وزارة التعليـــــم العـــالـــي والبحـــث العلمـــــي

جامعـــــــة القادسيـــــــة

كليـــــــــة العلـــــوم

قســـم علـــوم الكيميـــاء

دراسة حيوية عن مستوى الانزيمات المضادة للأكسدة لدى المرضى اللذين يعانون الأعتلال الكلوي

بحث مقدم من قبل الطالب

أنمـــار حســـين لفتـــــه

الى مجلس كلية العلوم /قسم الكيمياء / جامعة القادسية كجزء من متطلبات نيل درجة

البكالوريوس في علوم الكيمياء

بإشـــراف

م.م : نـــوال خنطيـــل جبـــار

1439 هـ

2018 م

الآيـــــــــــــــة

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُم مِّنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا (٨٥)﴾

صدق الله العظيم

سورة الاسراء الآيــة ٨٥

أ- الأهـــــــــدا

-الى المعلم الأول ورسول الانسانية النبي الاكرم محمد (ص) والائمة الأطهار (عليهم السلام)

-الى من سهروا وجاهدوا (القوات الأمنية والحشد الشعبي)

-الى من اريقت دمائهم لنحيا بسلام (شهداء العراق)

-الى من ارضعتني الحب
الى من عانت الصعاب لأصل الى ما انا فيه الآن
الى رمز الحنان وبلسم الشفاء
الى القلب الناصع بالبياض..(امي الحبيبة)

-الى من جرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب
الى من كلّت انامله ليقدم لي لحظة سعادة
الى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم
الى القلب الكبير ..(ابي العزيز)

-الى الروح التي سكنت روحي
الى الجسد الذي سكن القبر (اخي الشهيد)

-الى الابتسامة التي لن تغيب
الى الروح الخالدة ماحيينا
الى روح استاذي (د.عباس جواد)

-الى الذين مهدوا لنا طريق العلم والمعرفة
الى الذين قضينا معهم اعوام في رحاب الجامعة (الاساتذة الافاضل)

-الى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة
الى من كانوا يضيئون لي الطريق ويساندوني
الى رياحين حياتـي (أخوتي)

الى كل من علمني حرفاً اهدي هذا البحث المتواضع راجياً من الله عز وجل ان ينال القبول والنجاح.

ب-شكـــــر وتقديـــــــر

" كـن عالمـآ .. فـأن لـم تسـتطع فكـن متعلمـآ , فـأن لـم تسـتطع فأحـب العلمـاء , فـأن لـم تستطع فلا تبغضهم "

بعـد رحلـة بحـث وجهـد واجتهـاد تكللـت بأنجـاز هـذا البحـث ,أحمـد الله عـز وجـل علـى نعمته التي من بها علي فهو العلي القدير

كمـا أتقـدم بالشـكر الجزيـل لأسـاتذة قسـم علـوم الكيميـاء وبـالأخص السـيد رئـيس القسـم المحتـرم "الـدكتور مقـداد أرحـيم كـاظم" لروحـه الابويـة ودعمـه المسـتمر طيلة فترة البحث والدراسة .

كمـا لايسـعني الا ان أخـص بأسـمى عبـارات الشـكر والتقـدير للأسـتاذة الفاضـلة "م.م نـوال خنطيـل جبـار " لمـا قدمتـه لـي مـن جهـد ونصـح ومعرفـة طيلـة فتـرة أنجاز هذا البحث.

كمـا اتقـدم بالشـكر الجزيـل لكـل مـن أسـهم بتقـديم يـد العـون لـي وأخـص بالـذكر أصدقائي وزملائي .

المحتويات

المحتويات 1
الخلاصة 2
اهداف البحث والدراسة 3

الفصل الاول

المقدمة 4
1-1 الكلية 4
2-1 اهم التحاليل الطبية للكشف عن الاعتلال الكلوي 8
3-1 النظام المضاد للاكسدة داخل جسم الكائن الحي 11
4-1 اهم الانواع الاوكسجينية 12
5-1 مصادر الانواع الاوكسجينية 14
1- 6 مضادات الاكسدة 15

الفصل الثاني

1-2 خطوات الدراسة 18
2-2 طريقة العمل 19
3-2 المواد المستعملة 23
5-2 الحسابات 25

الفصل الثالث

1-3 النتائج والمناقشة 26
2-3 الاستنتاجات 28
3-3 التوصيات 29
المصادر 30

ت ـ الخلاصة

يعتبر الاعتلال الكلوي من الامراض المثيرة للاهتمام نتيجة لتزايد عدد الحالات المرضية باستمرار. اعتلال الكلى (Nephropathy) أو (Kidney disease) هو ضرر أو مرض يصيب الكلية والذي يتميز بوجود التهاب نتيجة اسباب عديدة منها كثرة استخدام المسكنات مثل البراستيمول او الاسبرين لفترات طويلة او قصور في انزيم الزانثين اوكسيديز او تكون تكيسات مائية داخل الكلية او ارتفاع ضغط الدم المزمن او قد ينتج بسبب استخدام بعض الأدوية في علاج مرضى السرطان .حيث غالبا ما يصاب المرضى بقصور كلوي حاد.

موضوع البحث يتضمن دراسة تأثير هذا المرض على كفاءة الجسم لمقاومة الجهد التأكسدي الناتج عن الخلل الوظيفي للكلية والذي يؤثر بصورة مباشرة على فعاليات الجسم بصورة عامة.

جمعت عينات مصل الدم من اشخاص سليمين واشخاص يعانون الاعتلال الكلوي حيث تم تعيين مدى الإصابة بالفشل الكلوي من خلال قياس الفحوصات الخاصة بوظائف الكلى (اليوريا, والكرياتينين) في مصل الدم لدى كل من مجموعة الاصحاء والمرضى لتحديد كفاءة عمل الكلية وكذلك التأكد من تشخيص العينات قيد الدراسة حيث كان مستوى كل من اليوريا والكرياتنين لدى الاصحاء والمرضى كما يلي:

B.Urea = 4.3 ± 1.9 mmol/L للاصحاء اما المرضى فكانت 13.8 ± 2.5 mmol/L

S.Creatinine = 96 ± 13mmol/L للاصحاء اما للمرضى فكانت 245± 95 mmol/L

علماً أن القيمة الطبيعية لليوريا (2.5-7.5 mmol/L) وللكرياتينين (61 – 123 mmol/L)

قيمت الحالة التأكسدية لكل من مجموعة الاصحاء والمرضى من خلال قياس فعالية الكاتاليز حيث لوحظ في نهاية الدراسة انخفاضا معنويا في فعالية الانزيم الذي يعكس مدى فعالية النظام المضاد للأكسدة بالنسبة للمرضى الذين يعانون الاعتلال الكلوي في حين ان مستويات فعالية هذا الانزيم كانت ضمن المدى الطبيعي للانزيم حيث كانت فعالية الانزيم في كل من مجموعة الاصحاء والمرضى على التوالي

