

الباب الثاني عشر

مبطلات الإنزيم العكسية والغير عكسية

وحركية تثبيط الإنزيم

مثبطات الإنزيم العكسية والغير عكسية

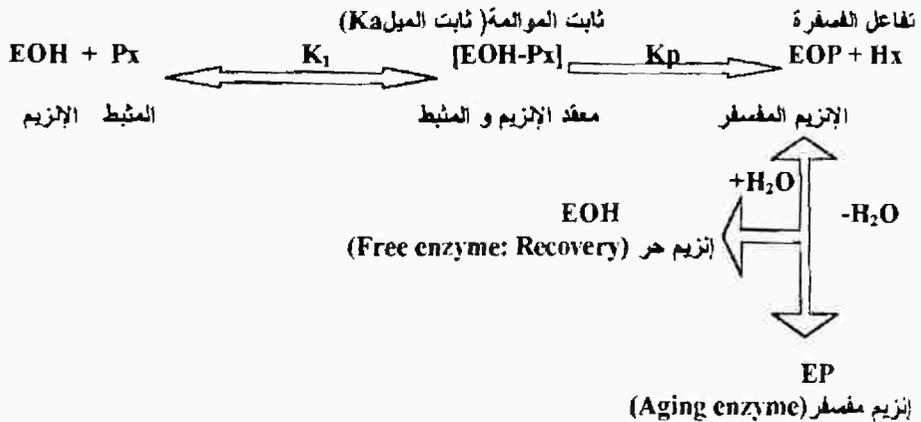
(Reversible & Irreversible Enzyme Inhibitors)

كما سبق نجد أن جزئيات بعض السموم الفوسفورية العضوية (كذلك بعض السموم الكرباماتية العضوية كما سيأتي ايضاحها بعد) كذلك جزئيات السموم والملوثات البيئية المحتوية على ذرة موجبة الشحنة تعد مواد تفاعل (Substrates) للإنزيم إلا أن جزئيات السموم الفوسفورية والكرباماتية تعد مواد تفاعل سيئة للإنزيم وهو ما يرجع لمعدل ثابت تفاعل إزالة الفسفرة (Dephosphorylation constant) المنخفض والمعبر عن معدل إزالة الفسفرة وهو ما يجعلها قادره على طي (Tie up) جزئى الإنزيم .

وكما سبق يمكن القول بأن أفراد عائلات هذه المجموعة من السموم تسبب عمليه تثبيط عكسية والبعض الآخر يسبب عملية تثبيط غير عكسية للإنزيم تبعاً للتركيب الكيميائي والبنائي والفراغي لجزئى المركب :

١- عملية التثبيط العكسية للإنزيم (Reversible inhibition)

حيث تكون عملية التثبيط عكسية نتيجة حدوث تثبيط تنافسي (Competitive inhibition) وهنا يتمكن جزئى الإنزيم المثبط المفسفر أو المكربم من إستعادة نشاطه مرة أخرى (Recovery) حيث تتكسر الرابطة الغير تعاونيه (Non covalent bond) المتكونة فى معقد الإنزيم والمثبط (المعقد العكسي (Reversible enzyme substrate))



أما المثبطات العكسية والمحتوية على مجموعة نيتروجين موجبة الشحنة تتصل بالموقع الأنوني السالب الشحنة بالإنزيم بواسطة حجم قوى كولمب وقوى فان در فالس .

فالتثبيط العكسي للإنزيم يكون على الأقل في جزء محتمل يمثل الموقع الأنوني مما يشير إلى أن المثبطات العكسية ما هي إلا مركبات غير مستقطبة (Non polarized) بروتونية مثل أيونات إيثيل أمين تتراميثيل أمونيوم و مركب د. تيوبوكيورارين وأحسنها الأمينات الثلاثية (Tertiary amines) أو الأمينات الرباعية (Quaternary ammonium) فالأمينات الأولية والثانوية ليست مثبطات جيدة حيث تفقد مجاميع الألكيل بها يؤدي لنقص المساهمة بجزء كبير من طاقة ربط الجزئي المثبط بالموقع الأنوني لجزئي الإنزيم .

ومن أحسن هذه المركبات تثبيط المركبات المحتوية منها بجانب مجموعة النيتروجين الموجبة على مجاميع أروماتية تبلغ قوة ارتباطها بالإنزيم ١٢٢ ضعف ميثيل تراي أمونيوم ، جدول رقم (١٢-١) .

أما المركبات الرباعية المتماثلة مثل ديكاميثونيم (Decamethonium) وهي المسئولة عن سمية مركب د. تيوبوكيورارين كسم عصبي فعندما تكون عدد ذرات الكربون $n = 10 - 12$ ذرة كربون فإن تثبيط الإنزيم يصل أقصاه ، أما السلسلة المستقيمة من البولي ميثيلين (Poly methylene) حيث المسافة بين مجموعتي النيتروجين ١٤-١٥ أنجستروم وهي نفس مسافة مركب د. تيوبوكيورارين والتي تجعل جهد سمية المثبط عالي .

وتبلغ قوة النيتروجين في الحلقات المشبعة التركيب والتي لها نفس عدد ذرات الأمينات الأليفاتية ويمكنها إعطاء بروتون عند تركيز أس أيون هيدروجين يساوي ٨ وطالما أن النيتروجين الثلاثي بالحلقات الغير مشبعة (N-pyridine) مركبات غير بروتونية قوية عند تركيز أس أيون هيدروجين يساوي $V = 7$ ولا يحتوى على شحنة لذا فهي مثبطات ضعيفة .

وقد يتحول المعقد العكسي لمعقد آخر هو (E') وهو معقد مرتبط اشتراكيا بقوة ثابتة (Stable covalently) وثباتها ما هو إلا غير عكسي والذي بدوره يتحول لمعقد آخر هو (E) والذي ينهار ببطء وينفرد الإنزيم مرة أخرى .

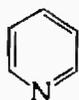
جدول رقم (١٢-١): قيم ثابت الارتباط للإنزيم الحر (K_i) و (K_a) للإنزيم
المأسئل لمثبطات عكسية

K _i (M)	K _a (M)	Inhibitor
6.3 × 10 ⁻²	1.1 × 10 ⁻⁴	<chem>CN(C)C</chem>
6.3 × 10 ⁻²	1.1 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)C</chem>
2.6 × 10 ⁻²	3.2 × 10 ⁻²	<chem>CN(C)C</chem>
4.8 × 10 ⁻²	4.0 × 10 ⁻²	<chem>CN(C)C</chem>
2.8 × 10 ⁻¹	2.0 × 10 ⁻²	<chem>CN(C)C</chem> (TMA)
1.3 × 10 ⁻¹	6.3 × 10 ⁻²	<chem>CN(C)CCO</chem>
3.7 × 10 ⁻¹	3.6 × 10 ⁻²	<chem>CN(C)CCO</chem>
1.85 × 10 ⁻¹	4.3 × 10 ⁻²	<chem>CN(C)CCl</chem>
1.2 × 10 ⁻¹	7.6 × 10 ⁻²	<chem>CN(C)C</chem> (TEA)
1.2 × 10 ⁻¹	2.0 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)C</chem>
6.7 × 10 ⁻¹	1.4 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)C</chem>
3.8 × 10 ⁻¹	9.0 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)C</chem>
5.3 × 10 ⁻¹	2.0 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)C</chem>
7.7 × 10 ⁻¹	5.7 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)c1ccccc1</chem> (TMA)
6.3 × 10 ⁻¹	1.4 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)c1ccc(O)cc1</chem>
5.8 × 10 ⁻¹	1.3 × 10 ⁻¹	<chem>CN(C)C[N+](C)(C)C</chem> (decamethonium)
5.2 × 10 ⁻¹	—	<chem>CN1C=CC=CC1</chem> <chem>CN1C=CC=CC1</chem> <chem>CN1C=CC=CC1</chem> — (CH ₂) ₆ — <chem>CN1C=CC=CC1</chem>
4.0 × 10 ⁻¹	—	<chem>CN1C2CC3CC4C2(C1)C(O)C(=O)C4</chem> (atropine)

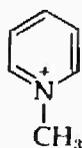
* K_i measures binding to free enzyme; K_a measures binding to the acylated enzyme.



