الباب الثاني عشر

مثبطات الإنزيم العكسية والغير عكسية

وحركية تثبيط الإنزيم

obeikandi.com

obeikandl.com

مثبطات الإنزيم العكسية والغير عكسية

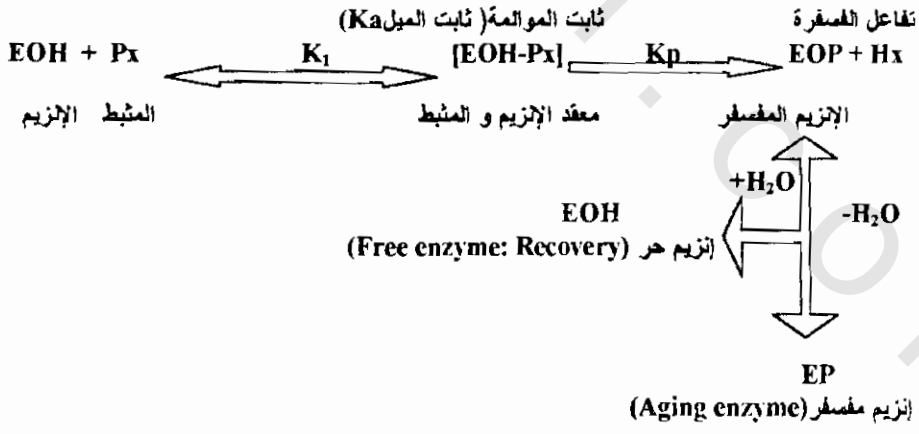
(Reversible & Irreversible Enzyme Inhibitors)

كما سبق نجد أن جزئيات بعض السموم الفوسفورية العضوية (كذلك بعض السموم الكرباماتية العضوية كما سيأتى إيضاحها بعد) كذلك جزئيات السموم والملوثات البيئية المحتويه 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 إزلة الفسفرة (Dephoshorylation constant) المنخفض والمعبر عن معدل إزالة الفسفره وهو ما يجعلها قادره على طى (Tie up) جزئيى الإنزيم .

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

١- عمليه التثبيط العكسية للإنزيم (Reversible inhibition

حيث تكون عملية التثبيط عكسية نتيجة حدوث تثبيط تنافسى (Competitive inhibition) وهنا يتمكن جزيئى الإنزيم المثبط المفسفر أو المكربم من إستعادة نشاطة مرة أخرى (Recovery) حيث تتكسر الرابطة الغير تعاونيه (Non covallent bond) المتكونة فى معقد الإنزيم والمثبط (المعقد العكسى (Reversible enzyme substrate).



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

فالتثبيط العكسى للإنزيم يكون على الأقل فى جزء محتمل يمثل الموقع الأنيونى مما يشير إلى أن المثبطات العكسية ما هى إلا مركبات غير مسقطبة (Non polarized) بروتونية مثل أيونات ايثيل أمين تترا ميثيل أمونيوم و مركب د. تيوبوكيورارين وأحسنها الأمينات الثلاثية (Tertiary amines)أو الأمينات الرباعية (Quaternary ammonium) فالأمينات الأولية والثانوية ليست مثبطات جيده حيث تقص مجاميع الألكيل بها يؤدى لنقص المساهمة بجزء كبير من طاقة ربط الجزيئى المثبط بالموقع الأنيونى لجزيئى الأنزيم .

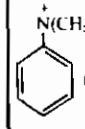
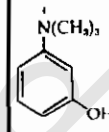
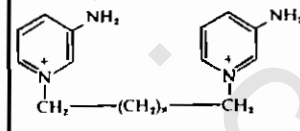
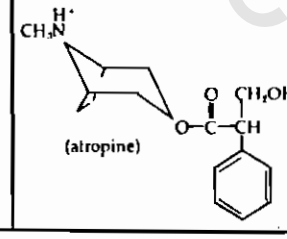
ومن أحسن هذه المركبات تثبيطا المركبات المحتوية منها بجانب مجموعة النيتروجين الموجبة على مجاميع أروماتية تبلغ قوة إرتباطها بالإنزيم ١٢٢ ضعف ميثيل تراى أمونيوم ، جدول رقم (١٢-١) .

أما المركبات الرباعية المتماثلة مثل ديكاميثونيم (Decamethonium) وهى المسئولة عن سمية مركب د. تيوبوكيورارين كسم عصبى فعندما تكون عدد ذرات الكربون n = ١٠ - ١٢ ذرة كربون فإن تثبيط الإنزيم يصل أقصاه ، أما السلسلة المستقيمة من البولى ميثيلين (Poly methylene) حيث المسافة بين مجموعتي النيتروجين ١٤-١٥ أنجستروم وهى نفس مسافة مركب د. تيوبوكيورارين والتى تجعل جهد سمية المثبط عالى .

وتبلغ قوة النيتروجين فى الحقات المشبعة التركيب والتى لها نفس عدد ذرات الأمينات الأليفاتية ويمكنها إعطاء بروتون عند تركيز أس أيون هيدروجين يساوي ٨ وطالما أن النيتروجين الثلاثى بالحلقات الغير مشبعة (N-pyridine) مركبات غير بروتونية قوية عند تركيز أس أيون هيدروجين يساوي = ٧ ولا يحتوى على شحنة لذا فهى مثبطات ضعيفة .

وقد يتحول المعقد العكسى لمعقد آخر هو (E`) وهو معقد مرتبط اشتراكيا بقوة ثابتة (Stable covallently) وثباتها ما هو إلا غير عكسى والذى بدورة يتحول لمعقد أخر هو (E) والذى ينهار ببطىء وينفرد الإنزيم مرة أخرى .

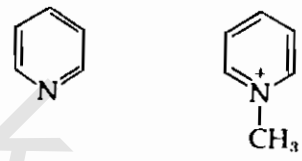
جدول رقم(١٢-١): قيم ثابت الإرتباط للإنزيم الحر (Ki) و (Kai) للإنزيم المأستل لمثبطات عكسية

K_i(M)	K_{ai}(M)	Inhibitor
6.3×10^{-2}	1.1×10^{-1}	HNH_2CH_3
6.3×10^{-2}	1.1×10^{-1}	HNH_2CH_3
2.6×10^{-2}	3.2×10^{-2}	$HNH(CH_3)_2$
4.8×10^{-3}	4.0×10^{-3}	$HN(CH_3)_3$
2.8×10^{-3}	2.0×10^{-2}	$N(CH_3)_4$ (TMA)
1.3×10^{-3}	6.3×10^{-3}	$N(CH_3)_3CH_2CH_2OH$
3.7×10^{-3}	3.6×10^{-3}	$HN(CH_3)_2CH_2CH_2OH$
1.85×10^{-3}	4.3×10^{-3}	$N(CH_3)_3CH_2CH_2Cl$
1.2×10^{-3}	7.6×10^{-3}	$N(C_2H_5)_4$ (TEA)
1.2×10^{-4}	2.0×10^{-4}	$N(C_3H_7)_4$
6.7×10^{-5}	1.4×10^{-4}	$N(C_4H_9)_4$
3.8×10^{-4}	9.0×10^{-4}	$N(C_5H_{11})_5$
5.3×10^{-5}	2.0×10^{-3}	 (PTA)
7.7×10^{-5}	5.7×10^{-4}	
6.3×10^{-7}	1.4×10^{-3}	
5.8×10^{-6}	1.3×10^{-5}	$N(CH_3)_4(CH_2)_{10}N(CH_3)_4$ (decamethonium)
5.2×10^{-8}	—	
4.0×10^{-3}	—	 (atropine)

[a] K_i measures binding to free enzyme; K_{ai} measures binding to the acylated enzyme.