2.131 ± 0.972 U/ml , 4.821 ± 1.121 U/ml

علماً أن نسبة الأنزيم الطبيعية تختلف من شخص لأخر لكن على الأغلب تتراوح مابين (2.5 – 6.7 U/ml)

أهداف البحث والدراسة

يلعب الجهد التأكسدي الناتج عن زيادة الجذور الحرة وانخفاض فعالية النظام المضاد للاكسدة دورا هاما في تحفيز الاعتلال الكلوي الذي يعتبر مرضا شائعا يهدد صحة الانسان لذلك ركزت هذه الدراسة على قياس فعالية النظام الانزيمي المضاد للاكسدة من خلال قياس فعالية انزيم الكاتاليز الذي يلعب دورا مهما في تعزيز المناعة الذاتية والحد من الالتهابات الناتجة عن زيادة الجذور الحرة المصاحبة للمرض في كل من الأفراد الأصحاء والمرضى الذين يعانون من الاعتلال الكلوي .

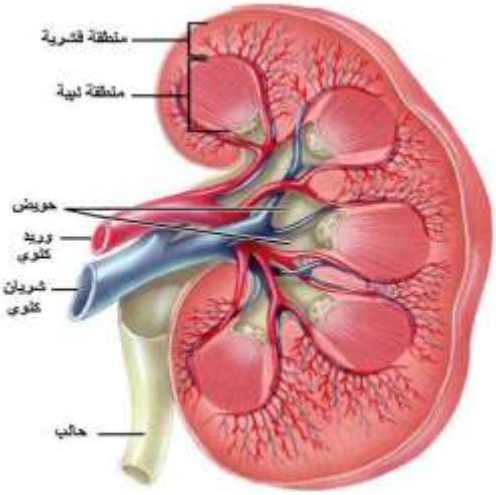
الفصـــــل الأول

المقدمة Introduction

1-1الكلبـــة

هي عضو هام من أعضاء جسم الإنسان شبيه من حيث الشكل ببذرة الفاصوليا لونه بني مائل للحمرة، ولكن حجمها أكبر من بذرة الفاصوليا حيث يبلغ طولها حوالي 12سم، وتعتبر الكلية العضو المسؤول عن تنقية وتصفية الدم من السموم والعوادم الناتجة عن عملية الأيض (هي عملية تكون في داخل الخلية الحية وفيها يتم هدم المواد الممتصة من الطعام مثل البروتينات والدهون وتحويلها إلى طاقة يستفيد منها جسم الكائن الحي)، وكذلك مسؤولة عن التحكم في حجم السوائل في الجسم وعن ترتيب كمية العناصر الكهربية مثل الأيونات والأملاح.

2-1-1تـــــركـــيب الكلبـــة



يشبه مبنى الكلية حبة الفاصولياء حيث لها حد مقعّر ومحدّب.

تدعى المنطقة الغائرة في الحد المقعر نُقير الكلية، حيث يدخل

الشريان الكلوي إلى الكلية ويخرج الوريد الكلوي والحالب.

الكلية مُحاطة بنسيج ليفي قاسي يدعى محفظة الكلية،

والذي هو بنفسه مُحاط بدهن محيط بالكلية (محفظة شحمية)،

واللفافة الكلوية، والدهن المجاور للكلية (الجسم المجاور للكلية).

السطح الأمامي لهذه الأنسجة هو الصفاق، بينما السطح الخلفي

هو اللفافة المستعرضة. إن القطب الأعلى للكلية اليمنى مجاور للكبد،

بينما يجاور القطب الأعلى للكلية اليسرى الطحال. من هنا، تتحرّك كلاهما إلى الأسفل عند الاستنشاق.

1-1-3مـــوقـــع الكـــليـــتين

تقع الكليتان في جسم الإنسان خارج تجويف البطن، في منطقة الظهر بالتّحديد، وقد توجد على طرفي أسفل العمود الفقري في آخرالظهر، والكليتان على عكس الأعضاء الأخرى في تجويف البطن تقع خلف الغِشاء المصليّ البطنيّ، وتُلامس عضلات الظهر، كما تُحيطها طبقة من الدّهون، وظيفتها حماية الكلى من الأضرار التي قد تتعرّض لها ، وتكون الكلية اليسرى مُرتفعة قليلاً عن الكلية اليمنى، وليست اعلى المستوى نفسه لأنّ الجانب الأيمن من الكبد أكبر بكثير من الجانب الأيسر له ، أمّا شكل الكلية فيشبه حبّة الفول اوالفاصوليا.

يبلغ وزن الكلية الواحدة ما يقارب 150غراماً، ويتكوّن سطحها من القشرة وأسفلها النخاع الكلوي، وبجوفها تحتوي على الكؤوس الكلوية بالإنجليزية (Calyces):وتوجد داخلها اثني عشر فصآ، فيها كليونات تتصل معاً من خلال أنابيب كلوية صغيرة، وكل كليونة فيها محفظة بومان.

4-1-1 وظـــائـــف الكـــليـــتين

1-التخلص من السموم : **من الوظائف الأساسية للكلى التخلص من السموم مثل اليوريا، والتي تنتج عن عملية الهضم للبروتينات.**

2-الحفاظ على توازن الماء : من وظائف الكلى الرئيسية الحفاظ على توازن الماء والأملاح داخل الجسم، والتخلص من الزوائد، وحدوث أي خلل يسبب ارتفاع أحد أنواع الأملاح، وهذا قد يؤدي إلى مضاعفات خطيرة تصل إلى الوفاة.

3-الحفاظ على تعادل الدم: تحافظ الكلى على تعادل الدم بين الحمضية، والقلوية، وحدوث أي خلل في الدم قد يؤدي إلى مشاكل في أعضاء متعددة من جسم الإنسان.

4-وظائف هرمونية: تفرز الكلى هرمونات مثل الرنين والبروستاجلاندين، والتي تساعد على الحفاظ على مستوى ضغط الدم,كما أن الكلى تحوّل فيتامين د من خامل إلى نشط داخل الجسم، وتعمل على إفراز مواد تنشط النخاع العظمي للإنسان فيكون كرات الدم الحمراءوتمنع الإصابة بالأنيميا وفقر الدم.