وجزيئات أفراد هذه المجموعة من المركبات ذات السمية العالية والمؤدية مباشرة للموت ترجع سميتها العالية لا للتثبيط العالي العكسي الحادث ولكن ترجع لإعاقتها أو سد (Blocking) مستقبل الكولين بعدد من الخلايا العصبية المحركة مثل مركب د. نيوبوكيورارين :

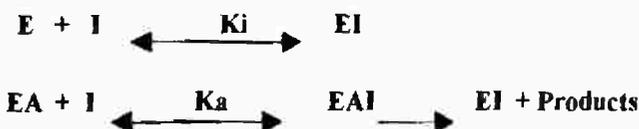


Pyridine

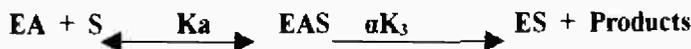


Methylpyridinium

أما النتروجين الرباعي بالحلقات الغير مشبعة (ميثيل بيريدينيوم methyl pyridinium) فهي مثبطات جيدة وبالرجوع لحركية التثبيط العكسي والمثبطات العكسية والتي تدرس تجلط المثبط مع مادة التفاعل ثم قياس سرعه التفاعل حيث يرتبط المثبط مع الإنزيم الحر كما بالمعادلة التالية :



كما يمكن وأن ترتبط EA ويكون EAI ويتم التفاعل عند تراكيزات عالية من مادة التفاعل وتفاعل الإضافة التالي يمكن أن يحدث إذا ما كانت مادة التفاعل إستر الكولين :



حيث ES قليله وتهمل وتعنى أن K_s تكون كبيرة جداً والتثبيط العكسى وفى وجود مادة التفاعل وتحت الظروف الثابتة (Stedy state) فإن :

$$V = \frac{v[1 + [I]/K_i]}{[1 + K_m/[S][1 + 1/k_i] + [S]/K_a + [I/K_{ai}] + [K_m/K_s]}$$

حيث يلاحظ من المعادلة أنه عند تركيزات عالية من مادة التفاعل فإن التفاعل لتكوين (EI) قليل جدا ويهمل طالما أن تركيز الإنزيم الحر منخفض وقيمة $[I/K_{ai}]$ يمكن تجاهلها فإذا كانت مادة التفاعل ضعيفة مثل الفينيل أستيات فإن معقد [EAS] لا يتكون كما بالجدول السابق .

وبمقارنة قيمة k_i وقيمة K_{ai} بالجدول السابق والتى تشير إلى أن الارتباط للمثبط العكسى بالإنزيم الحر غالبا ما يكون مختلف معنويا عن الارتباط بالإنزيم المأسئل وعليه فالمثبطات غير العكسية ومواد التفاعل تتفاعل بنفس الميكانيكة (تثبيط عكسى) والذى يمكن أن يحدث خلال التثبيط الغير عكسى فى حالة تكوين مماكن كما سبق وصفه وهنا سوف تختلف معادلة الحركية بعض الشيء عما سبق شرحه .

٢- عملية التثبيط الغير عكسية : المثبطات الغير عكسية (Irreversible inhibitors)

تتفاعل جزيئات السموم الفوسفورية بنفس الآلية التى يتفاعل بها إنزيم الأسيثيل كولين استيريز مع مادة تفاعله ولكن كينيتيكية التفاعل تختلف لأن الإنزيم المثبط ليس متجدد (not regenerated) خلال الدقائق أو الساعات الأولى فيأخذ التفاعل وقت طويل نسبيا قبل مرحلة الحالة الثابتة وإستعادة الإنزيم حرا من المعقد المكربم تكون غالبا أسرع من الإنزيم المفسفر لدرجة تسمح للوصول للحالة الثابتة بالكربامات قبل الفوسفات ولكن نجد أن المعلومات المتحصل عليها تحت ظروف الحالة الثابتة لا تصف قوة التثبيط (Inhibitory power) والمعتمدة على المعدل الذى عنده يتكون المعقد والمثبط وعلى درجة ثباته .

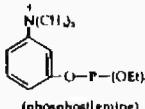
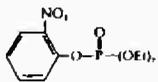
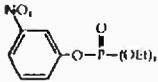
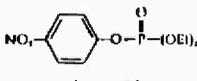
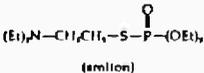
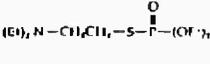
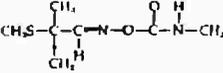
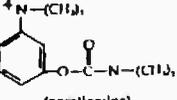
ويقاس معدل تكوين المعقد خلال الفترة الأولية من التفاعل وقبل بدء حدوث الحالة الثابتة ، أما معدل الاستعادة (Regeneration) فغالباً ما تقاس بإزالة أو تخفيف المثبط وبواسطة تعقد الأنزيم الحر مع مادة التفاعل لأجل تثبيط لاحق يقف تأثيره وهنا يقاس معدل الاستعادة غي غياب أى مثبطات لاحقة ، جدول رقم (١٢-٢) .

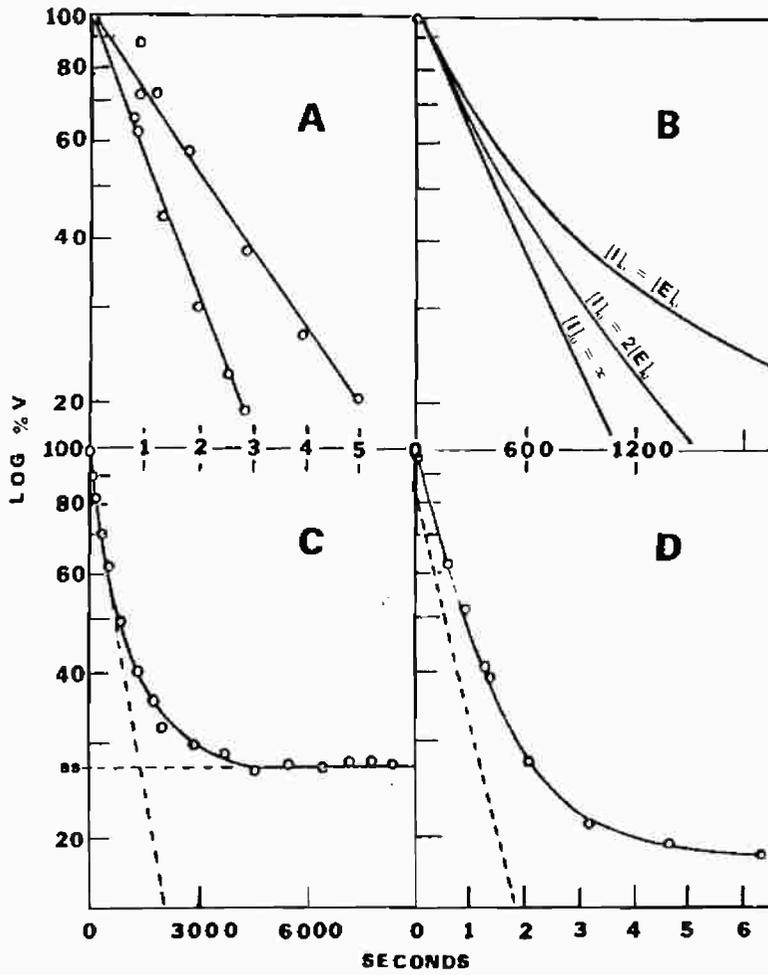
وعند تحضير المثبط مع الأنزيم فإن هناك فترة من الوقت تقاس قبل إضافة مادة التفاعل لقياس النشاط المتبقى من الأنزيم : أى قياس قيمة اللوغاريتم السالب لمعامل التثبيط (pI_{50}) لخمسين فى المائة من النشاط الإنزيمى :

ففى حالة المثبطات العكسية ليست ذات معنى وطالما مادة التفاعل والمثبط والإنزيم اضيفوا و لتقدير قيمة (pI_{50}) لمستوى من تركيزات المثبط المختارة والتي فى الغالب تسبب عدم التثبيط . والتركيزات العالية والمسببة لتثبيط كلى بعد فترة تحضير مع الإنزيم ويتوقع النسبة المئوية للتثبيط فى مقابل تركيز المثبط نحصل على منحنى تكون قيمة (pI) فيه هى القيمة التى تقطع المنحنى عند ٥٠% تثبيط وتسمى باللوغاريتم السالب للتثبيط (pI_{50}) شكل رقم (١٢-١) .

