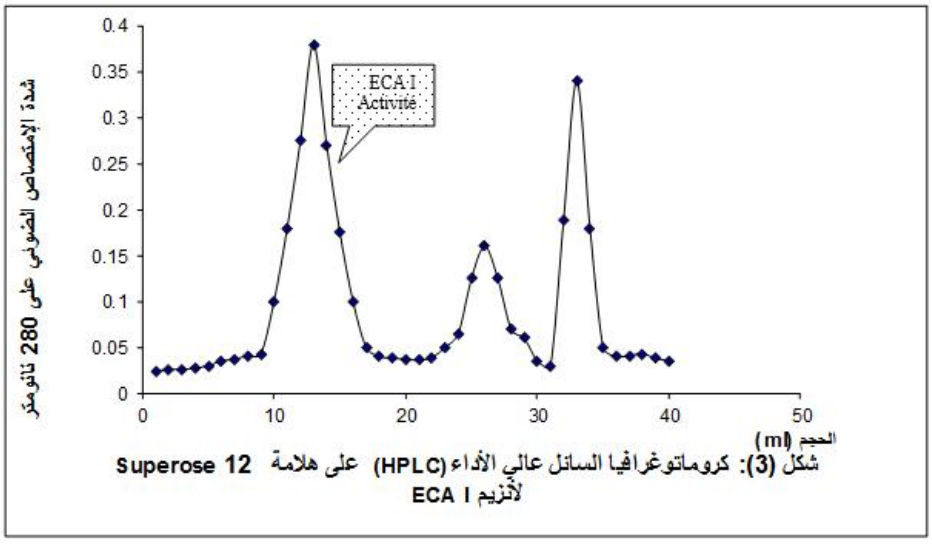
إن النتائج المتحصل عليها مشابهة لنتائج بعض الأبحاث الخاصة بتنقية ECA من الأعضاء الحيوانية المختلفة مع وجود اختلاف طفيف في نتائج عامل التنقية والنشاط النوعي وهذا يعود إلى نوع وكمية المصدر الأنزيمي أولا وإلى المراحل المتبعة في تنقية الأنزيم ثانيا والتي تعتمد أساسا على خواص الأنزيم البيوكيميائية.

يلاحظ ظهور شريط وحيد للأنزيم بعد مرحلة الألفة مع وجود بعض الشوائب الأخرى ، لاسيما البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض والتي تم التخلص منها بتطبيق تقنية HPLC حيث يبين الشكل(5) على ظهور شريط واحد فقط للأنزيم خالي من جميع الشوائب الأخرى. مما يبين نقاوة الأنزيم (تجانس الأنزيم).





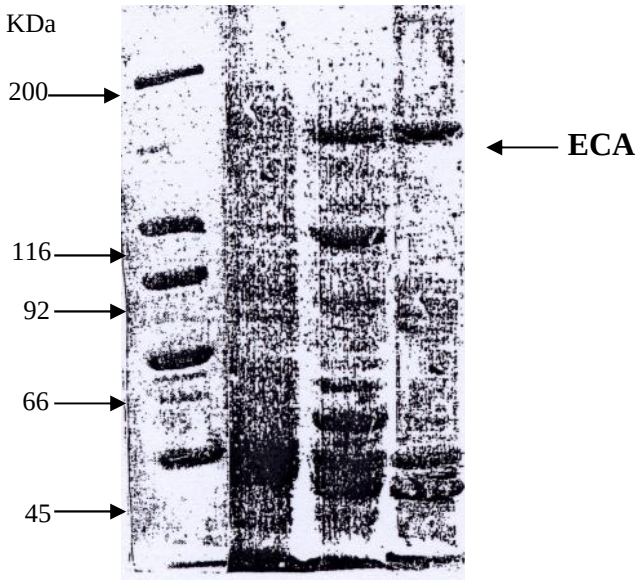
شكل (2): كروماتوغرافيا الألفة على Sepharose CL- 4B/MK- 521 لأنزيم تحويل الأنجوتنسين (ECA I)



شكل (3): كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) على هلامة Superose 12 لأنزيم ECA I

