

دراسات حركية وثرموديناميكية لمتناظرات أنزيم الألائين أمينو ببتيديز (AAP) المنقاة جزئياً من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي

تغريد علوم العقبي*

استلام البحث 3، شباط، 2013

قبول النشر 8، أيلول، 2013

الخلاصة:

تم في دراسة سابقة قياس نشاط أنزيم الألائين أمينو ببتيديز (AAP) في إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي والأصحاء فأظهرت النتائج ارتفاع نشاط (AAP) في إدرار المرضى مقارنة بالأصحاء وبعدها تمت تنقية (AAP) من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي باستعمال كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي وباستعمال هلام الترشيح Sephadex G-50. وفصل متناظرين لـ (AAP) من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني وباستعمال راتنج DEAE – Sephadex A-50.

تضمن البحث الحالي دراسة الصفات الحركية والثرموديناميكية لمتناظري أنزيم الألائين أمينو ببتيديز I, II المنقاة من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي، إذ وجد أن المتناظرين يخضعان لمعادلة ميكاليس منتن، إذ كان التركيز الأمثل للمادة الأساس (الألائين-4-نايترو أنلايد) لكل من المتناظرين I, II (2×10^{-3}) مول / لتر. هذا فضلاً عن زيادة سرعة تفاعل المتناظرين مع ارتفاع الدالة الحامضية للوصول إلى سرعة التفاعل الأقصى عند الدالة الحامضية 7.8 كما لوحظ أن المتناظرين يخضعان لمعادلة أرينوس حتى (37) م⁰ وتم تعيين قيم Ea و Q₁₀ لكل من المتناظرين، ودراسة ارتباط المادة الأساس (الألائين-4-نايترو أنلايد) بالمتناظرين وإيجاد الثوابت الحركية (K_s, K_a, K₋₁, K₊₁) في درجة حرارة (37) م⁰ وأشارت النتائج إلى أن التفاعل من المرتبة الأولى. وحساب الدوال الثرموديناميكية (ΔG° , ΔH° , ΔS°) (ΔG^* , ΔH^* , ΔS^*) لنشاط أنزيم الألائين أمينو ببتيديز (AAP) من خلال معادلتى فانت هوف وأرينوس للحالتين القياسية والانتقالية.

الكلمات المفتاحية: أنزيم الألائين أمينو ببتيديز، سرطان الجهاز البولي.

المقدمة:

الأول هو الذي يحمّل التصنيف الأول (EC3.4.11.1) وله تخصص تجاه المادة الأساس L-Leucine amide لذا سمي Leucineaminopeptidase (LAP)، أما الآخر فهو Microsomal (EC 3.4.11.2) الذي يعمل على الألائين وكذلك مشتقات 4-Nitroanilide و β -Naphthylamide للألائين كمواد أساس له لذا سمي Alanine aminopeptidase (AAP) [5].، ينتشر أنزيم الألائين أمينو ببتيديز AAP أنتشاراً واسعاً في أنسجة الكلية [6]، هذا فضلاً عن وجوده في مصلى الدم [7]، الغشاء المخاطي للأمعاء الدقيقة [8]، الكبد، البنكرياس [9]، المشيمة والبروستات في الإنسان [10]. وتعد الكلية من أكثر المصادر الغنية بالانزيم إذ يكون نشاطه في الكلية بنحو (15-10) مرة أكثر من بقية الأعضاء الأخرى وبهذا نستطيع القول بان الكلية هي المصدر الرئيس للانزيم [11].

يملك أنزيم الألائين أمينو ببتيديز متناظرين لهما الوظيفة نفسها ولكن يختلفان في أوزانها الجزيئية، كما تختلف من الناحية الفيزيائية والكيميائية

يعد سرطان الجهاز البولي Urinary tract cancer (U.T.C) مصطلحاً عاماً لأورام الكلى، الحالب والمثانة. وأن هذه الأورام تهدد الحياة غالباً في العقد الخامس أو السادس من العمر أكثر منها بالنسبة للأعمار الفتية [1,2] وتعد الخلايا السرطانية من أكثر الأورام الخبيثة أنتشاراً في الكلية، فهي تمثل نسبة 1% من مجموع الأمراض الخبيثة الأخرى. ويعد سرطان الكلية ثالث أنواع الأمراض الخبيثة المنتشرة في الجهاز البولي [1]. وقد وجد ارتباط بين سرطان المثانة والكلى إذ أن الورم الخبيث في المثانة يظهر بعد إصابة الكلية غالباً، وأن حصول ورم ثانوي في المثانة بعد الكلية يلاحقها سرطان في الجهاز البولي [3]. ويكون سرطان الحالب من الأورام الحاصلة بنسبة أقل من 5% من كل أورام الكلية وأقل بنسبة 1% من مجموع أورام الجهاز البولي – التناسلي [4].