أما ثابت المعدل ثنائى الجزيئى (Bimolecular rate : k_i) لمركب فوسفورى عضوى (P_x) يحتوى على مجموعة مفسفرة (Phosphorylating group) تتصل بمجموعة تاركة (x) فتكون معادلة التثبيط (معادلة تفاعل ثنائى الجزيئى بسيطة يتحكم فيها (K_i)) .

جدول رقم (١٢-٢): قيمة معدل ثابت الفسفرة والتفكك والتثبيط ثنائي الجزئي لبعض المثبطات الفوسفورية والكرباماتية لمصادر إنزيم مختلفة

k_2 (min ⁻¹)	K_m (M)	k_1 (M ⁻¹ min ⁻¹)	Temp. (°C)	المركب Compound	مصدر الإنزيم Enzyme
67	2.7×10^{-4}	2.4×10^3	5	Malaoxon	AChE (bovine)
6.6	6.2×10^{-4}	1.1×10^4	25	Malaoxon	BuChE (human)
40.7	1.7×10^{-3}	3.4×10^3	25	DFP	AChE (bovine)
145	2.6×10^{-3}	5.5×10^4	25	DFP	BuChE (horse)
5.2	1.2×10^{-4}	4.3×10^3	25	 (phosphoallgmine)	AChE (bovine)
3	1.44×10^{-1}	2.1×10^2	5		AChE (bovine)
0.51	2.2×10^{-1}	3.7×10^1	25		
43	3.6×10^{-4}	1.2×10^3	25	 (paraoxon)	
157	2.8×10^{-4}	5.6×10^4	5	 (amilion)	AChE (bovine)
90	1.5×10^{-4}	5.8×10^4	5	 Insecticidal carbamates	BuChE (human)
146	1×10^{-3}	1.6×10^1		 Aldicarb	AChE (bovine)
>20	$>5 \times 10^{-2}$	2.2×10^1		Carbaryl	AChE (bovine)
0.8	5×10^{-1}	1.6×10^1		Carbaryl	AChE (housefly)
10.8	3.3×10^{-4}	3.3×10^4		Eserine	AChE (bovine)
46.5	1.2×10^{-4}	4.0×10^4		 (neomigaline)	AChE (electrical)



شکل رقم (۱۲-۲): منحنيات تثبيط إنزيم الأسيتيل كولين أستيريز

جدول رقم (١٢-٣): مقارنة بين السموم المثبطة عكسياً والمثبطة غير عكسياً:

<p>السموم المثبطة غير عكسياً (المباشرة: تثبيط غير تنافسي) للإنزيم Irreversible Inhibition : Direct:Non competitive)</p>	<p>السموم المثبطة عكسياً (العكس مباشرة: تثبيط تنافسي) للإنزيم (Reversible Inhibition: In direct: competitive)</p>
<p>سموم جزئياتها مستقطبة (polarized)</p>	<p>السموم جزئياتها غير مستقطبة (depolarized)</p>
<p>تؤدي للتثبيط غير تنافسي فلا يتمكن الإنزيم من استعادة نشاطه مرة أخرى aging لكبير الموائمة فترتفع قيمة k_3</p>	<p>تؤدي للتثبيط تنافسي وهنا يتمكن الإنزيم من استعادة نشاطه recovery لضعف الموائمة فتقل قيمة k_3</p>
<p>تثبيط ٥٠% من النشاط الإنزيمي عند تركيز 10^{-10} - 10^{-1} مول</p>	<p>تثبيط 50% من النشاط الإنزيمي بتركز 10^{-1} - 10^{-3} مول</p>
<p>جزئياتها لها أثر باقى طويل long lasting effect</p>	<p>جزئياتها لها اثر باقى قصير short lasting effect</p>
<p>الاشمان والقط أكثر حساسية لها عن الأرنب العضلات الحمراء أقل حساسية عن البيضاء</p>	<p>الاشمان والقط أقل حساسية لها من الأرنب العضلات الحمراء أكثر حساسية عن البيضاء</p>
<p>تؤدي لشلل سبازمي spasmic paralysis</p>	<p>تؤدي لشلل ارتخائي flacid paralysis</p>
<p>لا تضاد إنزيم الكولين استيريز</p>	<p>تناهض إنزيم الكولين استيريز</p>
<p>ينشط فعلها edrophorym و أيونات الكالسيوم</p>	<p>ينشط فعلها dotypocumarine و يضاد فعلها edrophorym و أيونات الكالسيوم</p>
<p>حيث إضافة كمية زائدة من مادة التفاعل لا تصل سرعة التحلل إلى أقصاها و لكن بزيادة المثبط تصل السرعة القصوى للصفر و يتلاقى المنحنيان في نقطتان و ذلك لتأثير المثبط على التركيب التكويني للإنزيم و لا يؤثر على قيمة K_m لتأثيره على السرعة القصوى فيصبح:</p> $V_{max} = 1/V_{max}[1+I/KI]$ $\text{Slope} = Km/KV_{max} = [1+I/KI]$ <p>فتأثير المثبط هو خفض تركيز الإنزيم:</p> $Ki = I / [V_{max} / V_i + 1]$	<p>يتشابه المثبط التنافسي مع مادة تفاعل الإنزيم والذان يتنافسان على مراكزه النشطة فلا تتأثر السرعة القصوى V_{max} بوجوده وعند تواجده تقل السرعة ويزيد قيمة $1/v$ ويمد الخط على استقامته يعطي $1/Km1$ جديدة أكبر من $1/Km1$ و بنهاية التحليل تكون قيمة Km عالية بالمثبط عن قيمة $Km1$ و يتلاقى المنحنيان في نقطة V_{max} هي</p>

كينيتيكية (حركية) تثبيط إنزيم الأسيتيل كولين استيريز

ترض العالم Aldridge المعادلة التالية عند تثبيط أنزيم الأسيتيل كولين استيريز مع الوقت:



$$-d(\text{EP})/dt = [(\text{EP}) - d(\text{E.})] / dt = d(\text{E}) / dt$$

$$-d(\text{E}) / dt = \text{Ki}(\text{E.}) - (\text{EP})(\text{E.})$$

وعندما تكون :

$$(\text{E}) = (\text{E.}) - (\text{EP}) \quad \text{تنتج المعادلة التالية} :$$

$$(\text{E.}) = \text{E} + (\text{EP})$$

وبالرجوع للمعادلة الأولى ودمج الحدود شكل رقم (١٢-٣) :

$$\text{عندما } \text{EP} = 0 \quad : \quad \text{t} = \text{صفر وعليه فإن} :$$

$$\text{عندما } \text{EP} = \text{E.} \quad : \quad \text{t} = \text{t.}$$

$$\ln (\text{E.}) / (\text{EP}) = (\text{EP}) = \text{Ki} [\text{I}] . \text{t}$$

ويمكن قلب (convert) المعادلة السابقة لصورة يمكن منها تجريبيا قياس قيمة السرعة الابتدائية v_0 وكذلك قيمة السرعة v وذلك بإحلال $[V_0 / V]$ بدلا من $[\text{E.} / \text{EP} - \text{EP}]$ وهو ما يحدث عندما تكون :

$$\text{E} = (\text{EP}) - \text{E.} \quad v.$$

$$\text{Ln } V_0 / V = \text{Ki} (\text{I}) . \text{t}$$

وهنا يقارب تركيز المثبط (I) قيمة التركيز الأولى للمنشط (I.) و الذي أضيف ليكون أكثر كثيرا عن (E.) و بالتالي :

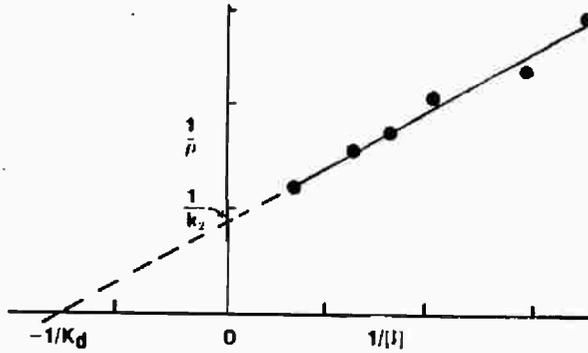
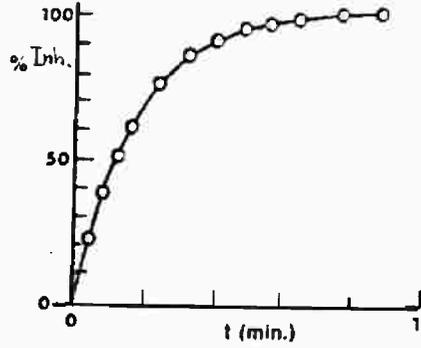
$$[I] = [E.] = [I.]$$

ولطالما أن [I] تبقى ثابتة فإن التفاعل يكون من الدرجة الأولى أساسا مع الأخذ في الاعتبار قيمة (E.) .