$$EOH + Px \longleftrightarrow [E'OH\text{-}Px] \longrightarrow [EOH\text{-}Px] \longrightarrow EOH + Products$$

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



Pyridine   Methylpyridinium

أما النتروجين الرباعى بالحلقات الغير مشبعة (ميثيل بيريدنيم (methyl pyridinum)) فهى مثبطات جيده وبالرجوع لحركية التثبيط العكسى والمثبطات العكسية والتى تدرس تجلط المثبط مع مادة التفاعل ثم قياس سرعه التفاعل حيث يرتبط المثبط مع الإنزيم الحر كما بالمعادلة التالية :

$$E + I \overset{Ki}{\longleftrightarrow} EI$$

$$EA + I \overset{Ka}{\longleftrightarrow} EAI \longrightarrow EI + Products$$

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

obeikandl.com

$$EA + S \overset{Ka}{\longleftrightarrow} EAS \xrightarrow{\alpha K_3} ES + Products$$

حيث ES قليله وتهمل وتعنى أن Ks تكـون كبـيرة جـدا والتثبيـط العكسى وفى وجود مادة التفاعل وتحت الظروف الثابتة (Stedy state) فإن :

V=[v[1+ [I]/Ki] /[1+Km/[S][1+1/ki] +[S]/Kas + [I/Kai] + [Km/ Ks]

حيث يلاحظ من المعادلة أنه عند تركيزات عالية من مادة التفـاعل فـإن التفاعل لتكوين (EI) قليل جدا ويهمل طالما أن تركيز الإنزيم الحر منخفـض وقيمة [I/Kai] يمكن تجاهلها فإذا كانت مادة التفاعل ضعيفـة مثـل الفينيـل أستيات فان معقد [EAS] لا يتكون كما بالجدول السابق .

وبمقارنة قيمة ki و قيمة Kai بالجدول السابق والتـى تشـير إلـى أن الإرتباط للمثبط العكسى بالإنزيم الحر غالبا ما يكون مختلـف معنويـا عـن الإرتباط بالإنزيم المأستل وعليه فالمثبطات غير العكسـية ومـواد التفـاعل تتفاعل بنفس الميكانيكة (تثبيط عكسى) والذى يمكن أن يحدث خلال التثبيـط الغير عكسى فى حاله تكوين مماكن كما سبق وصفه وهنـا سـوف تختلـف معادلة الحركية بعض الشيء عما سبق شرحة .

٢- عمليه التثبيط الغير عكسية : المثبطات الغـير عكسـية (Irreversible inhibitors)

تتفاعل جزيئات السموم الفوسفورية بنفس الآلية التى يتفاعل بها إنزيـم الأسيتيل كولين استيريز مع مادة تفاعله ولكن كينيتيكية التفاعل تختلـف لأن الإنزيم المثبط ليس متجدد (not regenerated) خـلال الدقـائق أو السـاعات الأولى فيأخذ التفاعل وقت طويل نسبيا قبل مرحلة الحالة الثابتـة وإسـتعادة الإنزيم حرا من المعقد المكربم تكون غالبا أسرع من الإنزيم المفسفر لدرجـة تسمح للوصول للحالة الثابتة بالكربامـات قبـل الفوسـفات ولكـن نجـد أن المعلومات المتحصل عليها تحت ظروف الحالة الثابتة لا تصف قوة التثبيـط (Inhibitory power) والمعتمدة على المعدل الذى عنده يتكون المعقد والمثبـط وعلى درجة ثباته .

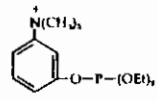
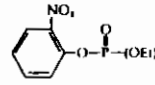
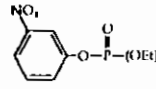
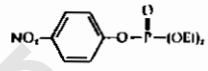
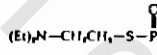
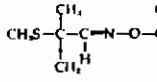
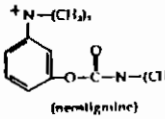
ويقاس معدل تكوين المعقد خلال الفترة الأولية من التفاعل وقبل بدء حدوث الحالة الثابتة ، أما معدل الأستعادة (Regeneration) فغالباً ما تقاس بإزالة أو تخفيف المثبط وبواسطة تعقد الأنزيم الحر مع مادة التفاعل لأجل تثبيط لاحق يقف تأثيره وهنا يقاس معدل الأستعادة غى غياب أى مثبطات لاحقة ، جدول رقم (١٢-٢) .

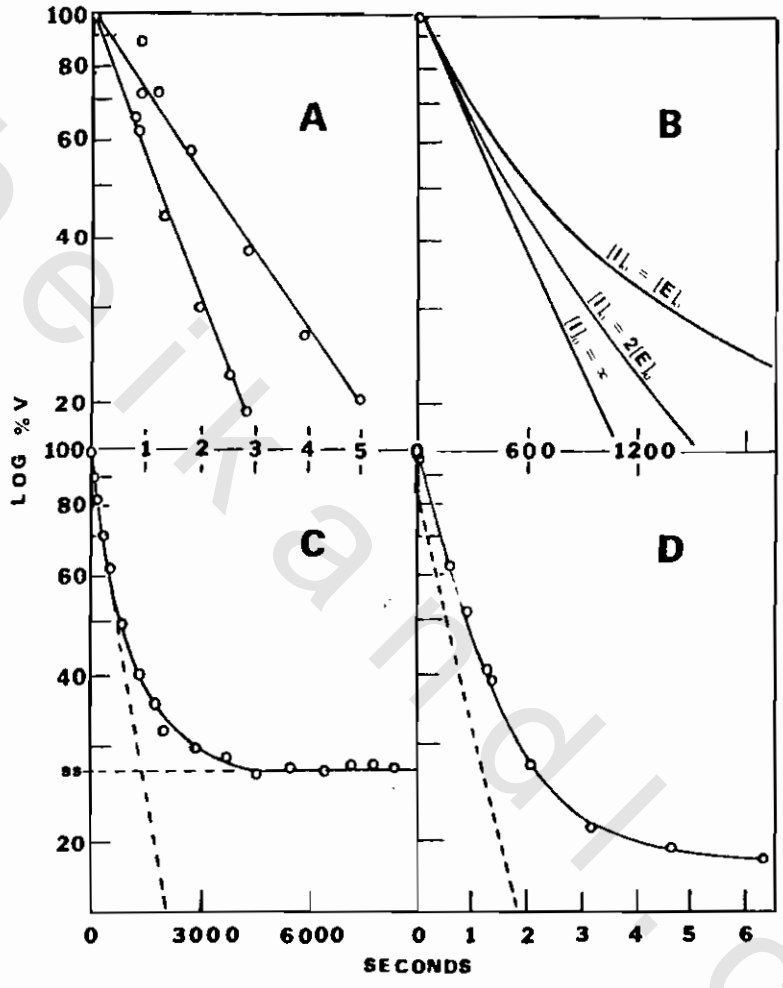
وعند تحضين المثبط مع الأنزيم فإن هناك فترة من الوقت تقاس قبل إضافة مادة التفاعل لقياس النشاط المتبقى من الأنزيم : أى قياس قيمة اللوغاريتم السالب لمعامل التثبيط (pI_{50}) لخمسين فى المائة من النشاط الإنزيمى :

ففى حالة المثبطات العكسية ليست ذات معنى وطالما مادة التفاعل والمثبط والإنزيم اضيفوا و لتقدير قيمة(pI_{50}) لمستوى من تركيزات المثبط المختارة والتى فى الغالب تسبب عدم التثبيط . والتركيزات العالية والمسببة لتثبيط كلى بعد فترة تحضين مع الإنزيم وبتوقيع 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 الجزيئ (Bimolecular rate : ki) لمركب فوسفورى عضوى (Px) يحتوى على مجموعة مفسفرة (Phosphorylating group) تتصل بمجموعة تاركة (x) فتكون معادلة التثبيط (معادلة تفاعل ثنائى الجزيئى بسيطة يتحكم فيها (Ki) .