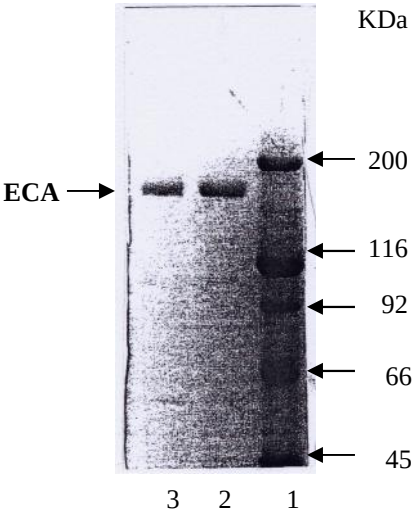
جدول (1) : الصفات البيوكيميائية لأنزيم الأنجيوتنسين I (ECAI) المقى من رئة الفأر (110g)

مراحل التنقيــة	الحجم (ml)	النشاط الكلي (بالوحدات U)	كمية البروتين الكلية (mg)	النشاط الأنزيمي النوعي (U/mg)	عامل التنقية (مرات التنقية)	المردودية (%)
مستخلص الأنزيم الخام	650	62.143	1095.90	0.056	1	-
مستخلص الأنزيم + Nonidet P-40	600	207.70	4513.48	0.036	0,638	100
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على DEAE - Sphérodex M	320	79.26	145.85	0.543	9,70	38.16
كروماتوغرافيا الألفة على Sépharose CL-4B/MK-521	44	62.250	5.20	11.97	214,643	29.971
HPLC على هلامة الترشيح Superose12	-	28.08	0.84	33.43	596,96	13.519



1- بروتينات قياسية (HMW. Bio-rad)
2- مستخلص الأنزيم الخام.
3- مرحلة التبادل الأيوني على DEAE-Sphérodex M
4- مرحلة الألفة على Sépharose CL-4B/MK-521

شكل (4): الهجرة الكهربائية على هلامة البولي أكريلاميد في وجود SDS للأجزاء الغنية بأنزيم ECA I (بعد التلوين بأزرق الكوماسي)

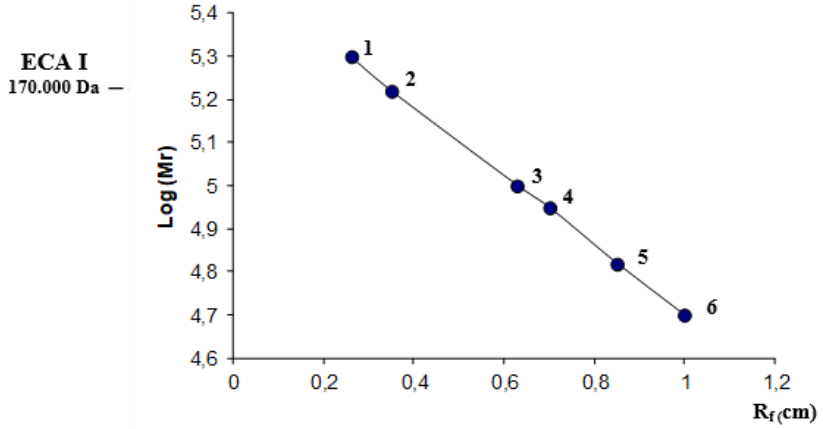


1- بروتينات قياسية (HMW. Bio-rad).
2 - 60µg من ECA.
3 - 50µg من ECA.

شكل (5) : أختبار نقاوة ECA بعد مرحلة الترشيح على هلامة Superose 12 **في الـ**HPLC وتعيين الوزن الجزيئي (Mr) بإستخدام تقنية (PAGE-SDS)**.**

III – 1 - تعيين الوزن الجزيئي لأنزيم ECA

تبين نتائج الهجرة الكهربائية الشكل على الهلامة البولي أكريلاميد (بتركيز 6.5 %) **في وجود الـ** SDS **على** ظهور الأنزيم في شريط واحد فقط حتى في غياب SDS مما يدل بأن الأنزيم يتكون من سلسلة بولي ببتيدية واحدة. إضافة إلى ذلك يتضح بأن عملية النفسخ **أو فقدان** الأنزيم لبنيته الطبيعية Denaturation غير حساسة لاختزال الجسور الكبريتية. ومن خلال نتائج الشكل (5) **و للشكل** (6) يتبين بأن الوزن **الجزيئي** للأنزيم وصل 170000 دالتون وهي نتيجة تتوافق مع تلك التي تحصل عليها Lanzillo and Fanburg (1977) [29] والتي بلغ فيها الوزن الجزيئي للأنزيم رئة **الفأر** 185000 **دالتون**.