ولقياس ثابت معدل التفاعل من الدرجة الأولى عند أى قيمة ثابتة من المثبط [I] فإن المعادلة السابقة تكتب بالصورة الخطية التالية :

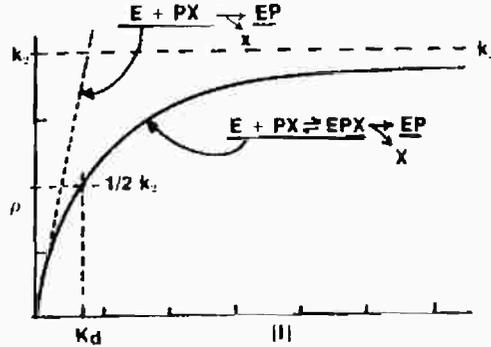
$$\ln V = -K_i [I] . t + \ln V_0$$

و بتوقيع قيم $\ln V$ مقابل t نحصل على خط مستقيم ميله $-K_i [I]$ ويمكن منه تقدير قيمة K_i .



شكل رقم (١٢-٣) : منحنى تثبيط أنزيم الكولين استيريز بمركب الباراثيون

و أي قيمة لتثبيط ٥٠% من نشاط الإنزيم سوف تقترب من 1.0×10^4 مول وربما يحتمل أن يكون تركيز المثبط و لا يتم تجاهله وهنا فإن التفاعل يتبع كينيتيكية من الدرجة الثانية كما في الشكل التالي رقم (١٢-٤)



شكل رقم (١٢-٤) : كينيتيكية تثبيط من الدرجة الثانية للإنزيم

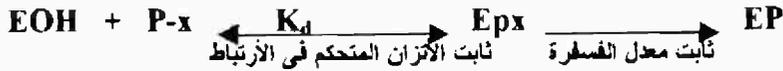
وتكون قيمة تثبيط ٥٠% بالمثبطات القوية تقريبا من تركيز الإنزيم تحتاج لفترة ١٥ دقيقة و التفاعل تنافسي : تثبيط تنافسي (Competitive inhibition)

$$P = \ln V / V. t = K_i [E]$$

و القيمة : $\ln V / V. t$ تعنى معنى تجريبى كقيمة ل P

ثابت الميل و الأستله (Affinity and Acetylation constant)

للتأثيرات الفراغية للتركيب البنائي الفراغي (Structure configuration) لجزيئ المثبط تأثيره على مدى احتماليه الإنطباق لجزيئى المثبط على الموقع النشط بالإنزيم وتكون المعقد المرتبط العكسى :



ويفترض عدم تكسر (EP) ليعطى الإنزيم حر مرة أخرى وهو ما يمكن حدوثه فى الدقائق الخمسة الأولى من التفاعل حيث أن عملية إزالة الفسفرة (ثابت إزالة الفسفرة K_3) تستغرق وقت أقل من الوقت المستغرق فى ثابت الفسفرة (K_2) حيث :

$$[E.] = [E] + [EPX] + [EP]$$

فمعدل تكوين (EP) :

$$EP = - d[EP] / dt = K_2 [EPX]$$

فالتغير فى [EPX] يمكن إيجاده من المعادلة المحددة لقيمة K_d من معادلة بقاء المادة :

$$K_i = [E] [I] / [EPX] = [E.] - [EPX] - [EP] [I] / [EPX]$$

وبحل المعادلة لقيمة [EPX] :

$$P = \text{Ln} [V. / V] / t = K_2 / 1 + K_d/[I]$$

حيث P ثابت معدل من الدرجة الأولى ولها نفس المعنى التجريبي كما بالمعادلة السابقة : $P = \text{Ln} V/V. t L K_i$ و المبنية على التخطيط السابق .

ولتوضيح هذه المعادلة مقارنة بمعادلة ميخائيل و منتن وبإحلال P مع v و K_2 مع V و K_0 مع K_m و I مع S تظهر المعادلة السابقة ولها نفس تكوين معادلة ميخائيل و منتن ويمكن تحويلها لمماكن خطى .
وعند توقيع قيم P مقابل قيم [I] تظهر مماكنة لما يحدث عند توقيع قيم V مقابل قيم S وتعطى منحنى قطع زائد قائم (Rectangular hyperbola) :

$$1/P = K_2 / K_0 [I] + 1/K_2$$

وبنتج القاطع $1/K_2$ فإذا كانت قيمة [I] أقل بكثير من K_0 فإنه بتوقيعها لا تعطى قواطع ولكن يظهر بدورة بنقطة الأصل على الامتداد (Extrapolation)
وتعتمد قوة المثبط الفوسفاتي على طريقه الارتباط و سرعة فسفرة الموقع النشط و الذى ينعكس بواسطته K_0 و K_2 .
و العلاقة بين K_0 و K_2 بالمعادلة السابقة وقيم K_i بالمعادلة يمكن إظهارها باعتبار أن [I] أكبر أو تساوى K_d وبالرجوع للمعادلة :

$$P = \text{Ln} [V_0 / V] / t = K_2 / 1 + K_0/[I]$$

و التى يمكن إختصارها الى :

$$P = K_2/K_0 [I] = K_i [I]$$

و عندما تكون [I] أقل كثيرا من K_0 :

$$K_i = K_2/K_0$$

أى أن قوة التثبيط الفوسفاتي تعتمد على كل من قيمتى K_2 و K_0 حيث أن K_i معدل التثبيط الكلى

التثبيط في وجود مادة التفاعل والمثبط العكسي :

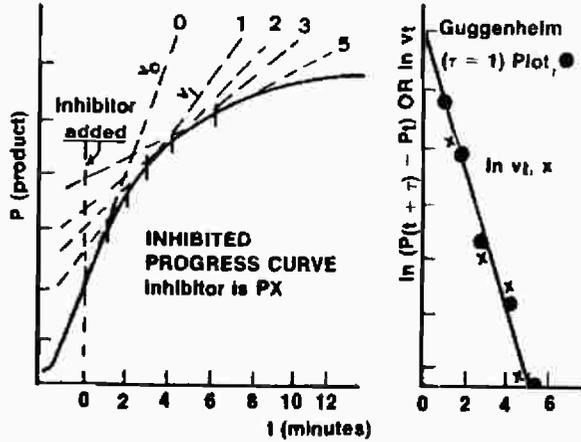


وبتطوير المعادلة السابقة : $P = \ln [V. / V] / t$

$$K_2 = 1 + K_d/[I] = P = K_2 / (1 + (K_d/[I]) (1 + S/K_m))$$

وهي معادلة مماثلة لوصف التثبيط التنافسي النقي.

وللحصول على قيمة P يستخدم منحنى تقدمى لمادة التفاعل حيث الخطوط المتكسرة هي ظل ميول منحنى النمو التثبيطي التقدمى حيث يعطى السرعات V_1 و V_2 بالنسبة للوقت t_1 و t_2 بعد بدء التثبيط ويمكن تفسير المنحنى باستخدام (Guggeheim plot) حيث أقصى تركيز للنواتج المتكون في الوقت t . وكما هو متوقع من توقيع المعادلتين السابقتين فإنهما يعطيا نفس الميل ولتقدير k_1 k_2 فإن K_m يجب وأن تكون معلومة ، شكل رقم (١٢-٥).