5-1-1 أمـــراض الـــكلـــى

تنقسم أمراض الكلى إلى خمس مراحل، تستلزم كل منها اختبارات وعلاجات مختلفة وهي:

المرحلة الأولى:- معدل ترشيح كبيبي عادي أو مرتفع (معدل ترشيح كبيبي 90 مل في الدقيقة أو أكثر)

المرحلة الثانية:- مرض كلى مزمن خفيف (معدل الترشيح الكبيبي = 60 إلى 89 مل في الدقيقة)

المرحلة الثالثة:- مرض كلى مزمن متوسط (معدل الترشيح الكبيبي = 30 إلى 59 مل في الدقيقة)

المرحلة الرابعة:- مرض كلى مزمن حاد (معدل الترشيح الكبيبي = 15 إلى 29 مل في الدقيقة)

المرحلة الخامسة:- مرض كلى مزمن في مراحله الأخيرة (معدل الترشيح الكبيبي أقل من 15 مل في الدقيقة)

في المرحلة الخامسة يجب أن يخضع المريض إلى غسيل الكلى أو زرع الكلى.

وفيما يلي توضيح عن كل مرحلة من المراحل الخمسة:

في المرحلة الأولى والثانية من مرض الكلى المزمن غالبًا ما تكون هناك أعراض قليلة ويتم تشخيص مرض الكلى المزمن المبكر عادةً عندما تتوافر الشروط التالية:

-أمراض ضغط الدم المرتفع :

مستويات أعلى من المعتاد من الكرياتينين أو اليوريا في الدم

-دم أو بروتين في البول:

دليل على تلف الكلى في أشعة الرنين المغناطيسي أو الأشعة المقطعية أو الأشعة بالموجات فوق الصوتية أو الأشعة السينية.

-تاريخ وراثي للإصابة بمرض الكلى:

في المرحلة الثالثة من مرض الكلى المزمن قد تظهر علامات فقر الدم (نقص خلايا الدم الحمراء) أو أمراض العظام المبكرةويمكن علاج هذه الأعراض لمساعدة المريض على الشعور بالتحسن والحد من المشكلات التي يمكن أن تطرأ.

وعندما يتطور مرض الكلى المزمن إلى المرحلة الرابعة يكون هذا هو الوقت الذي يتعين فيه البدء في التحضير لغسيل الكلى أو زرع الكلى. وإذا كان معدل الترشيح الكبيبي أقل من 30، ففي أغلب الحالات يكون من الضروري زيارة إخصائي أمراض الكلى (أو طبيب أمراض الكلى) وسوف يناقش طبيب أمراض الكلى مع المريض علاجات الفشل الكلوي بما في ذلك غسيل الكلى وزرع الكلى ويشير معدل الترشيح الكبيبي الأقل من 15 إلى أنه ربما يكون واحد من هذين العلاجين ضروريًا.

اما اذا وصل الشخص إلى المرحلة الخامسة من مرض الكلى المزمن يكون في المراحل الأخيرة للمرض الكلوي مع معدل ترشيح كبيبي 15 مل في الدقيقة أو أقل وفي هذه المرحلة المتقدمة من مرض الكلى تكون الكليتين قد فقدت تقريبًا كل ما لديهما من كفاءة للقيام بوظيفتهما على نحو فعال وفي نهاية الأمر يكون غسيل الكلى أو عملية زرع الكلى أمرًا لازمًا لاستمرار الحياة.

2-1 أهم التحاليل الطبية للكشف عن الاعتلال الكلوي

تلعب التحاليل الطبية دوراً هاماً ورئيسياً في تقييم وأداء الوظيفة الكلوية في كثير من الأمراض المعروفة والتي تصيب الكلية ، كما أنها تقوم بمتابعة مرضى الكلى والتنبؤ بعد ذلك بإنذار الحالة المرضية لديهم وهذه التحاليل المهمة هي :

1-2-1 قياس اليوريا (Urea) :

اليوريا هي الناتج الرئيسي والنهائي لعمليات التمثيل الغذائي للبروتينات بشكل عام في جسم الثدييات ، وتتكون اليوريا في الكبد ثم بعد ذلك تمر في الدم ومنه إلى الكلى حيث تخرج منها مع البول. وتتكون اليوريا نتيجة تحويل الأمونيا (NH_3) السامة في الكبد الى يوريا حيث يحول الكبد الامونيا الى مركب اقل خطورة واقل سمية للجسم من الامونيا التي تتكون من هدم الحموض الأمينية , تقاس اليوريا بوحدات mg/dl او بوحدات mmol/L والنسبة الطبيعية لها (15-45 mg/dl) او (2.5-7.5 mmol/L) .

أن مستوى اليوريا في الدم يعتبر مؤشراً غير حساس للوظيفة الكلوية إلا أن سهولة قياسه جعلته من الإختبارات الشائعة . يزداد مستوى اليوريا في الدم في الحالات التالية :

أولاً- في حالة الإلتهاب الكلوي الحاد والمزمن

ثانياً- في حالة الفشل الكلوي

ثالثاً- في حالة الإنسداد البولي

رابعاً- في حالة النزيف المعدي المعوي

خامساً- في حالة الصدمات العصبية وهبوط الغدة فوق الكلوية

سادساً- في حالة الجفاف ، وذلك لفقد كمية كبيرة من السوائل مثل الذي يحدث في القيء المستمر والإسهال الشديد والتسمم بالزئبق وبعض الأملاح المعدنية الثقيلة الأخرى أما الحالات التي يتناقص بشكل ملحوظ فيها مستوى اليوريا في الدم فهي التالية :

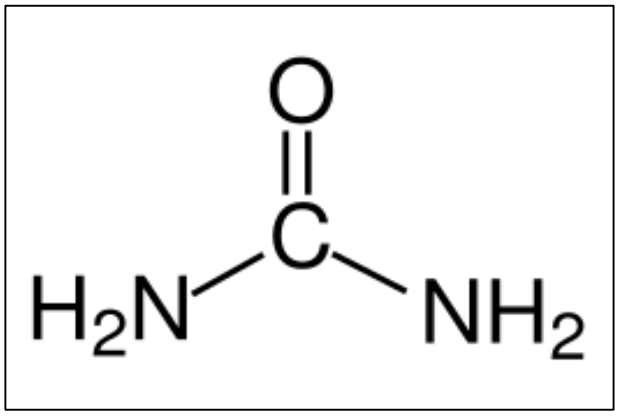
أولاً : في أمراض الكبد المتقدمة المعروفة ، وفي هذه الحالة تتكون مادة الأمونيا ويفشل الكبد حينذاك في تحويلها إلى يوريا نظراً لشدة المرض ، وتتضاعف الخطورة في وجود تركيزٍ عالٍ من الامونيا ، لأن الأمونيا مادة سامة جداً ، وهي تنتشر في الجسم كله وأثرها الشديد يكون على المخ حيث يؤدي إلى شلل تام للمخ .