ينتمي أنزيم الألائين أمينو ببتيديز AAP إلى مجموعة أنزيمات الأمينو ببتيديز التي تشطر حامضاً أمينياً منفرداً من النهاية الأمينية للسلسلة الببتيدية ويوجد نوعان من هذا الأنزيم النوع

*قسم الكيمياء - كلية التربية - أبن الهيثم - جامعة بغداد

والحركية ، وتم فصل وتنقية متناظرات الانزيم بأستعمال طرائق عدة مثل تقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني وكذلك دراسة الصفات الحركية لهذه المتناظرات [12]. إذ ان سرعة التفاعل الانزيمي تتأثر بعوامل عدة أهمها: درجة الحرارة، الدالة الحامضية، تركيز المادة الأساس، تركيز الانزيم، تركيز المادة الناتجة ووجود المثبطات.

الهدف من البحث: دراسة الصفات الحركية والثرموديناميكية لمتناظرات أنزيم الألبانين أمينو بيتايديز (AAP) المنقاة من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي من خلال دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمادة الأساس والدالة الحامضية ودرجة الحرارة في فعالية الانزيم.

المواد وطرائق العمل :

جمع العينات:

تم جمع (36) عينة إدرار من الأشخاص الأصحاء ، ومن كلا الجنسين إذ كان عدد الذكور (14) وعدد الإناث (22) وكانت أعمارهم تتراوح بين (17-65) سنة. وذلك بعد التأكد من عدم إصابتهم بأي مرض من أمراض الجهاز البولي. وقد تم في دراسة سابقة قياس نشاط أنزيم الألبانين أمينو بيتايديز (AAP) في إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي والأصحاء فأظهرت النتائج ارتفاع نشاط (AAP) في إدرار المرضى مقارنة بالأصحاء وبعدها تمت تنقية (AAP) من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي بأستعمال كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي وبأستعمال هلام الترشيح Sephadex G-50 . وفصل متناظرين لـ (AAP) من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي بأستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني وبأستعمال راتنج DEAE – Sephadex A-50.

أما النماذج المرضية للمصابين بـ (U. T. C) فقد تم جمع (64) عينة مرضية أخذت من (34) ذكراً و(30) أنثى تتراوح أعمارهم بين (18-74) سنة، وتم التشخيص من قبل الأطباء الاخصائيين في مستشفى الأشعاع والطب النووي، علماً بان العينات قد اخذت من المرضى الذين لم يخضعوا للعلاج بعد.

1- قياس فعالية أنزيم الألبانين أمينو بيتايديز AAP في الأدرار:

تم قياس فعالية الأنزيم بالأدرار بالأعتماد على طريقة Jung and Scholz (1980) [13]. إذ تعتمد هذه الطريقة على قياس كمية 4-Nitroanilide المتحررة بتأثير الأنزيم في المادة الأساس المستعملة Alanine-4-nitroanilide

hydrochloride وذلك بعد مقارنة الأمتصاصية للعينة بالمنحنى القياسي لتراكيز مختلفة من المادة 4-Nitroanilide [12].

2- دراسة الصفات الحركية لمتناظرات الألبانين أمينو بيتايديز AAP (II,I) :

تمت دراسة الصفات الحركية لمتناظرات الأنزيم (II,I) في الأجزاء الناضحة من عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني وبأستعمال راتنج DEAE – Sephadex A-50 كما يأتي: أ- تأثير تركيز المادة الأساس (الألبانين-4-نايتروأنلايد):

درس تأثير التراكيز المختلفة للمادة الأساس (الألبانين-4-نايتروأنلايد) في سرعة التفاعل لمتناظرات الأنزيم II,I بأستعمال تراكيز مختلفة من الألبانين-4-نايتروأنلايد (0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.5, 2.2, 2.5) ملي مول /لتر لحساب التركيز الأمثل لمتناظرات الأنزيم II,I

ب- تعيين قيم ثابت ميكاليس-منتن (Km):

لتعيين قيم الثابت (Km) للمادة الأساس المستعملة (الألبانين-4-نايتروأنلايد) أستعملت الطريقة نفسها المتبعة في الفقرة (أ) وتم الحصول على قيم الثابت (Km) بأستعمال طريقة لينوفر-بيرك التي تربط بين القيم العكسية لكل من السرعة وتركيز المادة الأساس (1/v Vs. 1/[S]).