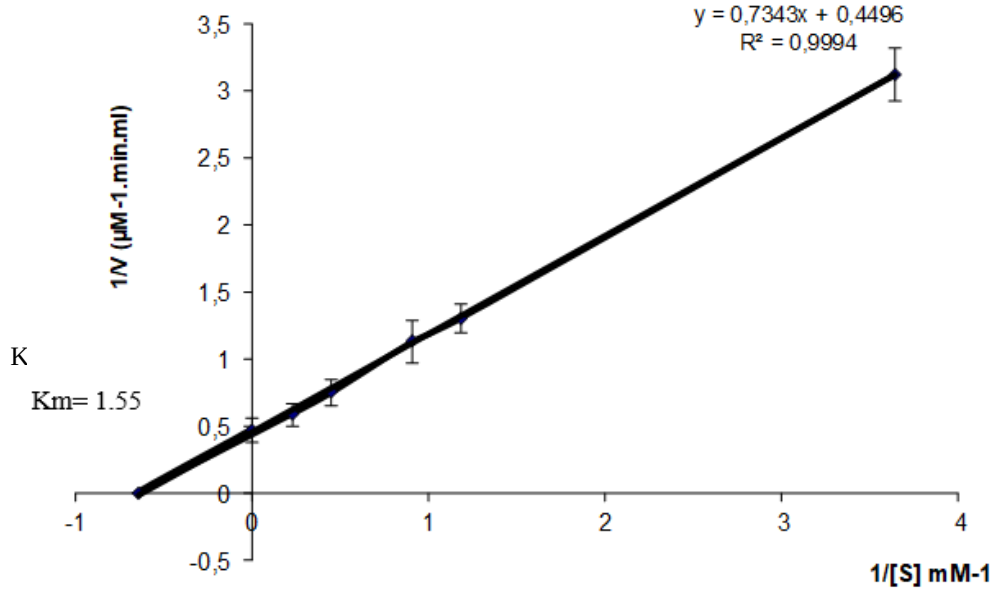


شكل (6) : تعيين الوزن الجزيئي للأنزيم عن طريق PAGE-SDS باستعمال البروتينات القياسية التالية :
1- Myosin, 200000; 2- ECA, 170000; 3 - β-Galactosidase, 116000; 4 - Phosphorylase B, 92000; 5- Serumalbumine, 66000; 6- Ovalbumine, 45000

III- 2- الدراسة الأنزيمية

III– 2- 1 - الدراسة الحركية

يبين الشكل(7) الدراسة الحركية لـECA والذي سمح بتحديد الثوابت الحركية للأنزيم يلاحظ من خلال هدا الشكل بأن ECA يقوم بتحليل الجوهر النوعي المتمثل في HHL بثابت ميخائليس Km و Vmax مقدارهما : 1.55mM و 1.382 µmole $Min^{-1}mg^{-1}$ على الترتيب. **فما تمكن** من تحديد Km و Vmax لـ ECA رئة البقر حيث بلغت 1.3mM وU^{-1}. min^{-1}.1,2mol **على التوالي**. **كل من** Rohrbach et al., (1988) [30] يمكن القول بأن النتيجة المتحصل عليها تتوافق مع نتائج كل من Ehlers et al., (1986) [24] **وكذلك** Das and Soffer, (1975) [25] **مع بعض الاختلافات** في قيمة Km والتي ترجع إلى العديد من العوامل من بينها مصدر الأنزيم، نوع الجوهر (مادة التفاعل) وكذلك نوع وحساسية الطريقة المستعملة في تقدير النشاط الأنزيمي [31].

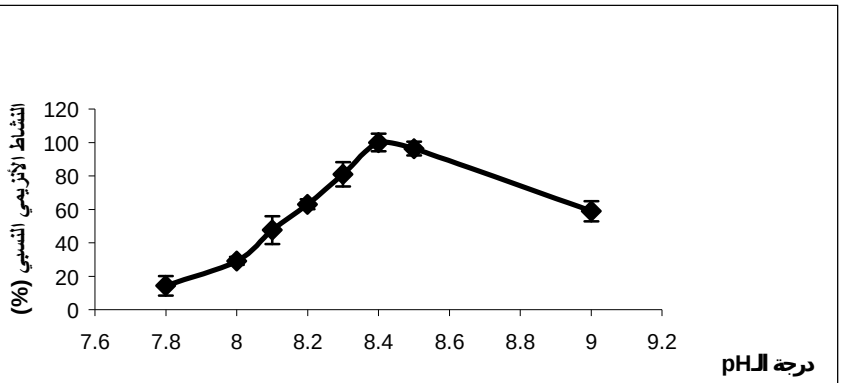


شكل (7): تعيين الثوابت الأنزيمية (Km و Vmax) بإستخدام تمثيل Lineweaver -Burk .