شكل رقم (١٢-٥) : منحنى التثبيط التقدمى للمثبط

حركية إنزيم الأسيتيل كولين استيريز (Acetyl Cholinesterse kinetics)

تختلف درجة سمية أفراد السموم الفوسفورية العضوية ونشاطها المناهض للإنزيم باختلاف تركيبها الكيميائي و البنائي ، فالمركبان التاليان على سبيل المثال يختلفان عن بعضهما في مجموعة ميثيل فقط بالحلقة العطرية بالوضع ميثا حيث تم تقدير الثوابت الخاصة بهما على كائنين مختلفين وهذه الثوابت المقدرة (الجرعة القاتلة للنصف LD_{50}) و ثابت الموائمة (ka) و ثابت الفسفرة (k_p) و ثابت التثبيط (ki) و سجلت النتائج و التي لوحظ منها ما يلي :

- تقارب قيمة ثابت الفسفرة بكلا المركبين على كلا الكائنين
- قيمة ثابت التثبيط للمركب على الكائن (أ) عشرة أمثال الكائن (ب) و عليه يمكن أخذ قيمة ثابت التثبيط (K_I) كمقياس على درجة التثبيط كما أوصى العالم ألدريدج (Aldridge)
- ميل المركب (ka) لإنزيم الكائن (ب) < من ميل الكائن (أ) رغم تساوى ثابت الفسفرة تقريبا (K_p) لكل منهما أى أن زيادة السمية ترجع أساسا لدرجة الميل وهي الخطوة السابقة لعملية الفسفرة أثناء تكوين معقد الإنزيم والمثبط الفوسفورى حيث إقترض العالم M ain المعادلة التالية :



وبفرض حدوث إتران بين الإنزيم والمثبط فإن معدل التغيير فى تركيز الإنزيم المثبط (r) = صفر

$$dc/dt = K_1(e_0 - r - q) - K_1(r) - K_2(r) = e = r$$

$$K_1 = (e - q)^{-1} = K_1(r) (I) - K_2(r) - K_2(r) = r [K_1 (I) + K_1 K_2]$$

حيث قيمة k_2 أثناء الفسفرة المباشرة (القوية) تكون صغيرة جدا
 أي أن : $K_1 + K > K_2$

$$K_1 = (e - q)^i = r [K_1 (I) + K_1]$$

$$r = K_1 (e - q)^i / K_1 (K_i) i + K_1$$

وبقسمة البسط و المقام على (K_1) و احتمالية حالة إتزانها :

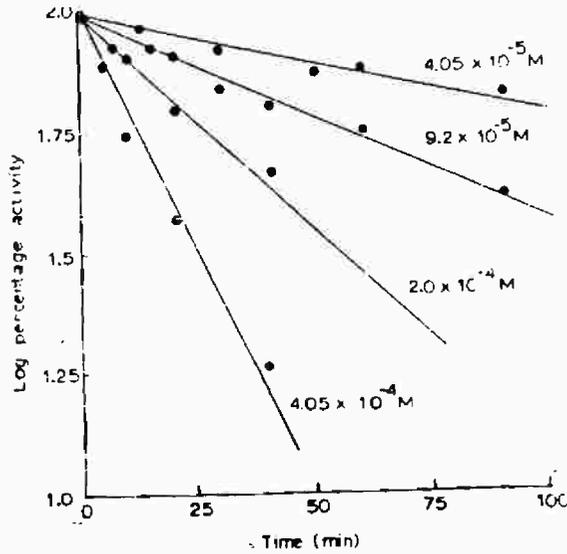
أي معدل تكوين النواتج = معدل التفاعل العكس

$$r = (e - q)^i + K_1 / K$$

ثابت الاتزان = ثابت الميل = ثابت التحلل $K_a = e/r = (K_1) / K_1$

$$r = (e - q)^i / i + K_a$$

$$dq/dt = K_2 (r) = K_2 (e - q)^i / i + K_a$$



شكل رقم (١٢-٦) : معدل تثبيط الأنزيم بكرات الدم الحمراء لعدة تركيزات من المركب

وعندما يكون تركيز الإنزيم المرتبط (r) << تركيز الإنزيم الحر (e) فإن قيمة تركيز (r) لا تتغير كثيرا :

$$dq/dt = [K_2 (i) / K_a + r] (e - q) = \text{Const.} (e - q) = \text{Const.} dt$$

وبتكامل المعادلة بين الحدين (q₁, q₂) والزمن بين (t₁, t₂)

$$\text{Ln } [q_2 - e] / [q_1 - e] = \text{Const.} (t_2 - t_1)$$

إذن قيمة (e - q) تتناسب و سرعة تفاعل الإنزيم (v) مع مادة تفاعله :

$$(t_1 - t_2) \text{ ثابت} = \text{Ln } V_2 / V_1$$

$$(t_1 - t_2) \text{ ثابت} = \text{Ln } V_1 - V_2$$

وبالرجوع لمعادلة Main وقسمتها على 2.3 Δlog V

$$2.3 \Delta \log V = K_2 (i) \cdot \Delta / i (K_a)$$

$$I + K_a = K_2 (i) \cdot \Delta / 2.3 \Delta \log V$$

وبقسمة المعادلة على K₂ (i)

$$\Delta t / 2.3 \text{ Log } V = K_2 (i) \cdot \Delta t / 2.3 \Delta \log V$$

وهي الصورة النهائية لمعادلة Main ومنها يمكن التفريق بين ثابت الفسفرة (kp) والميل (ka) لأى مادة سامة .

فإذا حدث تفاعل بين جزئى السم (المثبط) و جزئى الإنزيم ووصل التفاعل لحالة إتران يعقبها حاله فسفرة فما هي قيمة (k I) التى تحصل عليها

Aldridge

$$2.3 \Delta \log V = [K_2 (i) / K_a + C] t_2 - t_1$$

وعند تساوى سرعة التفاعلين (V₂ = V₁) فإن t₂ = t₁ = 0 فإن (V₂ = V₁) وبفرض أن تركيز المثبط صغير جدا عن (K_a) فإن :

$$2.3 \Delta \log V / V = + K_2 / K_a (i) (t)$$

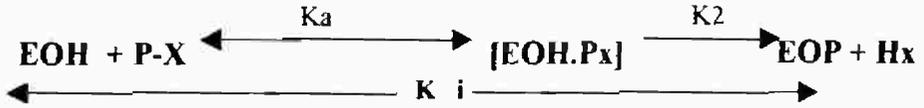
$$K_i = K_2 / K_a$$

$$2.3 \Delta \log V / V = K_i \cdot t$$

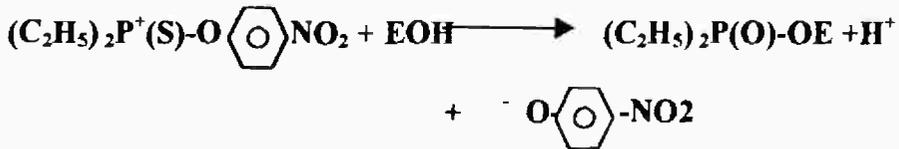
وهي معادلة ألدريدج

العوامل المؤثرة على معدل الفسفرة:

مما سبق يتبين أن جهد التثبيط الكلى للفوسفات (Total inhibition) يقاس بواسطة ثابت التثبيط (K_i) والناتج عن مدى الموائمة (الميل) :
 • (Affinity : K_a) و المؤثر بدورة على ثابت الفسفرة (Phosphorylation constant) .



حيث يبدأ التثبيط بهجوم اليكتروفيلي لذرة الفوسفور على هيدروكسيل حمض السرين بانزيم الأسيثيل كولين استيريز و عليه فإن الإحتياج لفاعلية أو لمقدرة الإستبدال الإليكترونى الساحب للإلكترونات (Electron with drawing) وهو ما يعبر عنه بالتأثير الإيجائى (الحثى) السالب (-I : Inductive effect) و الذى يقوم بسحب الكثافة الإليكترونية تجاهه بعيدا عن ذرة الفوسفور بنواة جزيئى المركب فتزداد الإليكتروفيلية ذرة الفوسفور أى الشحنة الموجبة جزئيا عليها وهو ما أمكن إثباته فكلما زادت قوة الإليكتروفيلية (الشحنة الموجبة) بإستبدالات ذات طبيعة ساحبة للإليكترونات (-I) وفى وضع معين بالجزيئى كلما زادت حساسية ونجاح الهجوم الإليكتروفيلي لذرة الفوسفور وهو ما عبر عنه العالميين Aldriage & Davison بحساسية ذرة الفوسفور نفسها لهجوم مجموعته الهيدروكسيل السالبة بحمض السرين أى حساسية الجزيئى للتحلل القلوى والذى أمكن التعبير عنه فيما بعد بثابت هامت (δ : Hammett's constant) لقياس التأثيرات الإستبدالية للمجموعة الساحبة للإليكترونات أى المجموعة ذات التأثيرات الإليكترونية (Electronic effects) خاصة عند ما يتم إحلالها لمجموعة أروماتية تتصل بذره فوسفور ليكتروفيليه :