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

k_p (min^{-1})	K_d (M)	k_i ($M^{-1}min^{-1}$)	Temp. (°C)	المركب Compound	مصدر الإنزيم Enzyme
67	2.7×10^{-4}	2.4×10^{5}	5	Malaoxon	AChE (bovine)
6.6	6.2×10^{-4}	1.1×10^{4}	25	Malaoxon	BuChE (human)
60.7	1.2×10^{-3}	3.4×10^{4}	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^{5}	25	 (phosphostigmine)	AChE (bovine)
3	1.44×10^{-4}	2.1×10^{5}	5		AChE (bovine)
0.81	2.2×10^{-4}	3.7×10^{3}	25		
43	3.6×10^{-4}	1.2×10^{5}	25	 (paraoxon)	
157	2.8×10^{-4}	5.6×10^{5}	5	 (amiton)	AChE (bovine)
90	1.5×10^{-3}	5.8×10^{4}	5	Insecticidal carbamates	BuChE (human)
146	1×10^{-3}	1.6×10^{5}		 Aldicarb	AChE (bovine)
>20	$>5 \times 10^{-7}$	2.2×10^{7}		Carbaryl	AChE (bovine)
0.8	5×10^{-7}	1.6×10^{6}		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^{5}		 (neostigmine)	AChE (electrical)

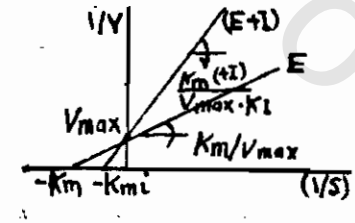


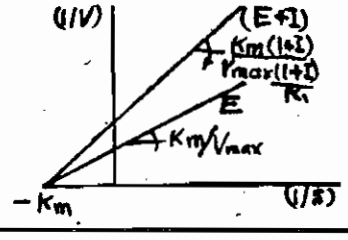
شكل رقم (١٢-٢): منحنيات تثبيط إنزيم الأسيتيل كولين أستيريز .

جدول رقم (١٢-٣): مقارنة بين السموم المثبطة عكسيا والمثبطة غيرعكسيا:

السموم المثبطة عكسيا (الغير مباشرة :تثبيط تنافسى) للإنزيم (Reversible Inhibition: In direct: competitve)	السموم المثبطة غير عكسيا (المباشرة: تثبيط غير تنافسى) للإنزيم Irreversible Inhibition : Direct :Non competitve)
السموم جزيئاتها غير مستقطبة (depolarized)	سموم جزئياتها مستقطبة (polarized)
تؤدى لتثبيط تنافسى وهنا يتمكمن الانزيم من استعادة نشاطة recovery لضعف الموائمة فتقل قيمة k_3	تؤدى لتثبيط غير تنافسى فلا يتمكن الانزيم من استعادة نشاطة مرة أخري aging لكبر الموائمة فترتفع قيمة k_3
تثبط 50% من النشاط الانزيمى بتركز ١٠ $^{-٦}$-١٠ $^{-٣}$ مول	تثبيط ٥٠% من النشاط الانزيم عند تركيز ١٠ $^{-٦}$ - ١٠ $^{-٤}$ مول
جزيئاتها لها اثر باقى قصير short lasting effect	جزيئاتها لها اثر باقى طويل long lasting effect
الانسان والقطط أقل حساسية لها من الارنب	الانسان والقطط أكثر حساسيه لها عن الارانب
العضلات الحمراء أكثر حساسية عن البيضاء	العضلات الحمراء أقل حساسية عن البيضاء
تؤدى لشلل إرتخائىflacid paralysis	تؤدى لشلل سبازمي spasmic paralysis
تناهض إنزيم الكولين استيريز	لا تضاد انزيم الكولين استيريز
ينشط فعلها dotypocumarine و يضاد فعلها edrophorym و أيونات الكالسيوم	ينشط فعلها edrophorym و أيونات الكالسيوم
يتشابه المثبط التنافسى مع ماده تفاعل الانزيم واللذان يتنافسان على مراكزة النشطة فلا تتأثر السرعه القصوى Vmax بوجوده وعند تواجده تقل السرعه وتزيد قيمة 1/v ويمد الخط على إستقامته يعطي 1/Km جديدة أكبر من 1/Km1 و بنهاية التحليل تكون قيمة Km عالية بالمثبط عن قيمة Km1 و يتلاقي المنحنيان في نقطة هي Vmax	حيث إضافة كمية زائدة من مادة التفاعل لا تصل سرعة التحلل إلي أقصاها و لكن بزيادة المثبط تصل السرعة القصوي للصفر و يتلاقي المنحنيان في نقطتان و ذلك لتأثير المثبط علي التركيب التكويني للإنزيم و لا يؤثر علي قيمة Km لتأثيره علي السرعة القصوي فيصبح : Vmax = 1/Vmax[1+I/KI] Slope= Km/KVmax =[1+I/KI] فتأثير المثبط هو خفض تركيز الإنزيم : Ki = I/ [Vmax /Vi+1]

obeikandi.com





كينيتيكية(حركية) تثبيط إنزيم الأسيتيل كولين استيريز

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

$$\underset{\text{الأنزيم}}{EOH} + \underset{\text{مثبط فوسفورى}}{P\text{-}x} \xrightarrow{Ki} EP + x\text{-}OH$$

$$-d(EP)/dt = [(EP) - d(E.)]/dt = d(E)/dt$$

$$-d(E)/dt = Ki(E.) - (EP)(E.)$$

وعندما تكون :

$(E) = (E.) - (EP)$ تنتج المعادلة التالية :

$$(E.) = E + (EP)$$

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

$EP = 0$ عندما : t = صفر وعليه فإن :

$EP = E.$ عندما : $t = t.$

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

ويمكن قلب (convert) المعادلة السابقة لصورة يمكن منها تجريبيا قياس قيمة السرعة الإبتدائية $V.$ وكذلك قيمة السرعة V وذلك بإحلال $[V./V]$ بدلا من $[E./EP - EP]$ وهو ما يحدث عندما تكون :

$$E = (EP) - E.v.$$

$$Ln\ V./V = Ki\ (I).t$$

obeikandi.com

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

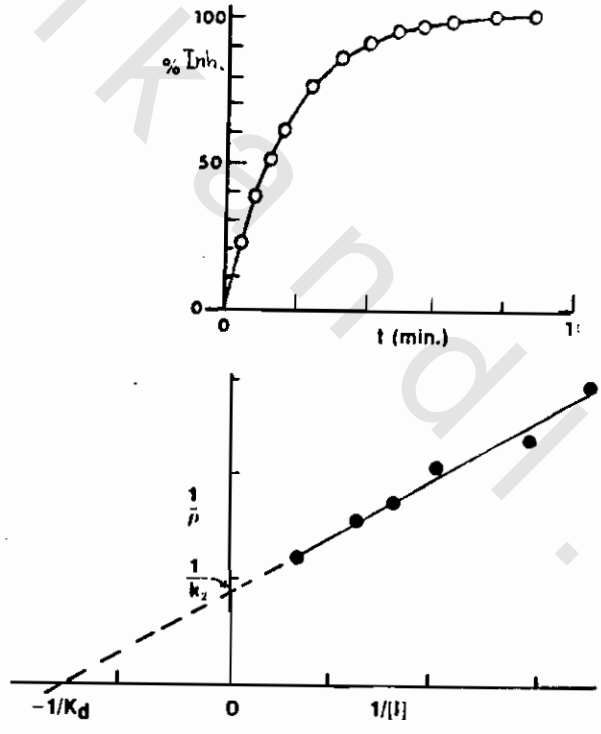
$$[I] = [E.] = [I.]$$

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

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

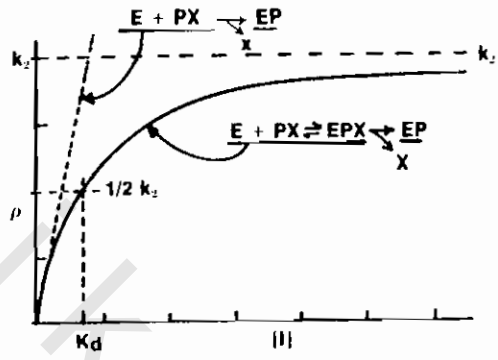
$$Ln\ V = -Ki\ [I].t + Ln\ V.$$

و بتوقيع قيم Ln V مقابل t نحصل على خط مستقيم ميله -K[I] ويمكن منه تقدير قيمة Ki .