ثانياً : وفي حالة شلل المخ الناتج من زيادة نسبة الأمونيا يدخل المريض في حالة غيبوبة Hepatic Coma متقطعة ، لكن مع زيادة نسبة الأمونيا في الدم قد يؤدي إلى دخول المريض في غيبوبة طويلة قد تؤدي إلى الوفاة .

ثالثاً : في حالة زيادة معدل الغسيل الكلوي الصناعي وهذا يؤثر على نسبة اليوريا في الدم ،حيث تقل إلى أن تصل إلى أقل من المعدل الطبيعي .

أما من أهم أسباب زيادة تركيز اليوريا في الادرار فهي ما يلي :

يزداد تركيز اليوريا الضار على جسم الإنسان في البول عند تناول وجبات غنية بالبروتينات، وأيضا في الحالات المصاحبة لزيادة هدم البروتينات في الجسم مثل الحمى ومرض السكر غير المعالج وفرط الغدة الدرقية.



تركيب اليوريا

2-2-1 قياس الكرياتينين Creatinine :

ينتج الكرياتينين من العضلات نتيجة تكسير مركب الكرياتين الذي ينتج أثناء دورة إنتاج الطاقة اللازمة لانقباض العضلات. يتم إنتاج الكرياتين والكرياتينين بشكل ثابت تقريباً في الجسم ثم يتم التخلص من الأخير عن طريق الكلى التي تقوم بفلترة الجزء الأكبر منه والتخلص منه في البول.

تتوقف الكمية التي يتم إنتاجها على حجم الشخص ووزن عضلاته، لذلك عادة ما تكون قيمة التحليل في الرجال أعلى منها في السيدات والأطفال .

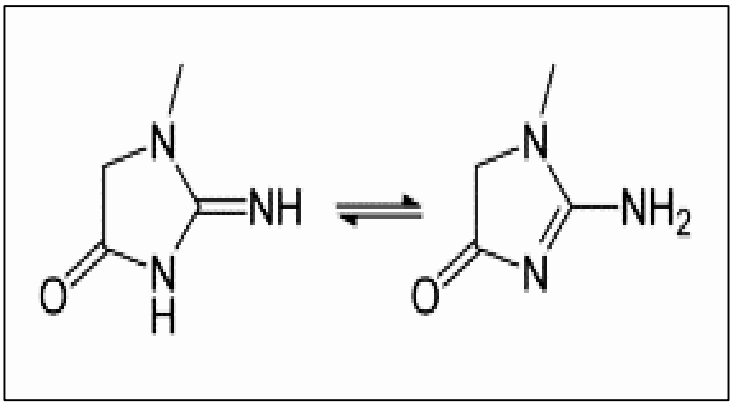
إن هذا القياس أكثر دقة وتأشيراً على سلامة وظيفة الكلية ووضعها وحالتها من قياس اليوريا في الدم.الكرياتينين عادة ما يقدر بوحدة mg/dl او تقدر بوحدة .mmol/L من الكرياتينين

والقيم الطبيعية له (61-123 mmol/L) او (0.7-1.4 mg/dl) .

إن إزدياد وتصاعد مستوى الكرياتينين الضار في الدم قد ينتج عن الحالات التالية :

1 - حالات الفشل الكلوي الحاد والمزمن

2- حالة الإنسداد البولي



تركيب الكرياتنين

3-1 النظام المضاد للأكسدة داخل الجسم

1-3-1 الإجهاد التأكسدي :

يعرف الإجهاد التأكسدي(stress oxidative) في النظام البيولوجي على أنه اختلال في التوازن بين مضادات الأكسدة و مولدات الأكسدة ، هذا الاختلال راجع إلى الإنتاج المفرط لمولدات الأكسدة أو نقص في مضاداتالأكسدة تسبب الجزيئات المؤكسدة أضرار خلوية ونسيجية غالبا غير عكسية.

2-3-1 المؤكسدات :

تعرف الجذور الحرة بانها أنواع كيميائية (ذرات أو جزيئات) تملك إلكترون أو أكثر حر في المدار الخارجي، وجود إلكترون حر يجعل هذه الأنواع غير مستقرة و أكثر نشاطية مع نصف عمر قصير تنتج الخلايا المؤكسدات والأ نواع النشطة بتراكيز ضعيفة خلال العمليات الايضية ويكون هذا الإنتاج مراقب بواسطة جهاز دفاعي مضاد للأكسدة , عدم استقرارية هذه الأنواع يجعل من الصعب مراقبتها في الأوساط البيولوجية , كثير من التفاعلات البيولوجية تقوم بأكسدة مواد التفاعل التي يكون فيها الأكسجين الجزيئي هو المستقبل النهائي للإلكتروناتالذي يدخل في تشكيل الأنواع الأكسيجينية النشطة (ROS Reactive (oxygen species التي يمكن أن تكون جذرية أو غير جذرية.

4-1 أهم الأنواع الأوكسجينية النشطة :

1-4-1 جذر فوق الأكسيد $O_2^{\cdot -}$ (Superoxide anion) :

يعتبر جذر O_2 طليع العملية التأكسدية داخل الخلية، إذ يمكنه التحول إلى أنواع أوكسيجينية أخرى، حيث ينتج هذا الجذر عن الإرجاع الأحادي لجزيئة الأكسجين عند استقبالها لإلكترون) .تقوم مجموعة من الانظمة الخلوية الانزيمية الارجاعية بأنتاج $O_2^{\cdot -}$ حيث 4% من الأوكسجين الموجود داخل الميتوكوندريا يتحول إلى $O_2^{\cdot -}$ و 20 % من هذا الناتج يطرح خارج الخلية.

2-4-1 الأوكسجين الأحادي $^1O_2$ (Singlet oxygen) :

يعتبر الأوكسجين الأحادي $^1O_2$ من الأنواع الأوكسيجينية غير الجذرية، يتميز بغياب إلكترون حر في المدار الخارجي و بمميزات تأكسدية عالية ينتج عن طريق التحفيز الضوئي كما يمكن أن ينتج عن إجهاد تأكسدي محفز بواسطة تنشيط الخلايا البالعة الكبيرة (macrophages) أو خلال عملية أكسدة الدهون، يلحق $^1O_2$ أضرارا خلوية بتفاعله مع الدهون و البروتينات و DNA وذلك حسب مواقع إنتاجه.