ج- تأثير الدالة الحامضية:

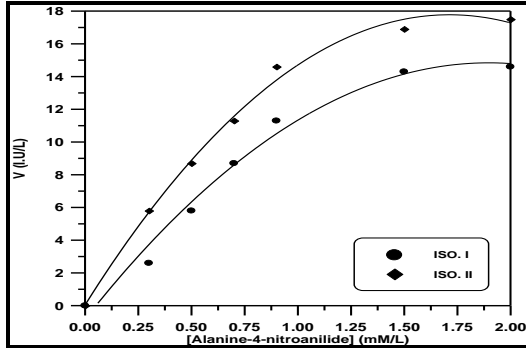
درس تأثير الدالة الحامضية في سرعة تفاعل المتناظرات II,I إذ تم أستعمال قيم مختلفة للدالة الحامضية لمحلول Tris الدارر (6.6, 7.0, 7.4, 7.8, 8.0, 8.6) بوجود محلول المادة الأساس بتركيز (2) ملي مول/لتر وتم التفاعل في حمام مائي بدرجة حرارة (37)° م ثم حضنت الأنايب لمدة عشر دقائق .

د- تأثير درجة الحرارة:

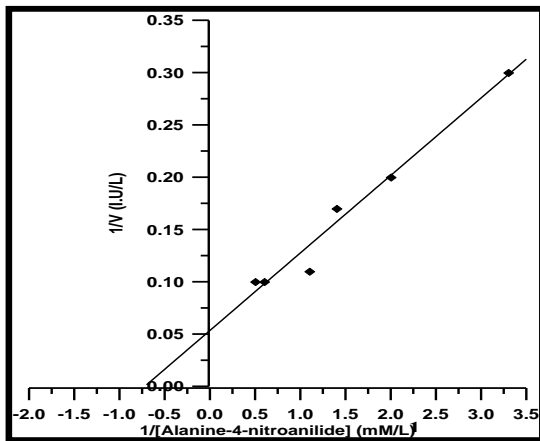
درس تأثير درجات الحرارة المختلفة في سرعة تفاعل متناظرات الأنزيم الألبانين أمينو بيتايديز II,I إذ تم إجراء التفاعل في درجات حرارية مختلفة (5, 10, 20, 37, 50, 60)° م ، بوجود محلول Tris الدارر ذي الدالة الحامضية (7.8) ، والتركيز الأمثل (2) ملي مول/لتر من محلول المادة الأساس (الألبانين-4-نايتروأنلايد).

هـ- تأثير درجة الحرارة في قيمة السرعة القصوى Vmax لمتناظرات الألبانين أمينو بيتايديز AAP : درس تأثير درجة الحرارة في قيمة Vmax بأستعمال درجات حرارية مختلفة (5, 10, 20, 37, 50, 60)° م ، إذ حضنت الأنايب لمدة (10) دقائق بوجود محلول Tris الدارر ذي

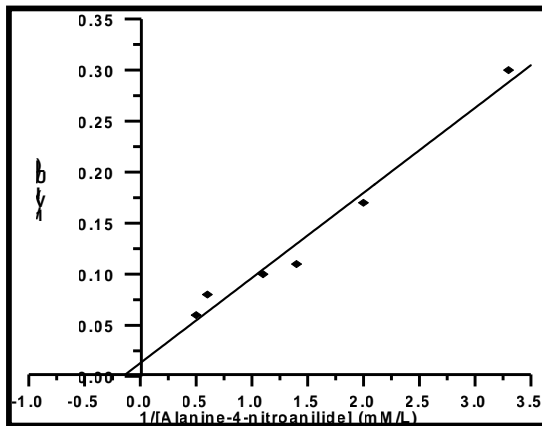
المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي وهذا يدل على ان الفة المتناظر II لـ (الالنين-4-نايتروأنلايد) في ادرار الاصحاء أقل من الفته في ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي.



شكل (1): العلاقة بين تراكيز مختلفة من (الالنين -4-نايترو أنلايد) ملي مول/لتر وسرعة تفاعل المتناظرات II, I المنقاة من ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي.



شكل (2): رسم لينوفر-بيرك لحساب ثابت ميكاليس-منتن للمتناظر I المنقى من ادرار الاصحاء



شكل (3): رسم لينوفر-بيرك لحساب ثابت ميكاليس - منتن للمتناظر II المنقى من ادرار الاصحاء.