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

و أى قيمة لتثبيط ٥٠ % من نشاط الإنزيم سوف تقترب مـــن ٤×١٠ -٨ مول وربما يحتمل أن يكون تركيز المثبط و لا يتم تجاهله وهنا فإن التفـــاعل يتبع كينيتيكية من الدرجة الثانية كما فى الشكل التالى رقم(١٢-٤)



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

وتكون قيمة تثبيط ٥٠ % بالمثبطات القوية تقريبا من تركـــيز الإنزيـــم تحتاج لفترة ١٥ دقيقه و التفاعل تنافســـى :تثبيـــط تنافســـى Competitive) : inhibition)

$$P = \text{Ln}\, V / V.t = Ki\,[E]$$

و القيمة : Ln V / V. t تعنى معنى تجريبى كقيمة ل P

ثابت الميل و الأستله (Affinity and Acetylation constant)

للتأثيرات الفراغية للتركيب البنائى الفراغي (Structure configuration) لجزيئ المثبط تأثيره على مدى إحتماليه الإنطباق لجزيئـــى المثبـــط علـــى الموقع النشط بالإنزيم وتكون المعقد المرتبط العكسى :

$$EOH + P\text{-}x \underset{\text{ثابت الأتزان المتحكم فى الأرتباط}}{\overset{K_d}{\rightleftharpoons}} Epx \xrightarrow[\text{ثابت معدل الفسفرة}]{} EP$$

ويفترض عدم تكسر (EP) ليعطى الإنزيم حر مرة أخرى وهو ما يمكـــن حدوثه فى الدقائق الخمسة الأولى من التفاعل حيث أن عمليه إزالة الفســفرة (ثابت إزالة الفسفرة K_3) تستغرق وقت أقل من الوقت المستغرق فـــى ثـــابت 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 Kd مـــن معادلـــة بقاء المادة :

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

وبحل المعادلة لقيمة [EPX] :

$$P = Ln [V. / V] / t = K_2 / 1 + K_d/[I]$$

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

ولتوضيح هذه المعادلة مقارنة بمعادلة ميخائيل و منتن وبإحلال **P** مع v و K_2 مع **V و** K_d مع , Km و **1 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) :

$$1/P = K_2 / K_d[I] / 1/K_2$$

وبتتبع القاطع $1/K_2$ فإذا كانت قيمة [I] أقل بكثير من K_d فإنه بتوقيعها لا تعطى قواطع ولكن يظهر بدورة بنقطة الأصل على الامتداد (Extrapolation)

وتعتمد قوة المثبط الفوسفاتى على طريقه الإرتباط و سرعة فسفرة الموقع النشط و الذى ينعكس بواسطته K_d و K_2.

و العلاقة بين K_d و K_2 بالمعادلة السابقة وقيم **Ki** بالمعادلة يمكن إظهارها باعتبار أن [I] أكبر أو تساوى **kd** وبالرجوع للمعادلة :

$$P = Ln [V. / V] / t = K_2 / 1 + K_d/[I]$$

و التى يمكن إختصارها الى :

$$P = K_2/K_1 [I] = K_i [I]$$

و عندما تكون [I] أقل كثيرا من K_d :

$$Ki = K_2/K_d$$

أى أن قوة التثبيط الفوسفاتي تعتمد على كل من قيمتى K_2 و K_d حيث أن **Ki** معدل التثبيط الكلى

التثبيط فى وجود مادة التفاعل والمثبط العكسى :

$$EOH + Px \longleftrightarrow [EOH\text{-}Px] \longrightarrow EOP + Hx$$

$$EOH + A.Ch \longleftrightarrow [EOH\text{-}A.Ch.] \longrightarrow EOA + Ch.OH$$

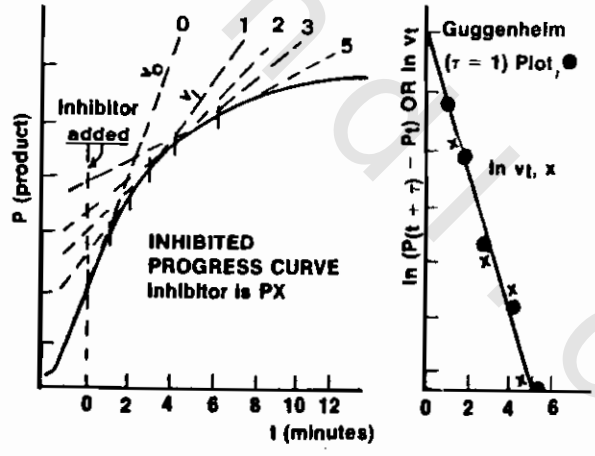
$$EOA \xrightarrow{HOH} EOH + AH$$

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

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

وهى معادلة مماكنة لوصف التثبيط التنافسى النقى.

وللحصول على قيمة P يستخدم منحنى تقدمى لمادة التفاعل حيث الخطوط المتكسرة هى ظل ميول منحنى النمو التثبيطى التقدمى حيث يعطى السرعات V_1 و V_2 بالنسبة للوقت t_2 و t_1 بعد بدء التثبيط ويمكن تفسير المنحنى بإستخدام (Guggeheim plot) حيث P أقصى تركيز للناتج المتكون فى الوقت t . وكما هو متوقع من توقيع المعادلتين السابقتين فإنهما يعطيا نفس الميل ولتقدير k_1 k_2 فإن Km 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 بإختلاف تركيبها الكيميائي و البنائي ، فالمركبان التاليان على سبيل المثال يختلفان عن بعضها فى مجموعة ميثيل فقط بالحلقة العطرية بالوضع ميتا 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) وثابت التثبيط (ki)) وسجلت النتائج و التى لوحظ منها ما يلي :

- تقارب قيمة ثابت الفسفرة بكلا المركبين على كلا الكائنين
- قيمة ثابت التثبيط للمركب على الكائن (أ) عشرة أمثال الكائن (ب) وعليه يمكن أخذ قيمة ثابت التثبيط (K I) كمقياس على درجة التثبيط كما أوصى العالم ألدريدج (Aldridge)
- ميل المركب (k a) لإنزيم الكائن (ب) > من ميل الكائن(أ) رغم تساوى ثابت الفسفرة تقريبا (Kp) لكل منهما أى أن زيادة السمية ترجع أساسا لدرجة الميل وهى الخطوة السابقة لعملية الفسفرة أثناء تكوين معقد الإنزيم والمثبط الفوسفورى حيث إفترض العالم M ain المعادلة التالية :

$$E_{(e)} + I_{(I)} \longleftrightarrow |EI| \longrightarrow EI$$

الأنزيم   المثبط   معقد الأنزيم و مادة تفاعله   أ نزيم مثبط

حيث : $e = e. - (r\text{-}q)$

وبفرض حدوث إتزان بين الإنزيم والمثبط فإن معدل التغير فى تركيز الإنزيم المثبط (r) = صفر

$$dc/dt = K_1(e. - r - q)^{i} - K_{-1}(r) - K_2(r) = c = r$$

$$K_1 = (e-q)^{I} = K_1(r)(I) - K_2(r) - K_2(r) = r\,[\,K_1(I) + K_1K_2\,]$$

obeikandl.com

حيث قيمة (k_2) أثناء الفسفرة المباشرة (القوية) تكون صغيرة جدا

أى أن : $K_1 + K > K_2$

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

$$r = K_1 (e. - q)^i / K_1 (Ki) i + K_{-1}$$

وبقسمة البسط و المقام على (K_1) و أحتمالية حالة إتزانهما :