3-4-1 بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) Hydrgen peroxide :

ينتج النوع H_2O_2 عن عملية دسمتة (dismutation) أيون $O_2^{\cdot -}$ بواسطة أنزيم SOD Super oxidedismutase حسب التفاعل التالي :

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

يعتبر H_2O_2 من الانواع الاوكسجينية الاكثر سمية لان غياب الشحنه عليه يجعله قابل للمرور عبر الاغشية البيولوجية كما يمكن لـ H_2O_2 ان يتحول الى جذر $OH^{\cdot}$ في وجود بعض ايونات المعادن وفقا لتفاعل Fenton بتفاعله مع $O_2^{\cdot -}$ حسب المعادلة:

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \xrightarrow{Fe^{+2}/Cu^{+2}} HO^- + HO^{\cdot} + O_2$$

4-4-1 الجذر $OH^{\cdot}$ (Hydroxyl radical) :

يعتبر جذر OH الأكثر نشاطا والأقل استقرارا من بين مجاميع ROS ، حيث يملك نصف عمر صغير جدا يقدر بالنانو ثانية

يتفاعل $OH^{\cdot}$ بسهولة مع العديد من الجزيئات التي تكون قريبة منه خاصة الدهون حيث يعمل على إزالة أو إضافة الهيدروجين لروابط غير مشبعة، مما يؤدي إلى مضاعفة الأضرار و زيادة بشكل كبير في السمية الخلوية التي تحدثه ROS.

5-4-1 الجذر ($NO^{\cdot}$) Nitric oxide :

ينتج جذر $NO^{\cdot}$عن طريق أكسدة L-arginine بواسطة انزيم Nitric oxide synthase (NOS) في وجود الأوكسجين في العديد من الأنواع الخلوية مثل الخلايا الطلائية و الأعصاب ، حيث يلعب ادور في نقل الإشارةالخلوية ، وفي الدفاع ضد العضيات الدقيقة يمكن لـ $NO^{\cdot}$ ان يتحد مع O_2^-لاعطاء جذر Peroxynitrite ($ONOO^-$)الذي يعتبر مؤكسد قوي جدا وعالي النشاطية، والذي بإمكانه أن يساهم في هدم الأنسجة في حالة الالتهاب ات المزمنة.

6-4-1 Chlorid hydroxyl (HOCl) :

يقوم انزيم Myelperoxidase (MPO) الخلايا المتعادلة بأكسدة ايونات Cl^- في وجود H_2O_2 لإنتاج جذر عالي النشاطية و له قدرة عالية على قتل البكتريا والأحياء الدقيقة يدعى جذر$HOCl^{\cdot}$هذا الأخير يمكن أن يتفاعل مع $O_2^{\cdot-}$ لإ عطاء جذر $OH^{\cdot}$.

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \longrightarrow HOCl^{\cdot} + H_2O$$

5-1 مصـــادر الانـــواع الأوكسجينيـــة

تنتج الجذور الحرة بشكل مستمر من خلال آليات مختلفة اهمها :

1-5-1 المصادر الداخلية :

تنتج الأنواع الأوكسجينية النشطة داخل العضوية كآلية للحماية ضد الجزيئات الغريبة او كجزء من نواتج العملية الأيضية عبر العديد من الآليات الموجودة داخل الجسم.

1-انزيم NADPH oxidase

2-انزيم Xanthine oxidoreductase

3-انزيم Nitric oxide synthase (NOS)

4-انزيم Lipoxygenase (LOX)

2-5-1 المصادر الخارجية :

يتعرض الجسم لمختلف العوامل الخارجية التي يمكن أن تؤدي إلى تكوين الجذور الحرة، حيث تتسبب الأشعة فوق البنفسجية في إنتاج $O_2^{\cdot-}$ و $OH^{\cdot}$ و $^1O_2$ كما تؤدي أكسدة الأدوية و الكحولات على مستوى الكبد إلى زيادة إنتاج الجذور الحرة تدخل عدة سموم منتشرة في الغذاء و المحيط (التبغ، المبيدات،الإضافات الغذائية) في إنتاج الجذور الحر ة عبر تنشيط الإنزيماتيقوم إنزيمCytp450 بتحويل CCl_4carbone tetrachloride في خلايا الكبد الى $CCl_3^{\cdot}$ هذا الأخير يتحول إلى $CCl_3OO^{\cdot}$ في وجود الأوكسجين ليبدأ الأكسدة الذاتية للأحماض الدهنية غير المشبعة تعتبر المعادن السامة مثل الكروم Cr ،النحاس Cu) والفانديومV محفزات قوية لتفاعلات الأكسدة و إنتاج الجذور الحرة،كما يمكن للمخدرات مثل الكوكايين أن تسبب أضرارا تأكسدية على مستوى الجلد وذلك بتنشيطها لإنزيمي XOR وNOS .

6-1 مضـــــادات الأكســـدة :

يطلق مصلح مضادات الأكسدة على كل مادة أو مركب له فعالية ضد الأضرار التأكسدية يعمل على تأخير أو الوقاية من فعل الجذور الحرة تعمل مضادات الأكسدة على الحماية بعدة طرق إما بالتثبيط المباشر لإنتاج ROS أو منع انتشارها أوهدمها.

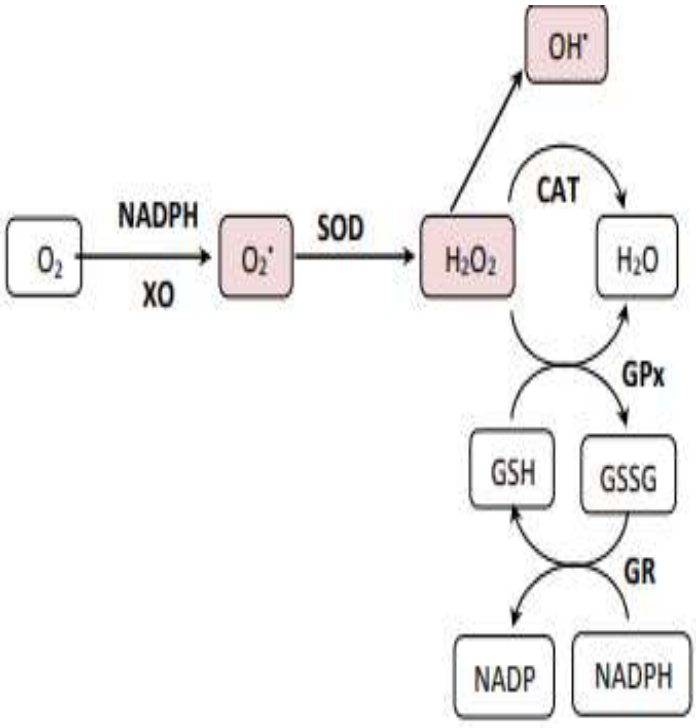
تستعمل الخلية العديد من الآليات المضادة للأكسدة، وتختلف طبيعة هذه الأنظمة المضادة للأكسدة حسب الأنسجة والنوع الخلوي وحسب تواجدها في الوسط داخل وخارج الخلوي.