الدالة الحامضية (7.8) وأستعمال تراكيز مختلفة من الأالنين -4-نايتروأنلايد (2,0.9,0.5) ملي مول/لتر وبالاعتماد على المعادلات الآتية:

$$\text{Slope} = -E_a/2.303$$

$$E_a = 2.303R(T_2.T_1)\log Q_{10}/10$$

النتائج والمناقشة:

1- تعيين قيم ثابت ميكاليس - منتن (Km) :

لقد أوضحت نتائج الدراسة تأثير تركيز المادة الاساس (الأالنين-4-نايتروأنلايد) في سرعة التفاعل الأنزيمي للمتناظرين II, I مع ارتفاع تركيز المادة الأساس حتى يصل الى السرعة القصوى عند التركيز (2 ملي مول/لتر)، ومن ثم تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض عند التراكيز العالية من المادة الأساس نتيجة لحدوث التثبيط كما موضح في الشكل رقم (1).

وتشير نتائج الدراسة الى أن قيم ثابت ميكاليس- منتن Km التي تم حسابها بالاعتماد على معادلة لينوفر-بيرك للمتناظر I و II في ادرار الاصحاء قد بلغت

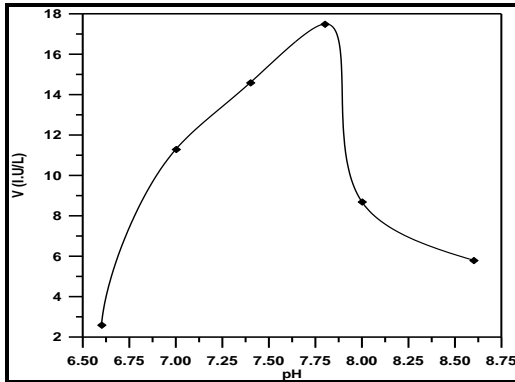
(1.3×10^{-3} مول/لتر) و (6.3×10^{-3} مول/لتر) على التوالي وكما موضح في الشكلين (2) و (3). في حين بلغت قيم Km للمتناظر I و II (0.13×10^{-3} مول/لتر) و

(1.86×10^{-3} مول/لتر) على التوالي وبحسب ماتوصل اليه (1986)Mattenheimer [14] كما أشارت الدراسات الحركية للانزيم المنقى من كلية الانسان الى ان قيمة km لمشتق L- methionyl-beta naphthylamide للأالنين تكون واطئة اذ بلغت (1.4×10^{-5}) [15].

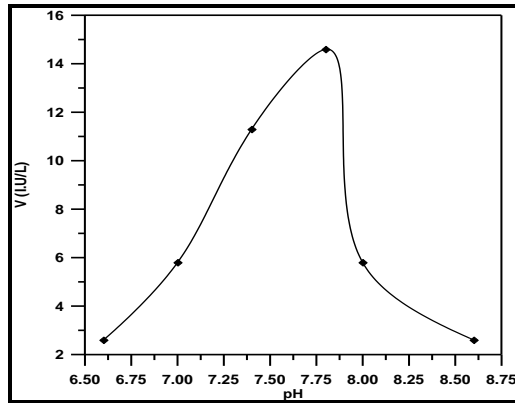
وعند معاملة متناظرات الانزيم AAP المنقاة من بنكرياس، كلية وكبد الانسان بالاجسام المضادة وجد انها لا تسبب تغيرا في قيمة Km ، اما الانزيم المنقى من مصل دم الانسان فقد بلغت قيمة Km (0.29×10^{-3} مول/لتر) [16].

اما في ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي فقد بلغت قيم Km (10×10^{-3} مول/لتر) للمتناظر I و (2.1×10^{-3} مول/لتر) للمتناظر II وكما موضح في الشكلين (4) و (5). يشير الجدول رقم (1) الى وجود فرق واضح بين قيم Km لمتناظرات الأنزيم في ادرار الاصحاء والمرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي فوجد ان قيمة Km للمتناظر I في ادرار الاصحاء أقل من قيمته في ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي وهذا يدل على أن ألفة متناظر الانزيم I لـ (الالنين-4-نايتروأنلايد) في ادرار الاصحاء أكبر من الفته في ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي فيما نجد ان قيمة Km للمتناظر II في ادرار الاصحاء أكبر من قيمته في ادرار

الشكلين (6) و(7). كما أظهر الانزيم المنقى من أنسجة ثدي ومصل دم الانسان دالة حامضية مثلى عند (7.4) [13].