III– 2 – 2 - الظروف المثلى للإماهة الأنزيمية

أ - تأثير درجة الـ PH على الفعالية الأنزيمية

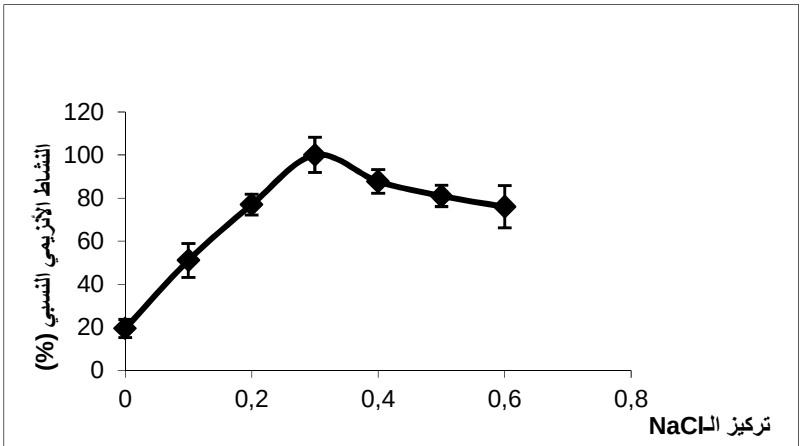
يمثل الشكل (7) فعالية ECA في درجات الـpH المختلفة حيث نلاحظ أنه عند كل درجة pH يبدي الأنزيم قيمة نشاط نسبي متميز وتبلغ أقصى قيمة للنشاط الأنزيمي النسبي (100 %) عند درجة pH تقابل 8.4 وهي درجة الـpH المثلى للأنزيم مما يوافق النتائج المتحصل عليها من قبل العديد من الباحثين لنفس الأنزيم [33,23] .



شكل (8): تأثير درجة الـpH على النشاط الأنزيمي النسبي لأنزيم ECA I

ب – تأثيرتركيز أيونات الكلور على الفعالية الأنزيمية

يزداد النشاط الأنزيمي بزيادة أيونات الكلور حتى يصل إلى أقصى قيمة له (100%) ، والذي يقابل التركيز المثالي لأيونات الكلور 0.3M (الشكل 8). يلاحظ بأن الأنزيم فقد حوالي 80% من نشاطه في غياب هذه الأيونات ، ثم يسترجع نشاطه تدريجيا بزيادة تركيز أيونات الكلور، حيث يعادل النشاط النسبي في وجود 0.2 M من NaCl قيمة مقدارها 77% من النشاط الأنزيمي مقارنة بالتركيز المثالي لأيونات الكلور. مما يدل على أهمية هذه الأيونات في النشاط التحفيزي لأنزيم الـECA [33,32] .



شكل (9): تأثير أيونات الكلور على النشاط الأنزيمي النسبي لأنزيم ECA I

ج – تأثير بعض المثبطات على الفعالية الأنزيمية

يضم الجدول (2) قيم IC-50 و الذي يحسب من العلاقة التالية : (K_i (الحسابي) = IC-50 / (1 + [S]/ K_m). إضافة لقيم كل من K_i الظاهري و K_i الحسابي للمثبطات المدروسة حيث يتضح من خلال النتائج المبينة في الجدول (2) بأن Enalaprilate يمثل المثبط الأكثر فعالية في تثبيط الأنزيم ، لأنه يمتلك أصغر قيمة لـIC-50 و K_i التي بلغت 1.475 nM و 0.92 nM على الترتيب ، ثم يليه Lisinopril بقيمة IC-50 و K_i التي وصلت 5.623 nM و 2.20 nM على الترتيب. مما يتوافق مع نتائج العديد من الأبحاث [34-36] . غير أن لـ EDTA قدرة تثبيط ضعيفة للأنزيم بإعتباره مثبط غير نوعي (مخلب Chélateur للأيونات ثنائية التكافؤ) للأنزيم [37].