وعليه فالعوامل التي قيمة معدل ثابت الفسفرة لها (k_2) في مدى القيمة المثلى و التي بدورها تزيد صفه الإليكتروفيلية لذرة الفوسفور للدرجة القصوى للإستبدال تؤدي لزيادة التثبيط والمناهضة للإنزيم :

١- الاستبدال بارا نيترو على حلقة الفينيل وعلاقتة بالسمية :

بعد الإستبدال بارانيترو بحلقه الفينيل إستبدال صاحب للاليكترونات 1 يؤدي لسحب الإليكترونات تجاهه فتزداد درجة حموضة الحلقة هذا علاوة على عامل الرنين بالحلقة في نفس الوقت تزداد درجة إليكتروفيلية ذرة الفوسفور فتتيح الهجوم الإليكتروفيلي لذرة الفوسفور على مجموعة هيدروكسيل حمض السرين بالإنزيم فينفسفر (Pphosphorylated enzyme) فإدخال حلقة الفينيل نفسها بالمركب تزيد من درجة حموضة المركب وبالتالي درجة سميته ولكن يجب الأخذ في الإعتبار بأنه لا تزيد درجة حموضة الحلقة عن حد معين حتى لا يؤدي ذلك لكسرها و إنهيار المركب (Degradation) في نفس الوقت فان زيادة حموضة المركب ككل تؤدي لزيادة إليكتروفيلية ذرة الفوسفور فتزداد درجة مناهضة الجزئي السام للإنزيم (Anti cholinesterase)

٢- مكان وضع المجموعة الساحبة وعلاقتها بالسمية :

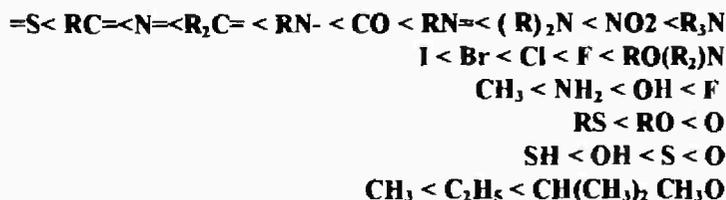
لمكان أو وضع المجموعة الساحبة للالكترونات تأثيره على معدل الفسفرة و بالتالي على زيادة درجة سمية المركب :
فالوضع بارا : أقوى من الوضع ميتا والوضع ميتا أقوى بدورة من الوضع أورثو :

الوضع أورثو > الوضع ميتا > الوضع بارا

اتجاه انخفاض التأثير الحثي (-I) نتيجة تغيير وضع المجموعة الساحبة على الحلقة

حيث يشير السهم إلى إتجاه انخفاض التأثير الحثي وهو نفسه إتجاه إنخفاض السحب الإليكتروني (الإليكتروفيليه) حول ذرة الفوسفور وهو ما يعنى إتجاه إنخفاض الهجوم الأليكتروفيلي لنواة المركب على الأنزيم وهو في نفس الوقت إتجاه انخفاض المناهضة للإنزيم (الفاعلية البيولوجية : السمية) .

ومن الجدير بالذكر في هذا الصدد الإمام يترتيب المجاميع المختلفة الساحبة للإليكترونات تنازليا كما يلي :



٣- التنشيط الكيميائي لذرة الفوسفور (Chemical activation) :

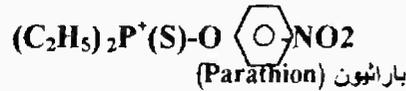
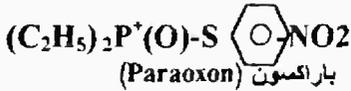
يعد التنشيط الكيميائي هو الصفة الأكثر أهمية لتقدير النشاط المناهض للإنزيم لأي نواة إستر فوسفوري وهو ما يقاس بكثافة توزيع الشحنة الموجبة على ذرة الفوسفور (Formal charge) والذرات المجاورة لها بثابت هامت (δ : Hammett, s costant) حيث تزداد قيمة فتزداد قوة التثبيط و بعلاقة خطيه .
 فمركب الباراثيون (إستر فوسفو ثيونات) ضعيف المناهضة للإنزيم ولكن يتحوله للمماكن باراكسون (Paraoxon) : أستر فوسفو ثيولات (Phospho thiol ester) تزداد قوة مناهضة لزيادة الشحنة الموجبة على ذرة الفوسفور و ارتفاع قيمة ثابت هامت .

و في نفس الوقت نجد أن حسابات المدار الجزيئي (Molecular orbital) تشير للشحنة الموجبة و الملازمة لذرة الفوسفور في الباراكسون إلى سرعة تحللة عن الباراثيون وهذا التوافق بين كثافة الشحنة وقوة التثبيط و التي تتفق وآلية التثبيط النيوكليوفيلي (هيدوركسيل حمض السرين بالإنزيم) بالموقع النشط بسطح الإنزيم المهاجم بذرة الفوسفور الإليكتروفيليه .
 وعلية فأرتباط جزيئي السم بمجموعات من شأنها أن تؤدي لصفات إليكتروفيلية قوية مما يجعلها أكثر حساسة لهجوم نيوكليوفيلي فيصبح الجزيئي أقوى في التثبيط وهو ما ينسجم ويتماشى مع العلاقة الملاحظة بين النشاط المناهض للإنزيم وثابت هامت للأستبدال في الحلقة العطرية وهو ما توضحه النتائج في الجدول التالي رقم (١٢-٤) وعلية فالإستر ذو قيمة Super

Delocalizability . Spn) يكون أكثر مناهضةً للأنزيم لإرتباطه القوي به وذلك لإرتباط قيمة (Spn) مع التحلل المائي القلوي

جدول رقم (١٢-٤): قيم التثبيط وثابت هامت لمجموعة من الإستبدالات بحلقة الفينيل بمركب داى إيثيل فوسفات على الإنزيم:

المركب	ثابت هامت	لـسو	المركب	ثابت هامت	لـسو
بارا-نيترو	٠,٧٨	٧,٥٩	ميتا-نيترو	٠,٧١	٧,٣٠
بارا- SO_2-CH_3	٠,٧٣	٦,٦٠	ميتا-(SFS)	٠,٦١	٧,١٢
بارا-سيانو	٠,٦٣	٦,٨٩	ميتا إيثوكسي	٠,١٢	٣,٨٩
بارا-كلورو	٠,٢٣	٤,٥٢	ميتا-ترت بيوتانين	٠,١٢-	٦,٠٥
بارا-ميركابنو	٠,٠٥-	٤,٤٨	ميتا-تراى ميثيل امين	٠,٢١-	٦,٤٠
بارا-ترت بيوتانين	٠,٢٠-	٤,٠			



اتجاه زيادة ثابت هامت (δ) اتجاه زيادة الصفات الإلكترونية وفيه اتجاه زيادة قوة المناهضة للأنزيم
اتجاه زيادة درجة الثبات الكيميائي

ولقد لوحظ أن المعاملة المسبقة بإحدى أفراد مجموعة السيكلوداينات السامة مثل مركب الألدرين (Aldrin) ثم المعاملة بأفراد مختلفة من السموم الفوسفورية العضوية أدى لتأثير متداخل مضاد (Antagonistic interaction) وهو ما يتضح من الجدول التالي رقم (١٢-٥)

جدول رقم (١٢-٥) تأثير جرعة مفردة من الألدرين (١٦ مللج / كج) على السمية الحادة للسموم الفوسفورية العضوية

% للموت		المركب (ملليج /كجم)
المعاملة المسبقة بالألدرين	الكونترول	
صفر	٣٥	باراثيون (٢٢)
٤٤,٤	١٠٠	باركسون (٤٠)
١٥,٤	٨٤,٦	جوثاثيون (١٥)
صفر	٩٥	TEPP (١٠)
١٠	٦٦,٦	DFP (٥٠)
صفر	٥٠	EPN (٧٥)
٢٠	٦٠	TOCP (٢٠٠٠)
٧٠	٦٠	OMPA (٢٥)

وهو أيضا ما تم ايضاحه بالجدول التالي رقم (١٢-٦) و لكن لتأثير هذه المعاملة خارج الجسم (In - vitro) على بلازما الدم ،

جدول رقم (١٢-٦) : تأثير المعاملة بالألدرين على الإرتباط في البلازما خارج الجسم وخفض سمية الباراكسون :