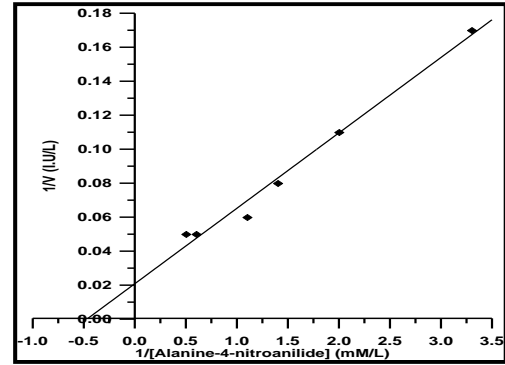


شكل (6) : تأثير الدالة الحامضية في سرعة تفاعل المتناظر I

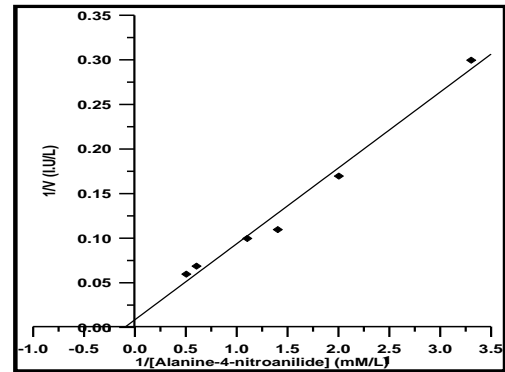


شكل (7) : تأثير الدالة الحامضية في سرعة تفاعل المتناظر II

كذلك أظهرت نتائج الدراسة تأثير درجة الحرارة في سرعة تفاعل متناظرات الألبين أمينو بيتيداز I, II وفي السرعة القصوى V_{max} وكما موضح في الشكلين (8) و(9) أذ ترتفع سرعة التفاعل بارتفاع درجات الحرارة الى حد الوصول الى سرعة التفاعلات القصوى عند الدرجة الحرارية (37)°م ومن ثم تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض. كما وجد عند حفظ الادرار أو الجزء الناضج عند (4)°م فإن الانزيم يحافظ على نشاطه خلال ستة أيام، أما عند حفظ الادرار عند (-12)°م فإن الانزيم يفقد نشاطه خلال يوم واحد فيما نجد ان الجزء الناضج يمكن ان يخزن عند هذه الدرجة الحرارية من غير ان يفقد نشاطه لمدة لا تتجاوز الاسبوع. كما يمكن حفظ الانزيم المنقى من ادرار الانسان بدرجة حرارية (4)°م لمدة لا تتجاوز 6 أيام اما الاجزاء الناضجة فتكون مستقرة عند (-20)°م لمدة اسبوعين [13].



شكل (4): رسم لينوفر- بيرك لحساب ثابت ميكاليس - منتن للمتناظر I المنقى من ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي.



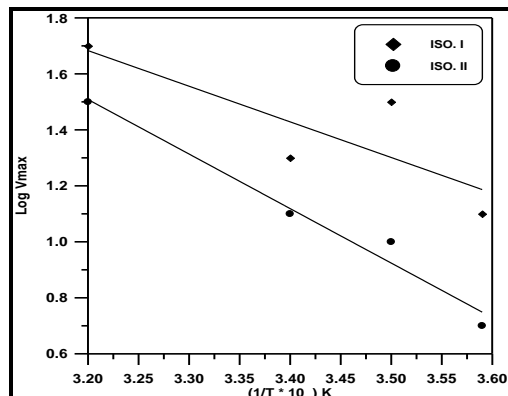
شكل (5): رسم لينوفر- بيرك لحساب ثابت ميكاليس - منتن للمتناظر II المنقى من ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي.

جدول (1): قيم ثابت ميكاليس-منتن (K_m) لمتناظرات (AAP) I و II المنقاة جزئياً من ادرار الأصحاء والمرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي بالاعتماد على معادلة لينوفربيرك

| Enzyme | Substrate | K_m (mol/liter) | |
|---------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | | 1/v Vs. 1/[S] | |
| | | Normal | U.T.C |
| Isoenzym e I | Alanine -4-nitroanilide | 1.3×10^{-3} | 10×10^{-3} |
| Isoenzym e II | Alanine -4-nitroanilide | 6.3×10^{-3} | 2.1×10^{-3} |

كما أوضحت نتائج الدراسة حدوث ارتفاع في سرعة تفاعل متناظرات AAP I, II مع ارتفاع الدالة الحامضية الى أن يصل الى سرعة التفاعل القصوى عند الدالة الحامضية (7.8) للمتناظر I, II وهذا يتطابق مع دراسة سابقة اذ وجد ان الانزيم المنقى من ادرار الانسان يعمل في دالة حامضية تتراوح (7.4-8.0) في حين ان الدالة الحامضية المثلى لها تكون عند (7.8). بعدها تتخفض سرعة التفاعل مع ارتفاع الدالة الحامضية وكما موضح في

درجة الحرارة المطلقة (كلفن): T
ومن ملاحظة الجدول نجد أن قيمة Q10 تطابق الحقيقة القائلة بأن قيم معامل درجة الحرارة Q10 للتفاعلات الأنزيمية تقع بين (1-2) أي تقع ضمن مدى التفاعلات الأنزيمية [18].