جدول (2) : تثبيط نشاط ECA I باستخدام Enalaprilate
تعيين: IC-50 و Ki . EDTA, Lisinopril,

Ki (الظاهري) nM	(الحسابي) Ki nM	IC-50 nM	المثبط
0.92	0.74	1.475	**Enalaprilate**
2.200	2.811	5.623	**Lisinopril**
^{3}10 x300	^{3}10 x340.4	^{5}10x 680.77	**EDTA**

خاتمة

من النتائج الأولية التي تحصلنا عليها فيما يخص تنقية ECA من رئة الفأر باستخدام عدة مراحل كروماتوغرافية متتالية لأجل دراسة بعض الخواص البيوكيميائية، يمكننا أن نستنتج ما يلي:

- إمكانية تنقية كمية معتبرة من إنزيم تحويل الأنجيوتنسين I وذلك بتطبيق المراحل الكروماتوغرافية السابقة: التبادل الأيوني على هلامة DEAE-Spherodex M ، الألفة على Sepharose CL-4B/MK-521 . HPLC على Superose 12.
- بلغت قيمة Km و Vmax قيمة مقدارها 1.55 mM و $1.382\mu mole\ Min^{-1}\ mg^{-1}$ على الترتيب.
- وصل الوزن الجزيئي للإنزيم حوالي 170000 دالتون باستخدام تقنية PAGE-SDS.
- تركيز أيونات الكلور المثلى لـ ECA: 0.3M ودرجة الـ PH المثلى له تساوي 8.40.
- يمتلك المثبط Enalaprilate قدرة تثبيط لنشاط ECA تفوق بحوالي 4 مرات Lisinopril. أما EDTA فيمتلك قدرة تثبيط ضعيفة باعتباره مثبط غير نوعي مقارنة بالمثبطين السابقين.

المراجع

[1]. Baudin B., Zendjabil M., Allouche S., Soudan B., Boutarfa N., Bénéteau-Burnat B., Potestat K., Caussé K., Chaabouni T., Ibrahim F., Taib L. 2020. Dosage de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I sanguine: aide à la validation de méthode. 78, 4.

[2]. Raia J. J., Barone J.A., Byerly W. G., Lacy C. R. 1990. Angiotensin – converting enzyme: A compartive review. *DICP. Ann. Pharmaco. Ther.*, 24, 506 – 526.

[3]. Patel S., Rauf A., Khan H., Abu-Izneid T. 2017. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): the ubiquitous system for homeostasis and pathologies. Biomed Pharmacother 94:317–325.

[4]. Pugliese N.R., Masi S., Taddei S. 2019. The renin-angiotensin-aldosterone system: a crossroad from arterial hypertension to heart failure. Heart Fail Rev 25:31–42.

[5]. Malbos D., Desmoulière A., Faure S. 2022. Le système rénine-angiotensine-aldostéroneThe renin-angiotensin-aldosterone system. Actualités Pharmaceutiques. 61, 619, Pages 43-47.

[6]. Lavoie J.L., Lake-Bruse K.D., Sigmund C.D. 2004. Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule. Am J Physiol Physiol 286: F965–F971.

[7]. Crowley S.D., Gurley S.B., Herrera M.J., Ruiz P., Griffiths R., Kumar A.P., Kim H.S., Smithies O., Le T.H., Coffman T.M. 2006. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. Proc Natl Acad Sci 103:17985–17990.

[8]. Lerman L.O., Kurtz T.W., Touyz R.M. 2019. Animal models of hypertension: a Scientific Statement from the American Heart Association. Hypertension 73(6): e87–e120.

[9]. Zushima K., Morisawa N., Tamura K., Nishiyama A. 2020. Recent research advances in renin-angiotensin-aldosterone system receptors. Curr Hypertens Rep 22.

[10]. Natesh R., Schwager S.L.U., Sturrock E.D., Acharya K.R. 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. Nature 421:551–554.

[11]. Bernstein K.E., Shen X.Z., Gonzalez-Villalobos R.A. 2011. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). Curr Opin Pharmacol 11 :105–111.

[12]. Conrad A. K., Rohbach M. S. 1987. An in vitro model for the induction of Angiotensin – converting enzyme in sarcoïdosis. Evidence for a soluble angiotensin – converting enzyme-inducing factor. Ann. Rev. Resp. Dis., 135, 396 – 400.

[13].Drapeau G., Chow A., Wrd P.E. 1991. Metabolism of bradykinin analogs by angiotensin – converting enzyme and carboxypeptidase N. *peptides*, 12, 631 – 638.

[14].Baudin B., Tahraoui A., Baumann F. C., Robic D., Drouet L., Legrand Y. 1991. Purification and analysis of lung and plasma angiotensin – converting enzyme by high performance liquid chromatography. *Protein. Exp. Purif*., 2, 421 – 419.