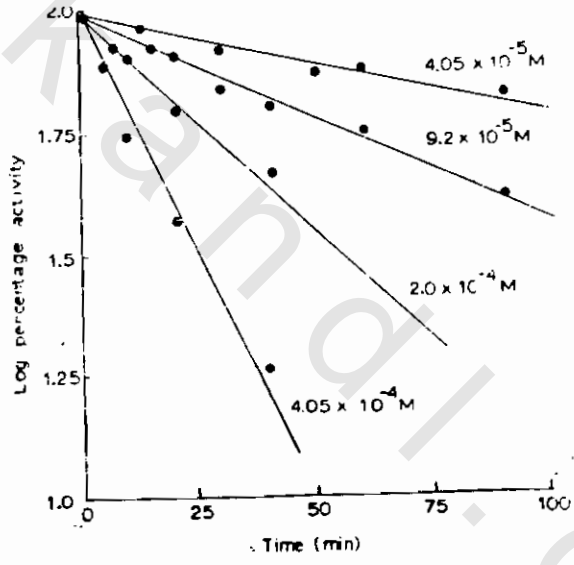
أى معدل تكوين النواتج = معدل التفاعل العكس

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

ثابت الاتزان = ثابت الميل = ثابت التحلل $K_a = cl/r = (K_{-1}) / K_{-1}$

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

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



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

وعندما يكون تركيز الإنزيم المرتبط (r) >> تركيز الإنزيم الحــر(e)
فإن قيمة تركيز (r) لا تتغير كثيرا :

$$dq/dt =[K_2(i) / Ka + r] (e. - q)= Const. (e. - q) =Const. dt$$

وبتكامل المعادلة بين الحدين (q_1 , q_2) والزمن بين (t_1 , t_2)

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

إذن قيمة (e. –q) تتناسب و سرعة تفاعل الإنزيم (V) مع مادة تفاعله :

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

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

وبالرجوع لمعادلة Main وقسمتها على $2.3\,\Delta log\,V$

$$2.3\,\Delta log\;V = K_2 (i) . \Delta / i \;(K_a)$$

$$I + K_a = K_2 (i) . \Delta / 2.3\,\Delta log\;V$$

وبقسمة المعادلة على $K_2 (i)$

$$\Delta t / 2.3\,Log\;V = K_2 (i) . \Delta t / 2.3\,\Delta log\;V$$

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

فإذا حدث تفاعل بين جزيئى السم (المثبط) و جزيئى الإنزيـــم ووصـــل التفاعل لحالة إتزان يعقبها حاله فسفرة فما هى قيمة (k I) التى تحصل عليـــها Aldridge

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

وعند تساوى سرعة التفاعليين $(V. = V_1)$ فإن to=صفر فإن $t_2 = t_1$ و $V_2 = V_1$
وبفرض أن تركيز المثبط صغير جداً عن (Ka) فإن :

$$2.3\,\Delta log\;V / V. \quad + K2 / K\,a\,(i)\,(t)$$

$$Ki = K2 / Ka$$

$$2.3\,\Delta log\;V / V = Ki \,.\, t$$

وهى معادلة ألدريدج

العوامل المؤثرة على معدل الفسفرة:

مما سبق يتبين أن جهد التثبيط الكلـــى للفوســفات (Total inhibition) يقاس بواسطة ثابت التثبيط (K i) والناتج عن مدى الموائمـــة (الميــل : Affinity : Ka) و المؤثر بدورة على ثابت الفسفرة (Phosphorylation constant) .

$$EOH + P\text{-}X \underset{}{\overset{Ka}{\longleftrightarrow}} [EOH.Px] \xrightarrow{K2} EOP + Hx$$

$$\longleftarrow\!\!-\!\!-\!\!-\; K\ i \;-\!\!-\!\!-\!\!\longrightarrow$$

حيث يبدأ التثبيط بهجوم إليكتروفيلى لذرة الفوسفور على هيدروكســيل حمض السرين بإنزيم الأسيتيل كولين استيريز وعليه فإن الإحتياج لفاعلية أو لمقدرة الإستبدال الإليكتروني الساحب للإلكترونـــات (Electron with drawing) وهو ما يعبر عنه بالتأثير الايجائى (الحثى) السالب (Iductive effect : -I) و الذى يقوم بسحب الكثافة الإليكترونية تجاهه بعيدا عن ذرة الفوســفور بنــواة جزيئى المركب فتزداد إليكتروفيلية ذرة الفوسفور أى الشحنة الموجبة جزئيــا عليها وهو ما أمكن إثباته فكلما زادت قوه الإليكتروفيلية (الشــحنة الموجبــة) بإستبدالات ذات طبيعة ساحبة للإليكترونات (I -) وفى وضع معين بالجزيئى كلما زادت حساسية ونجاح الهجوم الاليكتروفيلى لذرة الفوسفور وهو ما عــبر عنه العالميين Aldriage & Davison بحساسية ذرة الفوســفور نفســها لــهجوم مجموعه الهيدروكسيل السالبة بحمض السرين أى حساسية الجزيئى للتحلـــل القلوى والذى أمكن التعبير عنه فيما بعد بثابت هامت (Hammet.s constant : δ) لقياس التأثيرات الإستبداليه للمجموعة الساحبة للاليكترونـــات أى المجموعـــة ذات التأثيرات الاليكترونيه (Electronic effects) خاصة عند ما يتـــم إحلالــها لمجموعة آروماتية تتصل بذره فوسفور ليكتروفيليه :

obeikandi.com

وعليه فالعوامل التى قيمة معدل ثابت الفسفرة لها (k_2) فى مدي القيمة المثلى و التى بدورها تزيد صفه الإليكتروفيلية لذرة الفوسفور للدرجة القصوى للإستبدال تؤدى لزيادة التثبيط والمناهضة للإنزيم :

١- الاستبدال بارا نيترو على حلقة الفينيل وعلاقتة بالسمية :

يعد الإستبدال بارانيترو بحلقه الفينيل إستبدال ساحب للاليكترونات I يؤدى لسحب الإليكترونات تجاهه فتزداد درجة حموضة الحلقة هذا علاوة على عامل الرنين بالحلقة فى نفس الوقت تزداد درجة إليكتروفيلية ذرة الفوسفور فتتيح الهجوم الإليكتروفيلى لذرة الفوسفور على مجموعة هيدروكسيل حمض السرين بالإنزيم فيتفسفر (Pphosphorylated enzyme) فإدخال حلقه الفينيل نفسها بالمركب تزيد من درجة حموضة المركب و بالتالى درجة سميته ولكن يجب الأخذ فى الإعتبار بأنه لا تزيد درجة حموضة الحلقة عن حد معين حتى لا يؤدى ذلك لكسرها و إنهيار المركب (Degradation) فى نفس الوقت فان زيادة حموضة المركب ككل تؤدى لزيادة إليكتروفيلية ذرة الفوسفور فتزداد درجة مناهضة الجزيئى السام للإنزيم (Anti cholinesterase)