تقسم الأنظمة المضادة للأكسدة إلى أنظمة إنزيمية و أخرى غير إنزيمية.

1-6-1 مضادات الأكسدة الإنزيمية :

يمتلك الجسم العديد من الإنزيمات المضادة للأكسدة أهمها SOD و CAT وGPX

1-انزيم Superoxide dismutase : يعتبر إنزيم Superoxide dismutase (SOD) من الإنزيمات التي تدخل في تحليل النواتج السامة للميتابوليزم الخلوي فهو يقوم بإزالة الجذر $O_2^{\cdot-}$ وذلك بتسريع معدل تحوله إلى H_2O_2بمساعدة بعض المعادن مثل والزنك والنحاس السيلينيوم .



الشكل 7: آلية التخلص من جذر $O_2^{\cdot-}$ بواسطة الإنزيمات المضادة للأكسدة (Shilina, 2009).

يوجد ثلاث نظائر إنزيمية لـ SOD عند الثدييات والتي تختلف حسب توزعها الخلوي و المعد نا المرتبطة بها، إذ نميز الشكل SOD- Zn/Cu الذي يتواجد أساسا في السيتوزول و النواة، و الشكل SOD-Mn الذي يتواجد في المايتكوندريا، أما الشكل SOD-Ec فيتواجد خارج الخلية.

2-انزيم Catalase : هو انزيم يتواجد في جميع الكائنات الحية التي تتعرض لتأثير الاوكسجين سواء بكتريا , نباتات, او حيوانات او الانسان دور هذا الانزيم هو تحويل بيروكسيد الهيدروجين الذي يعتبر من ضمن الجذور الحرة التي تملك تأثير سلبي على مكونات جسم الكائن الحي الى ماء لذلك عمله يتلخص بحماية الجسم من التأثير الهادم الذي يسببه الجهد التأكسدي الناتج عن وجود مثل هذه المواد.

ان انزيم الكاتاليز فعال جدا حيث يمتلك رقم تحول (turnover numbers) يعتبر واحد من اعلى القيم ضمن الانزيمات حيث كل جزيئة كاتاليز تستطيع ان تحول مليون جزيئة هيدروجين بيروكساید الى ماء واوكسجين خلال ثانية واحدة عادة ما يتواجد الكاتاليز في حبيبات خلوية تدعى البيروكسيسوم والنسبة الطبيعية له (.2.5-6 U/ml) , يتكون الكاتاليز من شكل رباعي يتضمن اربع سلاسل ببتيدية كل سلسلة تحوي اكثر من 500 حامض اميني ايضا يحتوي على الهيم بروتين الذي يحمل الحديد لكي يسمح بتفاعل الانزيم مع بيروكسيد الهيدروجين من المتوقع ان يكون تفاعل الكاتاليز حسب الميكانيكية التالية :

$$H_2O_2 + Fe(III)\text{-}E \longrightarrow H_2O + O{=}Fe(IV)\text{-}E$$

$$H_2O_2 + O{=}Fe(IV)\text{-}E \longrightarrow H_2O + Fe(III)\text{-}E + O_2$$

حيث يمثل الحديد الايون المركزيا لمجموعة الهيم المرتبطة بالانزيم الذي يساعد على تحول البيروكسيد الذي يعتبر ناتج ضار جدا من نواتج عمليات الايض لكي يمنع تدمير الخلايا والانسجة لذلك يجب تحويله بسرعه الى ماء التي تعتبر مادة غير خطرة وجزيئة اوكسجين.

3-انزيم Glutathion peroxidase وانزيم Glutathion reductase :

ينتشر كلا من (GP_X) Glutathion peroxidase و (GR) Glutathion reductase في العديد من الأ نواع الخلوية ، حيث يتمركزان في المايكوندريا و السيتوزول ، و يعتبران من أهم الأنظمة الإنزيمية المضادة للأكسدة، وذلك لقدرتهما على إزاحة عدد من الجذور والهيدروبيروكسيدات الناتجة من أكسدة الكولسترول والأحماض الدهنية وفق التفاعلات الآتية :

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2H_2O + GSSG$$

$$LOO^{\cdot} + 2GSH \longrightarrow LOH + H_2O + GSS$$

يقوم انزيم GR باعادة تجديد (γ-glycine-cysteinyl-glutamyl) انطلاقا من GSSG ويتطلب هذا التفاعل عامل مساعد هو NADH.

4- Peroxiredoxins :

تعرف Peroxiredoxins ايضا بأسم thioredoxin peroxidase وقد تم تحديد فعلها المضاد للأكسدة حديثا وجد ستة أنواع منها عند الثديات تتوزع أساسا في السيتوزول و المايتوكوندريا، كما تتصل هذه البروتينات بالنواة والأغشية الخلوية تقوم Peroxiredoxins بتحويل كلا من H_2O_2 & $ONOO^{\cdot}$ & $NO^{\cdot}$ وذلك بفعل نشاط peroxidase رغم فعاليتها الضعيفة مقارنة بـ GP_X & CAT الا ان هذه البروتينات تلعب دورا مهما في التخلص من الهيدروبيروكسيدات وذلك لكميتها المعتبرة اذ تمثل 0.8-0.1% من البروتينات الحرة الخلوية.

الفصـــــل الثانـــى

1-2 خطـــوات الدراســـة

أولآ : جمع عينات دم لأشخاص وبأعمار مختلفة .

ثـــانيـــآ :أجـــراء اختبـــارات وضـــائف الكلـــى (S.Creatinine & B.Urea) علـــى جميـــع العينـــات لتشـــخيص الاصـــحاء والمرضـــى الـــذين يعـــانون الاعـــتلال الكلـــوي وتســـجيل القـــيم ضـــمن جدول خاص يتضمن اعمارهم والتاريخ المرضي لهم .

ثـــالـــثـــآ : تحديـــد فعاليـــة أنـــزيم الكاتـــاليز لعينـــات الأصـــحاء والمرضـــى واجـــراء الدراســـة لهـــذا الانزيم بالأضافة الى عمل مقارنة بين الفئتين .

2-2 طريقــة العمــل

تم تعيين مدى فعالية انزيم الكاتاليز لاشخاص بعضهم يعانون من مرض الاعتلال الكلوي وبعضهم اصحاء كمؤشر حيوي لكفاءة النظام المضاد للاكسدة بصورةعامة وقد اختير قياس فعالية هذا الانزيم لسهولة تحديد فعاليته وكذلك لتوفر المواد التي تستخدم لايجاد فعاليته.