شكل (10): رسم لعلاقة أرينوس بين تأثير مقلوب درجة الحرارة المطلقة ضد لوغاريتم السرعة القصوى لمتناظري الأنزيم I, II

جدول (2): قيم (Ea) و (Q10) لمتناظرات I و II (AAP)

| Enzymes | E _a (Cal) | Q ₁₀ |
|--------------|----------------------|-----------------|
| Isoenzyme I | 30087 | 1.0004 |
| Isoenzyme II | 38294 | 1.0005 |

2- الدراسات الترموديناميكية لأرتباط المادة الأساس بمتناظرات أنزيم الانين امينوبيبتيديز (AAP) I, II :

1. المعاملات الترموديناميكية للحالة القياسية

تم حساب قيم الدوال الترموديناميكية (ΔS)، (ΔH، ΔG) من المعادلات الآتية:
اذ تم حساب قيمة طاقة جيبس الحرة (ΔG) من المعادلة:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_a \dots\dots\dots (5)$$

اذ ان:

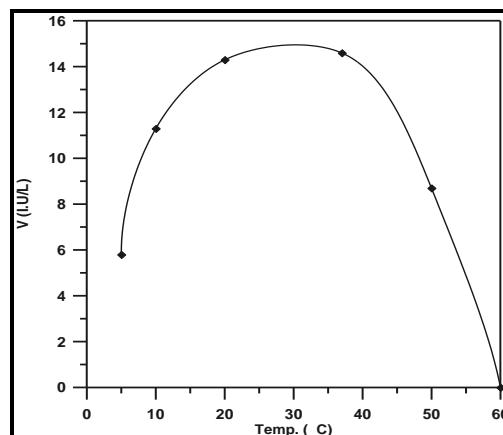
$$K_a = \text{ثابت الاتزان}$$

$$R = \text{ثابت الغاز ومقداره } 1.987 \text{ سرعة } \cdot \text{مول}^{-1} \cdot \text{كلفن}^{-1}$$

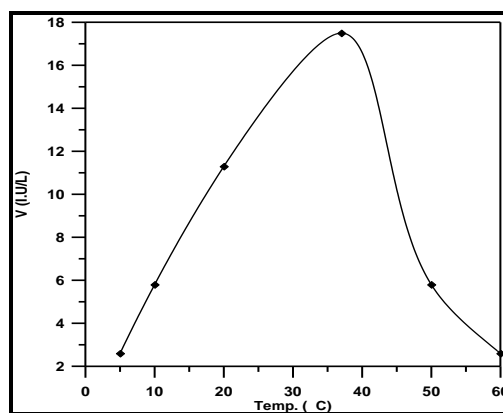
$$T = \text{درجة الحرارة المطلقة}$$

وحسبت قيمة التغير بالانتالبي للحالة القياسية ΔH من معادلة فان هوف (Vant Hoff's) كما موضح بالشكل (11) اذ رسمت قيم lnKa مقابل مقلوب درجة الحرارة بالكلفن اعتمادا على المعادلة الآتية:

$$\ln K_a = -\Delta H / RT + C \dots\dots\dots (6)$$



شكل (8): تأثير درجة الحرارة في سرعة تفاعل المتناظر I



شكل (9): تأثير درجة الحرارة في سرعة تفاعل المتناظر II

أما الشكل رقم (10) فيوضح العلاقة بين لوغاريتم السرعة القصوى Vmax للمتناظرين I, II ضد مقلوب درجة الحرارة المطلقة التي تعطي خطأ مستقيماً والتي تتبع معادلة أرينوس الآتية [17]:

$$\ln k = -E_a/RT + \text{constant}$$

وقد أظهرت النتائج بأن كلا المتناظرين I, II يخضعان لمعادلة أرينوس حتى درجة (37)°م. كما تم حساب الطاقة المنشطة للتفاعل Ea وذلك من ميل الخط البياني للوغاريتم Vmax ضد 1/T*10³ والتمثل بالمعادلة الآتية:

$$\log k = -E_a/2.3R * 1/T + \log A$$

$$-E_a/2.3R = \text{ميل الخط البياني}$$

ويوضح الجدول رقم (2) قيم الطاقة المنشطة Ea وقيم Q10 للمتناظرين I, II وتم تعيين Q10 من خلال المعادلة الآتية:

$$E_a = 2.3 RT_2 * T_1 \log Q_{10}/10$$

اذ أن:

$$E_a: \text{طاقة التنشيط (cal)}$$

$$\text{معامل درجة الحرارة: } Q_{10}$$

$$R: \text{الثابت العام للغازات (1.987)}$$

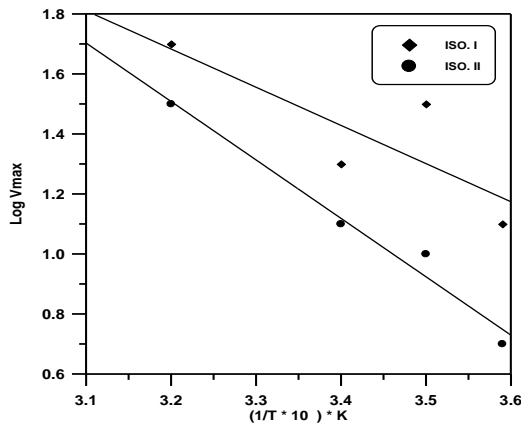
$K =$ ثابت بولتزمان ويساوي 1.3806×10^{-23} جول / درجة .
 $h =$ ثابت بلانك ويعادل 6.626×10^{-34} جول .
 ثانية .

ويمكن حساب التغير في الأنتروبي للحالة الانتقالية (ΔS^*) من المعادلة :

(12) $\Delta S^* = (\Delta H^* - \Delta G^*) / T$
 ويوضح الجدول (3) قيم ($\Delta S^\circ, \Delta G^\circ, \Delta H^\circ$) للمتناظرين (I و II) في الحالة القياسية وبدرجة حرارة (37) م.

ومن ملاحظة القيم المذكورة في الجدول رقم (3) نجد قيمة ΔH° للمتناظرين I و II موجبة ومعنى هذا ان التفاعل ماص للحرارة (Endothermic) [20]. اما القيمة السالبة لـ ΔG° فتعني ان التفاعل تلقائي، وانه مجهز بطاقة ملائمة باتجاه تكوين المعقد (4-Alanine-AAP-nitroanilide).

كما ان القيمة الموجبة للتغير في الأنتالبي القياسي من الممكن ان تعود إلى التفاعلات الملائمة بين المجاميع لـ (الانين-4-نايتروأنلايد) والمتناظرات I و II وهي تتضمن الروابط غير تساهمية التي تكون الكروستاتيكية في طبيعتها كروابط شحنة- شحنة، شحنة - قطبية، قطبية - قطبية واواصر هايدروجينية. وتساعد هذه الروابط على استقرارية الملتف للمعقد وهذا يتوافق مع القيمة الموجبة في الأنتالبي القياسي [20].

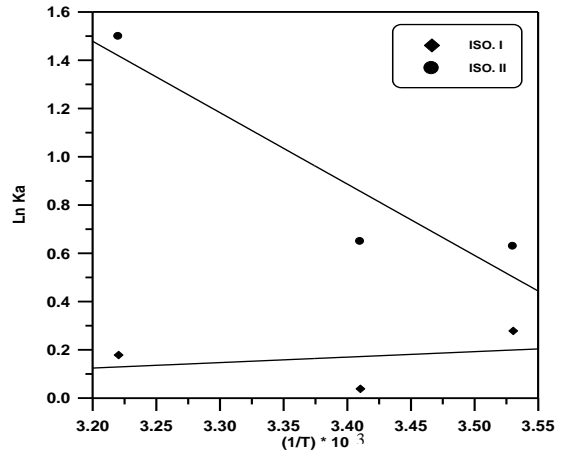


شكل (12): رسم ارينوس لارتباط المادة الاساس مع المتناظرات I و II

جدول (3): قيم الدوال الترموديناميكية للحالتين القياسية والانتقالية لارتباط (الانين-4-نايتروأنلايد) مع المتناظرين I و II وبدرجة حرارة (37) م

| Isoenzyme | ΔH° Kj. mole ⁻¹ | ΔG° Kj. mole ⁻¹ | ΔS° J.deg ⁻¹ mole ⁻¹ | ΔH^* Kj. mole ⁻¹ | ΔG^* Kj. mole ⁻¹ | ΔS^* J.deg ⁻¹ mole ⁻¹ | E_a KJ.mole ⁻¹ |
|-----------|--|--|--|--|--|--|--------------------------------|
| I | 1.5 | -3.8661 | 4.85 | 29.77 | -4.40 | 110.25 | 125.93 |
| II | 0.33 | -0.463 | 1.06 | 37.98 | -3.88 | 135.07 | 160.29 |

اذ أن : $\Delta H =$ التغير بالأنتالبي .
 ومن ميل الخط المستقيم لمعادلة فانث هوف الذي يساوي ($-\Delta H / R$) يمكن حساب قيمة ΔH .