٢- مكان وضع المجموعة الساحبة وعلاقتها بالسمية :

لمكان أو وضع المجموعة الساحبة للالكترونات تأثيره على معدل الفسفرة و بالتالى على زيادة درجة سمية المركب :

فالوضع بارا : أقوى من الوضع ميتا والوضع ميتا أقوى بدورة من الوضع أورثو:

الوضع أورثو < الوضع ميتا < الوضع بارا

أتجاه انخفاض التأثير الحثى (I-) نتيجة تغيير وضع المجموعة الساحبة على الحلقة

حيث يشير السهم إلى إتجاه انخفاض التأثير الحثى وهو نفسه إتجاه إنخفاض السحب الإليكترونى (الإليكتروفيليه) حول ذرة الفوسفور وهو ما يعنى إتجاه إنخفاض الهجوم الأليكتروفيللى لنواة المركب على الأنزيم وهو فى نفس الوقت أتجاه انخفاض المناهضة للإنزيم (الفاعلية البيولوجية : السمية) .

ومن الجدير بالذكر فى هذا الصدد الإلمام بـــترتيب المجـــاميع المختلفـــة الساحبة للإليكترونات تنازليا كما يلى :

$$=S< RC=<N=<R_2C= < RN- < CO < RN=< (R)_2N < NO2 <R_3N$$
$$I < Br < Cl < F < RO(R_2)N$$
$$CH_3 < NH_2 < OH < F$$
$$RS < RO < O$$
$$SH < OH < S < O$$
$$CH_3 < C_2H_5 < CH(CH_3)_2\ CH_3O$$

٣- التنشيط الكيميائى لذرة الفوسفور (Chemical activation) :

يعد التنشيط الكيميائى هو الصفة الأكثر أهمية لتقدير النشاط المنـــاهض للإنزيم لأى نواة إستر فوسفورى وهو ما يقاس بكثافة توزيع الشحنة الموجبـــة على ذرة الفوسفور (Formal charge) والذرات المجاورة لـــــها بثـــابت هـــامت (Hammett,s costant : δ) حيث تزداد قيمتة فتزداد قوة التنبيط و بعلاقة خطيه .

فمركب الباراثيون (إستر فوسفو ثيونات) ضعيف المناهضة للإنزيـــم ولكن بتحوله للمماكن باراكسون (Paraoxon) : أستر فوسفو ثيـــولات (Phospho thiol ester) تزداد قوة مناهضتة لزيادة الشحنة الموجبة على ذرة الفوســـفور و إرتفاع قيمة ثابت هامت .

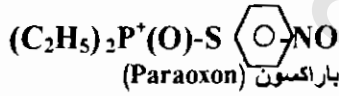
و فى نفس الوقت نجد أن حسابات المدار الجزيئى (Molecular orbital) تشير للشحنة الموجبة و الملازمة لذرة الفوسفور فى الباراكسون إلى ســـرعة تحللة عن الباراثيون وهذا التوافق بين كثافة الشحنة وقوة التنبيط و التى تتفـــق وآلية التنبيط النيوكليوفيلي (هيدوركسيل حمض السرين بـــالإنزيم) بـــالموقع النشط بسطح الإنزيم المهاجم بذرة الفوسفور الإليكيروفيليه .

وعلية فأرتباط جزيئى السم بمجموعات من شـــأنها أن تـــؤدى لصفـــات إليكتروفيلية قوية مما يجعلها أكثر حساسة لهجوم نيوكليوفيلى فيصبح الجزيئى أقوى فى التنبيط وهو ما ينسجم ويتماشى مع العلاقة الملاحظة بيـــن النشـــاط المناهض للإنزيم وثابت هامت للأستبدال فى الحلقة العطرية وهو ما توضحـــه النتائج فى الجدول التالى رقم (١٢-٤) وعليـــة فالإســـتر ذو قيمـــة (Super

(Delocalizability : Spn) يكون أكثر مناهضة للانزيم لإرتباطه القوى به وذلـــك لإرتباط قيمة (Spn) مع التحلل المائى القلوى

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

المركب	ثابت هامت	لو $1/I_{50}$	المركب	ثابت هامت	لو $1/I_{50}$
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 بيوتاين	٠,١٢-	٦,٠٥
بارا-ميركابتو	٠,٠٥-	٤,٤٨	ميتا-تراى ميثيل امين	٠,٢١-	٦,٤٠
بارا-ترت بيوتاين	٠,٢٠-	٤,٠			



باراثيون (Parathion)

باراكسون (Paraoxon)

إتجاة زيادة ثابت هامت (δ) أتجاة زيادة الصفات الاليكتروفيليه أتجاة زيادة قوة المناهضة للأنزيم ◄

إتجاه زيادة درجة الثبات الكيميائي

ولقد لوحظ أن المعاملة المسبقة بإحدى أفـــراد مجموعـــة الســـيكلوداينات السامة مثل مركب الألدرين (Aldrin) ثم المعاملة بأفراد مختلفة من الســـموم الفوسفورية العضوية أدى لتأثير متداخل مضاد (Antagonistic interaction) وهو ما يتضح من الجدول التالى رقم (١٢-٥)

obeikandl.com

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

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

وهو أيضا ما تم إيضاحه بالجدول التالى رقم (١٢-٦) و لكن لتأثير هـــذه المعامله خارج الجسم (In - vitro) على بلازما الدم ،.

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

المعاملة	باراكسون (٥٠ ميكرو جـــرام/ ملل بلازما)	% للباركسون المرتبط	% للباراكسون الحر	% للكولين استيريز المثبط
الكونترول	١٠٦	٨٦,٢ ± ٤,٣	١٣,٩ ± ٤,٣	٨٤,٢ ± ٥,٨
المعاملة بالألدرين	١٠٦	٩٩,٤ ± ٠,١	٠,٦ ± ١,٠	٤٠,٢ ± ٣,٤

ولقد أدت النتائج السابقة إلى دراسة وتجريب أكثر من مركب كلورينـــى أخر مثل مركب الـــددت (DDT) و الديلدريـــن (Dieldrin) و الكلـــوردان (Chlorodan)على سمية الباراكسون (المشتق التأكسدى الأكسيجينى لمركـــب

البـــاراثيون (فوســـفوثيونات) و التـــى أدت لانخفـــاض مســـتوى الســـميه بالباراكسون وذلك لانخفاض التثبيط الانزيمى جدول رقم (١٣-٧) :

جدول رقم (١٢-٧) : العلاقة بين الإرتباط بالبلازما (خارج الجسم) وسمية المشتق الأكسيجينى باراكسون فى الفئران الصغيرة المعاملة مسبقا بأى من المبيدات الكلورونية التاليه :

المركب (ملليج / كج)	% للموت للباراكسون (٢ملليج /كج)	% الحر للباراكســـون فى البلازما
كونترول	٦٠	١,٩±١٧,٣
ددت (٧٥)	٤٠	٤.٩±٧,٤
دبلدرين (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 تكـــون أكـــثر مناهضة للإنزيم عن السلسلة الطويلة أو المتفرعة والمماثلة لها فى نفس عـــدد ذرات الكربون إلا أنها فى نفس الوقت تكون أكثر ثبات :

$(CH_3)_2P(O)O_A.Ch.E.$ > $(CH_3)CHO\ P(O)O_A.Ch.E.$ > $(C_2H_5)_2P(O)O\text{-}A.Ch.E$

أقوى التركيبات البنائيه مناهضة لأنزيم جلوتاميك -كب- ترانسفريز المزيل لمجموعة الألكيل