حيث جمعت 20 عينة 10 منها لمرضى و 10 لاصحاء تتراوح اعمارهم مابين 35-60 سنة

تم اخذ عينات دم (5 مل) لمراجعي مختبر مستشفى عفك العام بعد اخذ موافقتهم وتسجيل اعمارهم والتاريخ المرضي لهم ثم ترك الدم ليتخثر مدة 10 دقائق بعدها تم فصل مكونات الدم بواسطة جهاز الطرد المركزي Centrifuge وبسرعة 4000 دورة في الدقيقة للحصول على مصل الدم (Serum) وقد اجريت لهم اختبارات وظائف الكلى (B.Urea&S.Creatinin) بطريقة الكلاسيكية المعتمدة في السيطرات النوعية للمختبرات وكانت الشركة المصنعة للـ KIT هي BIOLABO وكما يلي:

2-2-1 تعيين نسبة اليوريا (Determination of B.Urea) :

	Blank	Standard	Test
Working reagent(R1+R2)	**1 ml**	**1 ml**	**1 ml**
Standard		**10 µL**	
Sample			**10 µL**
مزجنا العينات جيدا ثم انتظرنا لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة المختبر 25م			

Base (R3) diluted $^{1}/_{4}$	**1 ml**	**1 ml**	**1 ml**

ثم قمنا بوضع العينات في حاضنة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 37م وقرانا الامتصاصية بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) نوع Genex-chem S1 ذو المنشأ الامريكي بطول موجي 580 نانوميتر.

$$\text{B.Urea (mmol/L)} = \frac{\boldsymbol{A.\ Sample}}{\boldsymbol{A.\ Standard}} \times 8.33$$

Normal Value : 2.5– 7.5 mmol/L

2-2-2تعيين نسبة الكرياتينين (Determination of Creatinine):

	Blank	Standard	Test
Working reagent	**1 ml**	**1 ml**	**1 ml**
Standard		**100 µL**	
Sample			**100 µL**

مزجنا العينات وقرأنا الامتصاصية بطول موجي 520 نانوميتر بالطريقة التالية :

القراءة الاولى A_1 بعد 30 ثانية والقراءة الثانية A_2 بعد 90 ثانية

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

$$\text{-S.Creatinine (mmol/L)} = \frac{A.\ Sample}{A.\ Standard} \times 88.4$$

Normal Value : 61 - 123 mmol/L

3-2-2 تعيين نسبة أنزيم الكاتاليز **Determination Of Serum Catalase (CAT) (Aebi1974)**

تم تعيين فعالية انزيم الكاتاليز باستخدام جهاز المطياف الضوئي نوع .UV-Vis ذو المنشأ كوري ضمن طول موجي 240 نانوميتر بأستخدام خلايا الكوارتز .

حيث اجريت القياسات في مختبر البحوث المتقدمة في قسم علوم الحياة/كلية العلوم لتوفر جهاز المطياف المستخدم في التجربة.

المبــدأ :

يتمثل دور الكاتاليز بتحويل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء حيث يمكن قياس فعاليته من خلال اختزال قيمة الامتصاصية للبيروكسيد عند تحوله الى ماء بتأثير الأنزيم .

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

3-2 المواد المستعملة:

1- حضر محلول الفوسفات بفر (PH=7.0 , 50mM) من خلال الخطوات التالية:

-حضر محلول بوتاسيوم داي هيدروجين فوسفات (KH_2PO_4) ذو الوزن الجزيئي

(136.09gm/mole) بتركيز (5Mm) من خلال أذابة 6.81 gm منه في 1 لتر من الماء المقطر.

-حضر محلول داي صوديوم هيدروجين فوسفات (Na_2HPO_4) ذو الوزن الجزيئي

(141.96gm/mole بتركيز 38.772mM) من خلال أذابة 6.9gm منه في 1 لتر من الماء المقطر.

بعد ذلك يمزج 390ml من (KH_2PO_4) مع 610ml من (Na_2HPO_4) وتنظم قيمة PH المحلول عند PH=7.

2- حضر محلول بيروكسيد الهيدروجين (بتركيز 50mM) قبل بدء القياس مباشرة وذلك بتخفيف (0.34ml من H_2O_2 30%) في محلول البفر فوسفات الذي حضر في الخطوة الاولى الى حجم 100ml.

4-2 طريقة العمل:

1- أخذنا 0.2ml من مصل الدم(Serum) وخفف بـ 1.8ml من محلول بفر فوسفات (PH=7) قبل القياس مباشرة.

2-رتبت العينات كما في الجدول الأتي:

Reagent	Sample	Blank
Serum	**200 ml**	
Buffer Phosphate (PH=7)		**2 ml**
H_2O_2	**1 ml**	**1 ml**

بدأ التفاعل عند أضافة بيروكسيد الهيدروجين حيث تم مزج المكونات بعد الاضافة حالآ وسجلت الامتصاصية الاولى بعد 15 ثانية(t_1) وسجلت القراءة النهائية بعد دقيقة من القراءة الاولى (t_2) عند طول موجي 240 nm بأستخدام جهاز المطياف الضوئي UV-VIS .

5-2 الحسابات:

تم حساب فعالية أنزيم الكاتاليز بأستخدام القانون التالي:

$$\textbf{-Catalase activity (U/ml)} = \frac{(\Delta \mathbf{As} - \Delta \mathbf{A}_{\circ}) \times \mathbf{df}}{\epsilon \times \mathbf{Tv} \times \Delta \mathbf{t} \times \mathbf{L}}$$

حيث:

$\Delta \boldsymbol{As}$: الفرق بين الامتصاصية الاولى والنهائية للعينة.

$\Delta \boldsymbol{A}_{\circ}$: الفرق بين الامتصاصية الاولى والنهائية للبلانك.

$\boldsymbol{df}$: معامل التخفيف.

$\boldsymbol{\epsilon}$: معامل الامتصاصية المولارية ومقداره ($0.0436\ M^{-1}\ cm^{-1}$) .

$\boldsymbol{Tv}$: الحجم الكلي.

$\boldsymbol{L}$: بعد الخلية او طول مسار الاشعاع بالخلية

$\Delta \boldsymbol{t}$: الفرق بين زمن القياس الاول والثاني ومقداره 1 دقيقة .

Normal Value : 2.5 – 6.7 U /ml

الفصل الثالث

1-3 النتائج والمناقشة :

من خلال النتائج ادناه تم التأكد من حالة العينات الصحية حيث تم تشخيص الاصحاء من خلال اجراء الفحوصات الطبية العامة وكذلك تم تشخيص المرضى المصابين بالاعتلال الكلوي من خلال قياس نسبة اليوريا والكرياتنين لعينات السيرم حيث يعتبر هذين الاختبارين الاهم لتحديد درجة الاعتلال الكلوي بالاضافة الى تواجد الالبومين في عينات الادرار لدى المرضى المصابين بسبب قصور وظائف الكليتين.