المعاملة	باراكسون (٥) ميكرو جرام / ملل بلازما)	% للباراكسون المرتبط	% للباراكسون الحر	% للكلوتين استيريز المثبط
الكونترول	١٠,٦	٤,٣± ٨٦,٢	٤,٣± ١٣,٩	٥,٨± ٨٤,٢
المعاملة بالألدرين	١٠,٦	٠,١± ٩٩,٤	١,٠± ٠,٦	٣,٤± ٤٠,٢

ولقد أدت النتائج السابقة إلى دراسة وتجريب أكثر من مركب كلوريني آخر مثل مركب الـ دددت (DDT) و الـ ديلدريـن (Dieldrin) و الكلوردان (Chlorodan) على سمية الباراكسون (المشتق التأكسدي الأكسجيني لمركب

الباراثيون (فوسفوثيونات) و التي أدت لانخفاض مستوى السمية بالباراكسون وذلك لانخفاض التثبيط الانزيمي جدول رقم (١٣-٧) :

جدول رقم (١٢-٧) : العلاقة بين الارتباط بالبلازما (خارج الجسم) وسمية المشتق الأوكسيجيني باراكسون في الفئران الصغيرة المعاملة مسبقا بأى من المبيدات الكلورونية التالية :

المركب (ملج / كج)	% للموت للباراكسون (٢ ملج / كج)	% الحر للباراكسون فى البلازما
كونترول	٦٠	١,٩+١٧,٣
ددت (٧٥)	٤٠	٤,٩+٧,٤
ديلدرين (١٦)	٢٠	٠,١+٠,٧
كلورودان (١٥٠)	١٥	٠,١+٠,٤

٤- طول وتفرع سلسلة الألكيل و علاقتها بالسمية :
المركبات ذات سلسلة الألكيل القصيرة الغير متفرعة تكون أكثر مناهضة للإنزيم عن السلسلة الطويلة أو المتفرعة والمماثلة لها فى نفس عدد ذرات الكربون إلا أنها فى نفس الوقت تكون أكثر ثبات :



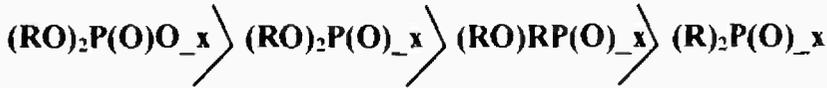
ذو قوة مناهضة متوسطة وترجع لثبات أيون الكربونيم (Carbonium ion)
أقوى التركيبات البنائية مناهضة لأنزيم جلوتاميك -كب- ترانسفيراز المزيل لمجموعة الألكيل

أنتجاة زيادة قوة المناهضة لأنزيم الكولين استيراز

ومن التخطيط السابق يلاحظ أن اتجاه نقص طول السلسلة هو نفسه اتجاه سحب الإلكترونات عن ذرة الفوسفور هو نفسه اتجاه زيادة المناهضة للإنزيم .

٥- نوعية الإستر الفوسفوري و علاقته بالسمية :

فالإستر الفوسفاتي (Phosphate ester) أكثر تنشيطاً ومناهضة من الإستر الفوسفوني (Phosphonic ester) و الأخير بدوره أكثر مناهضة من الإستر الفوسفيني (Phosphinic ester) :



إستر فوسفيني (Phosphinic ester) إستر فوسفوني (Phosphonic ester) إستر فوسفوري (Phosphate ester) إستر فوسفاتي (Phosphate ester)

٦-أكسدة كبريت السلسلة الجانبية:كبريت الميركابيتو (M ercapto sulphur) :
تؤدي أكسدة ذرة كبريت السلسلة الجانبية إلى تحول المركب للمشتق التأكسدي الأول: سلفوكسيد (Sulfoxide) الأكثر سمية والأقل ثباتاً عن المركب الأصلي وبزيادة درجة الأكسدة يتكون المشتق التأكسدي الثاني سلفون (Sulfone) الأكثر من سابقه سمية وأقل ثباتاً منه .
حيث تعزى الفاعلية البيولوجية :السمية : المناهضة للإنزيم بزيادة درجة الأكسدة إلى تأثير الرابطة (-S-) و تحولها إلى [-S(O)-] ثم إلى [-S(O)O-] على الترتيب وقدرتها على سحب الإلكترونات بعيداً عن ذرة الفوسفور .

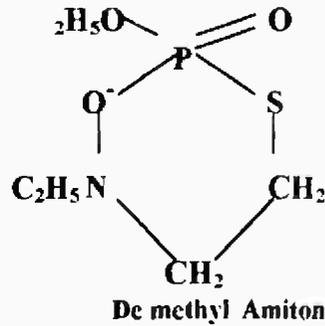
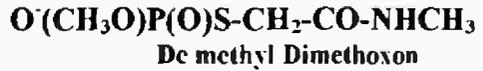
٨- التشابه الهندسي وأثره على معدل الفسفرة والسمية:

تتفاوت درجة الفاعلية البيولوجية (درجة السمية و المناهضة للإنزيم) باختلاف نوعية التشابه الهندسي الموجود بالمركب :

٩- الأكسدة (Oxidation)

تؤدي أيضا عمليات التمثيل لتكوين مشتقات أكسجينية أخرى (Oxygen derivatives) و التي تؤدي لخفض صفات الإليكتروفيليه لسذرة الفوسفور فتضعف فاعلية المركب كمناهض للإنزيم وإفتقار الهجوم الإليكتروفيلي لذرة الفوسفور .

فبعد نزع مجموعته الميثيل المرتبطة بذرة الأكسجين (De methylation) تنخفض فاعلية المركب بحوالي ٦٦٥٠٠٠ مرة عن المركب الأصلي أي تنتهي مناهضته للإنزيم تقريبا (Abolish Anti cholinesterase) كذلك الحال مع مركب الأميتون (Amiton) عند إزالة الألكيل المعلق بذرة الأكسجين إنخفضت سميته إلى ١٧٩/١ عن سمية الأميتون ويرجع ذلك لتحول المركب للشكل الفراغي الحلقى الغير ملائم للإنتطابق على سطح الإنزيم :



١٠- التأثير الفراغى (Steric effect : Es) وعلاقته بالسمية :

تعد معايير التنشيط (Reactivity parameters) غير كافية بمفردها للإمداد بحسابات دقيقة عن النشاط المناهض للإنزيم حيث وجد أن للتأثير الفراغى لبنائية جزيئى المركب أثر كبير على تنشيط و مناهضة الإنزيم حيث الإرتباط القوى بين التأثير الفراغى لبنائية جزيئى المركب أثر كبير على تنشيط الأنزيم حيث الإرتباط القوى بين التأثير الفراغى للجزيئى وفاعليته و باستخدام تحليل الإندار لبيانات الجدول رقم (١٢-٨) والموضح بالشكل رقم (١٢-٧) :

r	s	n	لو ١/١50 = ٣,٤٥ + δ ٦,٣٠٩	حيث: ٦	٠,٥٠٧	٠,٩٥٤	لمسلسلة إستبدالات بالوضع بارا
٥	١,٣٨٣	٠,٤٧٩	٥,٨٠٦ + δ ١,٥٥٧	:	١,٣٨٣	٠,٤٧٩	لمسلسلة إستبدالات بالوضع ميتا

ويتضمن ثابت التأثير الفراغى (π) بكلتا المعادلتين تظهر معنوية ضعيفة لتتبع نشاط هذه المركبات على الإستبدال فى الوضع بارا الأقوي مع δ عن ميتا ، لذا يجب أخذها فى الإعتبار عند حساب نشاط مشتقات الإستبدال ميتا (حيث $x =$ المشتق ميتا و $\delta =$ صفر للمشتق بارا) :

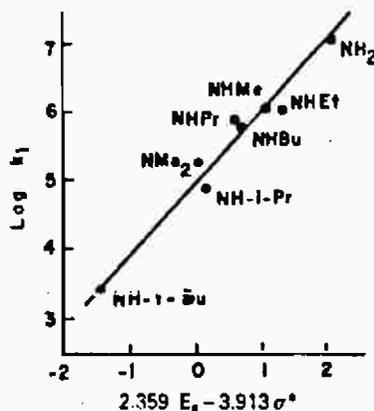
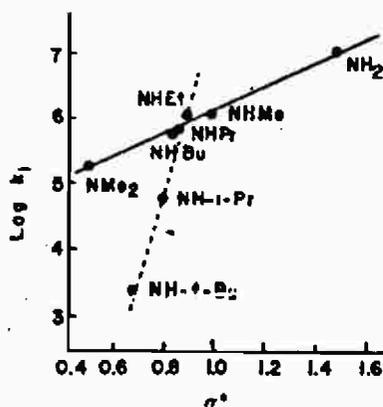
لو ١/١50 = ١,٠٦ + Es ٢,١٩ + δ -P ١,٤٠ x ٥٧٧	١٢:	٠,٢٨٥	٠,٢٨٥	لمسلسلة أستبدالات بالوضع ميتا
--	-----	-------	-------	-------------------------------

حيث تم الحصول على إرتباط قوى معنوى مع قيم ($\delta -P$) أكثر من δ (للإستبدال بارا وهذا متوقع طالما أن هذه المشتقات إسترات لفينولات مستبدله ولهذا يؤخذ فى الاعتبار معيار ثابت التأثير الفراغى (Es) ومن المحتمل أيضا حجم المتشابهات ميتا إلى بارا بمعادلة واحدة لإعطاء أحسن النتائج .