ذو قوه مناهضة متوسطة وترجع لثبات أيون الكربونيم (Carbonium ion)

أتجاة زيادة قوة المناهضة لأنزيم الكولين استيريز

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

٥- نوعية الإستر الفوسفورى و علاقتة بالسمية :

فالإستر الفوسفاتى (Phosphate ester) أكثر تنشيطا ومناهضة من الإستر الفوسفونى (Phosphonic ester) و الأخير بدورة أكثر مناهضة من الإستر الفوسفينى (Phosphinic ester) :

$$(RO)_2P(O)O_x \rangle (RO)_2P(O)_x \rangle (RO)RP(O)_x \rangle (R)_2P(O)_x$$

إستر فوسفاتى (Phosphate ester)	إستر فوسفورى	إستر فوسفونى (Phosphonic ester)	إستر فوسفينى (Phosphinic ester)

٦-أكسدة كبريت السلسلة الجانبية:كبريت الميركابتو (M ercapto sulphur) :

تؤدى أكسدة ذرة كبريت السلسلة الجانبية إلى تحول المركب للمشتق التأكسدى الأول: سلفوكسيد (Sulfoxide) الأكثر سمية والأقل ثباتا عن المركب الأصلى وبزيادة درجة الأكسدة يتكون المشتق التأكسدى الثانى سلفون (Sulfone) الأكثر من سابقه سمية وأقل ثباتا منه .

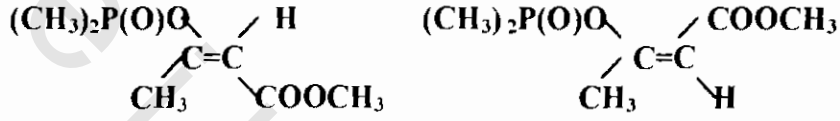
حيث تعزى الفاعلية البيولوجية :السميه : المناهضه للأنزيم بزيادة درجة الأكسدة إلى تأثير الرابطة (-S-) و تحولها إلى [-S(O)-] ثم إلى[-S(O)O-] على الترتيب وقدرتها على سحب الإليكترونات بعيداً عن ذرة الفوسفور .

٨- التشابه الهندسى وأثرة على معدل الفسفرة والسمية:

تتفاوت درجة الفاعلية البيولوجية (درجة السمية و المناهضة للإنزيم) بإختلاف نوعية التشابه الهندسى الموجود بالمركب :

فالمشابه مضاهى (Cis) مفينفوس (cis- mevinphos) أكثر مناهضة وسمية للإنزيم عن المشابه مخالف (Trans) مفينفوس حيث تبلغ قوة تثبيطه الإنزيمى ٢٠ ضعف سمية المشابه مخالف .

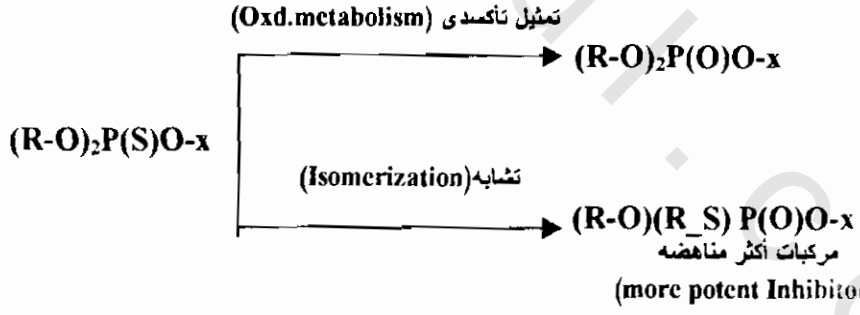
وبالرجوع للتركيب الفراغى للجزيئى بكلتا المتشابهين نجد أن المسافة بين الموقعين الموجب والسالب بالمشابه مضاهى هى ٤,٥-٤,٩ أنجستروم وهى أكثر تماثلا بالنسبة للمسافة بين الموقعين الإستراتى و الأنيونى بالإنزيم فى حين هذه المسافة بالمشابة مخالف (Trans) تبلغ ٢.٢-٢,٤ أنجستروم



مضاهى مفينفوس
(cis- mevinphos)

مخالف مفينفوس
(trans- mevinphos)

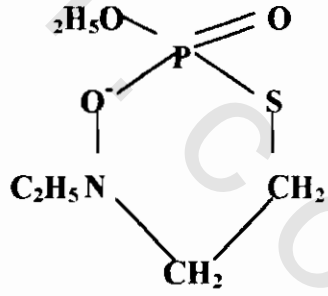
كذلك تؤدى عملية الأكسدة الخفيفة إلى حدوث عملية تشابة (Isomerization) للمشتق ثيونو فوسفات (Thiono phosphate) ذو الرابطة ذات الصفات الإليكترونية العالية و الأقوى فى درجة مناهضتها للإنزيم :



٩- الأكسدة (Oxidation)

تؤدى أيضا عمليات التمثيل لتكوين مشتقات أكسيجينية أخرى (Oxygen derivatives) و التى تؤدى لخفض صفات الإليكتروفيليه لذرة الفوسفور فتضعف فاعلية المركب كمناهض للإنزيم وإفتقار الهجوم الإليكتروفيلى لذرة الفوسفور .

فبعد نزع مجموعه الميثيل المرتبطة بذرة الأكسيجين (De methylation) تنخفض فاعلية المركب بحوالى ٦٦٥٠٠٠ مرة عن المركب الأصلى أى تنتهى مناهضتة للإنزيم تقريبا (Abolish Anti cholinesterase) كذلك الحال مع مركب الأميتون (Amiton) عند إزالة الألكيل المعلق بذرة الأكسيجين إنخفضت سميته إلى ١٧٩/١ عن سمية الأميتون ويرجع ذلك لتحول المركب للشكل الفراغى الحلقى الغير ملائم للإنطباق على سطح الأنزيم :



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

تعد معايير التنشيط (Reactivity parameters) غير كافيه بمفردها للإمداد بحسابات دقيقه عن النشاط المناهض للإنزيم حيث وجد أن للتأثير الفراغى لبنائية جزيئى المركب أثر كبير على تثبيط و مناهضة الإنزيم حيث الإرتباط القوى بين التأثير الفراغى لبنائية جزيئى المركب أثر كبير على تثبيط الأنزيم حيث الإرتباط القوى بين التأثير الفراغى للجزيئ وفاعليته و بإستخدام تحليل الإنحدار لبيانات الجدول رقم (١٢-٨) والموضح بالشكل رقم (١٢-٧) :

r s n

لو ١/I50 = ٣,٤٥ δ +٦,٣٠٩ حيث: ٦ ٠,٥٠٧ ٠,٩٥٤ لسلسلة إستبدالات بالوضع بارا

لو ١/I50 =١,٥٥٧ δ +٥,٨٠٦ : ٥ ١,٣٨٣ ٠,٤٧٩ لسلسلة 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 δ = صفر للمشتق بارا) :

لو ١/I50 =-١,٠٦ Es +٢,١٩ δ P- ١,٤٠x ٥٧٧

١٢: ٠,٢٨٥ ٠,٢٨٥لسلسلة أستبدالات بالوضع ميتا

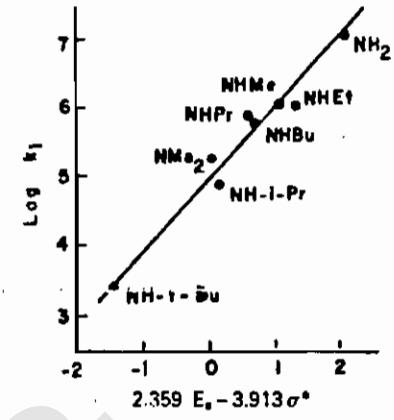
حيث تم الحصول على إرتباط قوى معنوى مع قيم (δ P-) أكثر من (δ) للإستبدال بارا وهذا متوقع طالما أن هذه المشتقات إسترات لفينولات مستبدله ولهذا يؤخذ فى الاعتبار معيار ثابت التأثير الفراغى (Es) ومن المحتمل أيضا حجم المتشابهات ميتا إلى بارا بمعادلة واحدة لإعطاء أحسن النتائج .