تم اجراء الدراسة لتحديد مدى فعالية النظام المضاد للاكسدة الذي يتأثر بالاضطرابات الناتجة عن المرض سواء اضطرابات مناعية او أيضية في محاولة للدفاع عن الجسم ضد الاجسام الفعالة كالجذور الحرة التي عادة ماتزداد عند المرض او الاضطرابات الناتجة عن الشد العصبي نتيجة حدوث اضطرابات في العمليات الحيوية تنتج زيادة من الاجسام الفعالة التي تتزامن مع تحفيز هذه الانزيمات ومن ضمنها الكاتاليز . تمت مقارنة فعالية هذا الانزيم بين الاصحاء والمرضى حيث يعتبر اكثر انزيمات مضادات الاكسدة فعالية كونه يملك رقم تحول عالي جدا مقارنة ببقية الانزيمات المضادة للاكسدة. وكانت النتائج كما مبينة في الجدول ادناه:

الفحوصات	الاصحاء	المرضى
Creatinine)mmol/L)	96 ± 13	245± 95
Urea (mmol/L)	4.3 ± 1.9	13.8± 2.5
Catalase (U/ ml)	4.821 ± 1.121	2.131 ± 0.972

من خلال النتائج تبين بأن عينات الاصحاء تمتلك نسب طبيعية لفعالية انزيم الكاتاليز والتي تصل الى حدود (6U/ml) تقريبا في حين انخفضت فعالية الانزيم الى اقل من نصف فعالية الاصحاء مما يؤدي الى الاستنتاج بأن هذا الانزيم قد استهلك بسبب سوء الحالة الصحية وكثرة الجذور الحرة التي بالنهاية قد تؤدي الى قلة فعالية هذا الانزيم وقد تباينت الدراسات حول زيادة فعالية هذه الانزيمات لدى مرضى الفشل الكلوي بين زيادة ونقصان فعالية هذا الانزيم والانزيمات الاخرى , وقد يعود السبب الى المرحلة المرضية التي يصل اليها المريض فمن المحتمل ان هذه الانزيمات تنشط عند بداية المرض بشكل طبيعي لكن بتطور المرض بحيث يصبح حالة مزمنة فذلك قد يؤدي الى قصور فعالية الانزيم نتيجة استهلاكه بصورة كبيره ونتيجة تواجد هذه الجذور بصورة اكبر من قابلية استيعاب الانزيم.

2-3 الأستنتاجات :

من خلال الدراسة يمكن ان تستنتج بان طول فترة الاصابة بالامراض المزمنة حيث ان الاعتلال الكلوي دليل على تطور التهاب الكلية الذي قد يؤدي بالتالي الى قلة كفاءة هذه الانزيمات نتيجة استهلاكها المستمر للتخلص من الجذور الحرة الناتجة اما عن الخلل الوظيفي للجسم بصورة عامة والذي ينتج عن اي خلل في عملية الايض او بسبب الامراض حيث تنتج الخلايا الدفاعية العديد من الجذور الحرة كنتيجة دفاعية للتغلب على الالتهابات الناتجة عن المرض وهذا بدوره يؤدي الى نضوب هذه الانزيمات نتيجة الكم الهائل من هذه الجذور وبالتالي يؤدي الى قلة فعالية هذه الانزيمات.

3-3 التوصيات :

من خلال قياس فعالية هذا الانزيم و من خلال نتائج البحث يمكن الاستنتاج بانه مع تطور المرض يحدث نضوب او خلل في فعالية هذه الانزيمات وهذا قد يؤدي الى تفاقم المرض , لذلك قد يكون من الممكن ان يكون هناك تعزيز لهذه الانزيمات من خلال الطرق الكيميائية والطبية لتعزيز الجسم بهذه الانزيمات رغم ان هناك العديد من مضادات الاكسدة الغذائية لكنها لاتستطيع ان تكون بديلا عن هذه الانزيمات التي تعمل بتخصص عالي جدا وبفعالية متميزة في الحفاظ على الجسم وانسجته من الاضرار المدمرة التي تنتج عن الجذور الحرة.

References:

1. "What Is Chronic Kidney Disease?". National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. June 2017.
2. Liao, Min-Tser; Sung, Chih-Chien; Hung, Kuo-Chin; Wu, Chia-Chao; Lo, Lan; Lu, Kuo-Cheng (2012). "Insulin Resistance in Patients with Chronic Kidney Disease". Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012: 1–5.
3. "Chronic Kidney Disease Tests & Diagnosis". National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. October 2016.
4. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R (2008). "Hyperphosphatemia of chronic kidney disease". Kidney Int. 74 (2): 148–57.
5. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW (2003). "Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention". Circulation. 108 (17): 2154–69.
6. Appel LJ, Wright JT, Greene T, Kusek JW, Lewis JB, Wang X, Lipkowitz MS, Norris KC, Bakris GL, Rahman M, Contreras G, Rostand SG, Kopple JD, Gabbai FB, Schulman GI, Gassman JJ, Charleston J, Agodoa LY (April 2008). "Long-term effects of renin–angiotensin system-blocking therapy and a low blood pressure goal on progression of hypertensive chronic kidney disease in African Americans". Arch. Intern. Med. 168 (8): 832–39.

7.Groothoff JW (2005). "Long-term outcomes of children with end-stage renal disease". Pediatr. Nephrol. 20 (7): 849–53.

8.Giri M (2004). "Choice of renal replacement therapy in patients with diabetic end stage renal disease". EdtnaErca J. 30 (3): 138–42.

9. Arablinskaia N. E., Borisov S. E., Gracheva M. P. and Kupavtseva E. A.(2006). Free radical processesin the phagocytes of the lung in the diagnosis of granulomatous diseases. ProblTuberkBoleznLegk. 52: 49-54.
10. Alvarez M. N., Peluffo G., Piacenza L. and Radi R.(2011). Intraphagosomal peroxynitrite as amacrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosomacruzi: consequences for oxidativekilling and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. J Biol Chem. 286: 6627-6640.
11. Ghezzi P., Bonetto V. and Fratelli M.(2005). Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidativestress to that of redox regulation. Antioxid Redox Signal. 7: 964-972.
12. Droge. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82: 47-95.
13. Goyal & Basak. Human catalase: looking for a complete identity. Protein Cell 2010; 1(10): 888-97.
14. Kussendrager & van Hooijdonk. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. Br J Nutr 2000; 84 Suppl 1: S19-25.
15. Lubos et al. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 2011; 15(7): 1957-97.
16. Marikovsky et al. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. J Immunol 2003; 170(6): 2993-3001.
17. Aebi, H. Catalase. In: "Methods of enzymatic analysis ". 2nd ed. Verlagchemi, weinheim. Germany., 1974: 673-684.