ويمكن لثابت تافت (δ^* : Taft, s constant) للإستبدالات القطبية إعطاء إرتباط ردىء بينما كان الإرتباط القوى المتحصل عليه من (Es) و من هنا

نجد أن معدل التثبيط (المناهضة) يعتمد على كلامن (E_s) و δ^* وباستخدامهما نحصل على ارتباط قوى .

وعليه فالبنسبة لجزيئي المركب التالي ($(RO)_2P(O)x$) نجد أنه يجب وأن تكون مجاميع الكوكسي (RO) صغيرة مثل مجاميع الميثوكسي أو الإيثوكسي فزيادة طولها عن ذلك يؤدي لخفض التثبيط نتيجة انخفاض التأثير الفراغي (E_s) فزيادة طولها فيؤدي لإنفراد إلكترونات من المجموعة (RO) تؤدي لعدم ثبات الإنزيم المفسر .



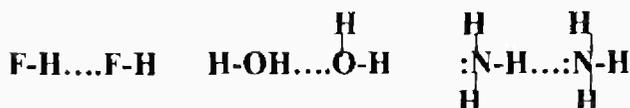
توضح العلاقة الخطية المتحصل عليها عدا للمركبين أيزو بروبيل و ترت- بيوتيل الأكل مناهضة للإنزيم عما في حالة استخدام δ^*

توضح العلاقة الخطية المتحصل عليها أن انخفاض النشاط المناهض للأيزو بروبيل و ترت- بيوتيل ترجع إلى التداخل الفراغي (Steric Interference)

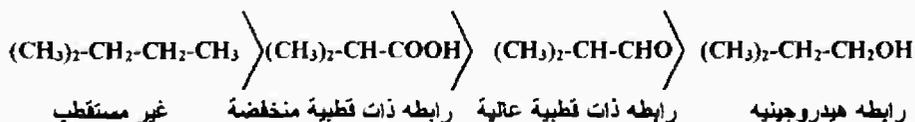
شكل رقم (١٢-٧): العلاقة بين لوغاريتم ثابت التثبيط و ثابت تافت

١١- قوى الارتباط الأيونية :

لقوى الارتباط الأيونية خاصة عند تفاعل مركبات الأكسيم (Oxime) النيوكليوفيليه و التي تسارع على إستعادة نشاط الإنزيم المفسفر (المنشط) مرة أخرى (Recovery) حيث يهاجم جزيئى الأكسيم جزيئى الإنزيم المفسفر من الجانب الإستراتى المفسفر فيرتبط جزيئى الأكسيم بالمنشط الفوسفورى ويترك جزيئى الإنزيم حر مرة أخرى وهو ما سيأتى توضيحه بعد .



فى حين قوى الارتباط الهيدروجينية فهى قوى تجاذب خاصة بين جزيئات قطبية بها ذرات هيدروجين فقيرة فى الكثافة الإليكترونيه ومرتبطة تساهميا مع ذرات صغيرة الحجم عالية السالبيه (الأكسجين والنيتروجين و الهالوجين) حيث يتصرف الهيدروجين كما لو كان يحمل شحنة موجبة بين ذرات سالبة فى جزيئات أخرى وهذا الارتباط يمهّد ليشمل عدد كبير من الجزيئات وترتفع درجة غليان المركبات المحتوية على الرابطة الهيدروجينية بالمقارنة بمركبات أخرى لها نفس الوزن الجزيئى ولكن تفتقد وجود الرابطة الهيدروجينية :

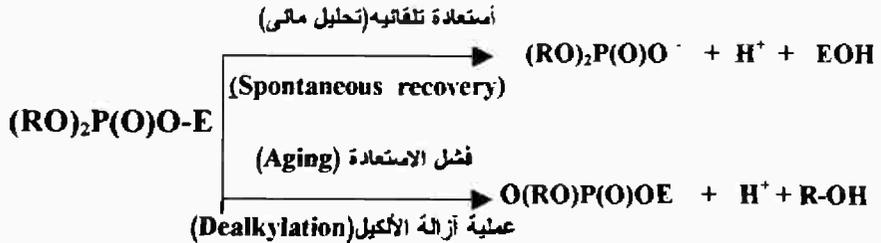


الإستعادة التلقائية والإستعادة بالمنشطات (Spontaneous recovery & Activators regeneration)

إن قوة التثبيط و بالتالى سمية جزيئات السموم الفوسفورية العضوية وكذلك السموم الكرباماتية العضوية تعتمد على ثبات المعقد الوسطى (Acyl enzyme intermediate: inter mediated complex) ومعدل تكوينه مع الأخذ فى الإعتبار أن جزيئات الإنزيم المفسفر تميل لأن تكون أكثر ثباتا عن مثيلاتها المكرمة و التى تعتمد بكليهما على طبيعة المجاميع المتصلة بالفوسفات وعلى نوع الأنزيم .

ففترة نصف حياة الأنزيم المفسفر (داي ميثيل فوسفوريك كولين استيريز) بكرات الدم الحمراء للفئران ٢ ساعة و بالأرانب ٧٢ ساعة
 وفترة نصف حياة الأنزيم المفسفر (داي إيثيل فوسفوريك كولين استيريز) بكرات الدم الحمراء للفئران ٥ ساعة وبسبب الإصمان ٣٠ يوم
 وفترة نصف حياة الأنزيم مونو أو داي كلور إيثيل فوسفوريك بيوتريل كولين استيريز بسبب الفئران ٢٠ دقيقة و بسبب الإصمان ٣٠ يوم

وتعتمد درجة الإستعادة التلقائية لنشاط الإنزيم على تركيز أس أيون الهيدروجين حيث تأين المجاميع ذات ثابت التأين (pK) هـى ٦,٩ و ٩,٨ كما يتضح فيما يلى :



وتعتمد الإستعادة التلقائية للإنزيم من فشلها (aging) على الوقت المستغرق الذى يظل فيه الإنزيم مفسفر حيث يدخل الجزيئى فى تفاعلين محتملين :

- أ- تفاعل إستعادة نشاطه مرة أخرى (تفاعل تحلل مائي)
- ب- تفاعل فقد لإحدى أو لإثنين من مجاميع الألكيل وهنا يفشل الإنزيم فى إستعادة نشاطه مرة أخرى حيث المركب المنزوع منه إحدى مجاميع الألكيل أقوى تثبيطا عن المركب المنزوع منه المجموعتين .
- ويتوقف معدل الفشل فى الاستعادة على :
- أ- نوعى مجاميع الألكيل
- ب- نوع الإنزيم فتبلغ فى حاله مركب : داي أيزوبروبيل فوسفوريل كولين استيريز بكرات دم الإنسان الحمراء ٤,٦ ساعة وفي حالة مركب :داي إيثيل فورسفويل استيريز بكرات دم الإنسان الحمراء ٤١ ساعة
- ج- يزيد نسبة معدل الفشل بزيادة مستوى أس أيون الهيدروجين (p H) المتحكم فى المجاميع المتأينه ذات قيم التأين (pK) ٦,٤
- د- يزيد معدل الفشل بزيادة درجة الحرارة فبأرتفاعها من ٣ م° - ٢٥ م° يزداد معدل التأين عشرة مرات .