[15]. Szczepanska-Sadowska E., Czarzasta K., Cudnoch-Jedrzejewska A. 2018. Dysregulation of the renin-angiotensin system and the vasopressinergic system interactions in cardiovascular disorders. Curr Hypertens Rep 20:19.

[16]. Markwell M. M., Haa S. M., Bieber L. L., Tobert N. E. 1978. A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Annal. Biochim.,* 87, 206 – 210.

[17]. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farra A. L., Randall E. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 87, 26555 – 275.

[18]. Friedland J., Silverstein A. 1976. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin – converting enzyme. *Annal, Med., J., Clin.,Pathol.*, 66, 116 – 124.

[19]. Cushman D. W., Cheung H. S. 1971. Spectophotometric assay properties of angiotensin – converting enzyme rabbit lung. *Biochem. Pharmaco.*, 20, 1637 – 1648.

[20]. Baudin B. 1989. L'enzyme de conversion de l'angiotensine I endothéliale : Biochimie, biologie cellulaire et application à la pathologie. *Thèse de doctorat d'Etat ès – sciences pharmaceutiques.* Université Paris V, René Descartes, 156-160, 89501.

[21]. Bull H. G., Thornberry N. A., Cordes E. H. 1985. Purification of angiotensin – converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography. *Annal. Biochem*.260, 5, 2963 – 3972.

[22]. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the heard of bacteriophage T_4. *Nature*, 227, 680 – 685.

[23]. Nishimura K., Yoshida N., Hiwada K., Ueda E., Kikuyu T.1977. Purification of angiotensin – converting enzyme from human lung. *Biochem. Biophys Acta*, 483, 398 - 408

[24]. Ehlers M. R. W., Dennis L. M., Ralph E. K. 1986. Rapid affinity chromatography purification of human lung and kidney angiotensin – converting enzyme with the novel N – carboxyl alkyl dipeptide inhibitor, N -][1 (S) – carboxy - 5 – amino pentyl] glycyl glycine. *Bioch. Biophys. Acta*, 883, 361 – 372.

[25]. Das M., Soffer R. L. 1975. Pulmonary angiotensin – converting enzyme structural and catalytic properties. *J. Bil. Chem.*, 250, 6762 – 6728.

[26]. Pantoliano M. W., Holmquist B., Riordan J. F. 1984. Affinity chromatography purification of angiotensin – converting enzyme. *Bioch.* 23, 1037 – 1042.

[27]. Sakharov I. Y., Danilov S. M., Dukhanina E. A. 1987. Affinity chromatography and some properties of angiotensin – converting enzyme from human heart. *Biochem. Biophys. Acta*, 923, 143 – 149.

[28]. Sakharov I. Y., Danilov S. M., Sukharov N. V. 1987. Isolation of human liver angiotensin – converting enzyme by chromatofocusing. Anal. Biochem., 166, 14 – 17.

[29]. Lanzillo J. J., Fanberg B. L. 1977. Low molecular weight angiotensin – converting enzyme from rat lung. *Biochem. Biophys. Acta*, 411, 339 – 344.

[30]. Rorbach M. S., Brady W. E., Rolstad J., Rolstad R. A. 1981. Purification and substrate specificity of bovine angiotensin – converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 256, 225 – 230.

[31]. Yamaguchi T., Sekine M., Kizuki K., Moriya H. 1985. Enzymological properties of rat testicular angiotensin – converting enzyme. Comparaison with rat pulmonary enzyme. *Yakukazu Z.*, 105, 5, 491 – 489.

[32].Bunning P., Riordan J. F. 1983. Activation of angiotensin – converting enzyme by monovalent anions. *Biochemistry*, 22, 110 – 116.

[33]. Shapiro R., Holquist B., Riordan J. F. 1983. Anion activation of angiotensin converting enzyme: Dependence on nature of substrate. *Biochem.*, 22, 3850 – 3857.

[34]. Chen G. W., Tsai J-S., Pan P.S. 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. International. *Dairy Journal*, 17, 641–647.

[35]. Ondetti M. A., Cushman D. W. 1984. Angiotensin – converting enzyme. Inhibitors: Biochemical properties and biological action. *C.R.C. Biochim.*, 16, 4, 381 – 411.

[36]. Cheung Y. G., Prusoff W. H. 1973. Relationship between the inhibition constant (Ki) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC- 50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol*, 22, 3099 – 31088.

[37]. Messarah M Tahraoui A., Baudin B. 1993. Purification de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I de poumon de rat. Analyse biochimique et enzymologique. *XI^{ème} congrès vétérinaire maghrébin, Tunis, 11/13 nov 1993.*