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

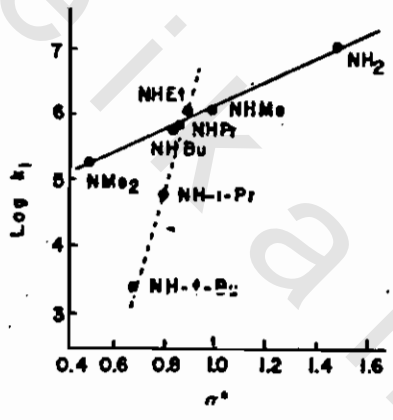
obeikandl.com

نجد أن معدل التثبيط (المناهضة) يعتمد علـــى كـــلا مـــن (Es) و δ* وبأستخدامهما نحصل على أرتباط قوى .

وعليه فالبنسبة لجزيئى المركب التالى ($(RO)_2P(O)x$) نجد أنه يجب وأن تكون مجاميع الكوكسى (RO) صغيرة مثـــل مجـــاميع الميثوكســـى أو الإيثوكسى فزيادة طولها عن ذلك يؤدى لخفض التثبيط نتيجة إنخفاض التـــأثير الفراغى (Es) فزيادة طولها فيؤدى لإنفراد إلكترونات من المجموعة (RO) تؤدى لعدم ثبات الإنزيم المفسفر .



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

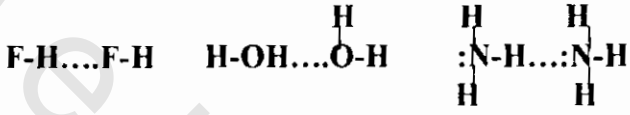


توضح العلاقة الخطية المتحصل عليها عدا للمركبين أيزو بروبيل و ترت- بيوتيل الأقل مناهضة للإنزيم عما في حالة أستخدام δ*

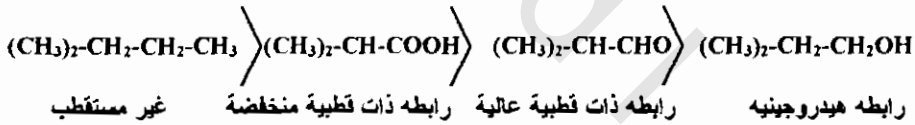
شكل رقم (١٢-٧): العلاقة بين لوغاريتم ثابت التثبيط و ثابت تافت

١١- قوى الإرتباط الأيونية :

لقوى الإرتباط الأيونية خاصة عند تفـــاعل مركبـــات الأكســـيم(Oxime) النيوكليوفيليه و التى تسارع على إستعادة نشاط الإنزيم المفسفر (المثبط) مـــرة أخرى (Recovery) حيث يهاجم جزيئى الأكسيم جزيئى الإنزيم المفســـفر مـــن الجانب الإستراتى المفسفر فيرتبط جزيئى الأكسيم بالمثبط الفوسفورى ويـــترك جزيئى الإنزيم حر مرة أخرى وهو ما سيأتى توضيحه بعد .



فى حين قوى الإرتباط الهيدروجينية فهى قوى تجـــاذب خاصـــة بيـــن جزيئات قطبية بها ذرات هيدروجين فقيرة فى الكثافة الإليكترونيه ومرتبطـــة تساهميا مع ذرات صغيرة الحجم عالية السالبية (الأكسيجين والنيـــتروجين و الهالوجين) حيث يتصرف الهيدروجين كما لو كان يحمل شحنة موجبة بيـــن ذرات سالبة فى جزيئات أخرى وهذا الإرتباط يمهد ليشمل عدد كبـــير مـــن الجزيئات وترتفع درجة غليان المركبات المحتوية على الرابطة الهيدروجينيـــه بالمقارنة بمركبات أخرى لها نفس الوزن الجزيئى ولكن تفتقد وجود الرابطـــة الهيدروجينيه :



الإستعادة التلقائية والإستعادة بالمنشطات
(Spontaneous recovery & Activators regeneration)

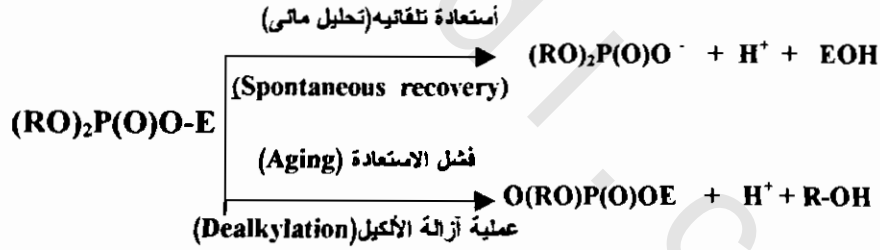
إن قوة التثبيط و بالتالى سمية جزيئات السموم الفوسفورية العضوية وكذلك السموم الكرباماتية العضوية تعتمد على ثبات المعقد الوسطى (Acyl enzyme intermediate: inter mediated complex) ومعدل تكوينه مع الأخذ فى الإعتبار أن جزيئات الإنزيم المفسفر تميل لأن تكون أكثر ثباتا عن مثيلتها المكربمة و التى تعتمد بكليهما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

ففترة نصف حياه الانزيم المفسفر(داى ميثيل فوسفوريك كولين استيريز) بكرات الدم الحمراء للفئران ٢ ساعه و بالآرانب ٧٢ ساعه

وفترة نصف حياه الانزيم المفسفر(داى إيثيل فوسفوريك كولين استيريز) بكرات الدم الحمراء للفئران ٥ ساعه وبسيرم الإنسان ٣٠ يوم

وفترة نصف حياه الانزيم مونو أو داى كلورايثيل فوسفوريل بيوتريل كولين استيريز بسيرم الفئران ٢٠ دقيقه و بسيرم الإنسان ٣٠ يوم

وتعتمد درجة الإستعادة التلقائية لنشاط الإنزيم على تركيز أس أيون الهيدروجين حيث تأين المجاميع ذات ثابت التأين (pK) هى 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 مائى)
ب- تفاعل فقد لإحدى أو لإثنين من مجاميع الألكيل وهنا يفشل الإنزيم فـــى إستعادة نشاطه مرة أخرى حيث المركب المنزوع منه إحدي مجاميع الألكيـــل أقوى تثبيطا عن المركب المنزوع منه المجموعتين ٠

ويتوقف معدل الفشل فى الاستعادة على :

أ- نوعى مجاميع الألكيل

ب- نوع الإنزيم فتبلغ فى حاله مركب : داى أيزوبروبيل فوسفوريل كولين استيريز بكرات دم الإنسان الحمراء ٤,٦ ساعة وفي حالة مركب :داى إيثيل فورسفويل استيريز بكرات دم الإنسان الحمراء ٤١ ساعة

ج- يزيد نسبة معدل الفشل بزيادة مستوى أس أيـــون الـــهيدروجين (p H) المتحكم فى المجاميع المتأينه ذات قيم التأين (pk) ٦,٤

ء- يزيد معدل الفشل بزيادة درجة الحرارة فبأرتفاعها من ٣ مْ - ٢٥ مْ يزداد معدل التأين عشرة مرات ٠

obeikandl.com