شكل (11): رسم فانث هوف لارتباط المادة الاساس مع المتناظرات I و II

أما ΔS فتحسب من المعادلة الآتية :

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ) / T \dots\dots\dots (7)$$

2. المعاملات الترموديناميكية للحالة الانتقالية

درست المعاملات الترموديناميكية للحالة الانتقالية باستعمال المعادلات الآتية [19] :

$$\Delta H^* = E_a - RT \dots\dots\dots (8)$$

$$\text{Log } V_{\max} = \text{log } A - E_a / 2.303 RT \dots\dots (9)$$

اذ إن :

$A =$ ثابت ارينوس و $E_a =$ طاقة التنشيط

يعطي الرسم الناتج من رسم $\text{Log } V_{\max}$ مقابل $1/T$ خطا مستقيما بميل مساوي لقيمة

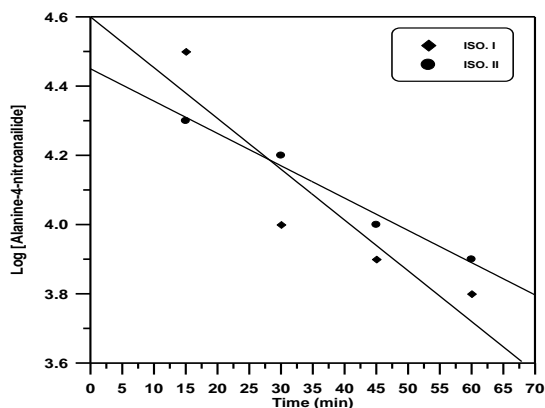
($- E_a / 2.303 R$) وكما موضح في الشكل (12) ، اما قيمة ΔH^* فتحسب من المعادلة الآتية :

$$\Delta H^* = E_a - RT \dots\dots\dots (10)$$

وتحسب ΔG^* من المعادلة :

$$\Delta G^* = -RT \text{log } V_{\max} + RT \ln(KT/h) \dots\dots (11)$$

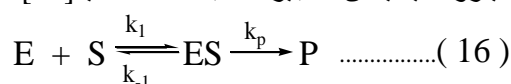
اذ ان :



شكل (14): لوغاريتم تركيز المادة الاساس مقابل الزمن من معادلة السرعة للمرتبة الاولى للمتناظرين I و II عند درجة حرارة (37)°م.



ان ارتباط متناظرات AAP مع الانلين-4-نايتروأنلايد يمكن التعبير عنه بالمعادلة الآتية [19]:



اذ إن :

k_{+1} = ثابت سرعة التفاعل لتكوين المعقد (AAP Alanine aminopeptidase -) . ويحسب من ميل الخط المستقيم في معادلة المرتبة الاولى عند رسم الزمن مقابل فعالية الأنزيم .

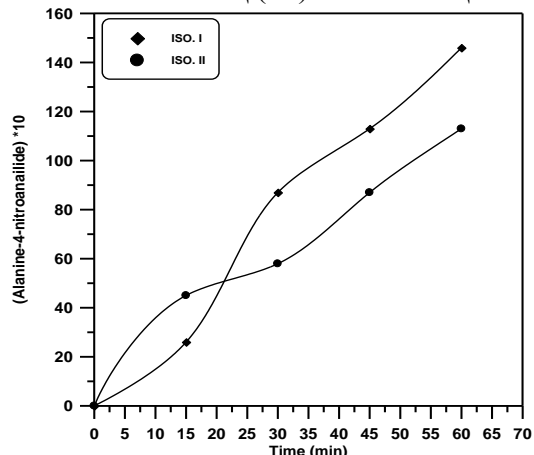
k_{-1} = ثابت سرعة التفاعل لتفكك المعقد (AAP Alanine aminopeptidase) . عند الاتزان . ومن خلال الشكل (14) يلاحظ أن قيمة $[S_0]$ هي اقل بكثير من قيمة ثابت ميكالس منتن أي إن $[S_0] \ll K_m$. ومن خلال متابعة الزيادة بالسرعة مع الزيادة في تركيز المادة الاساس كما في الشكل (1) ، وبالتالي فيكون تركيز المتناظر (الأنزيم) غير مهم لأنه يكون أقل بكثير من مضاعفات تركيز المادة الاساس وهذا يعني أن تركيز المادة الاساس مع الأنزيم هو بمنزلة تركيز المادة الاساس الحر والذي يرمز له $[S]_f$. وعند تطبيق معادلة [21] Scatchard للتوازن الترابطي بين المادة الاساس ومتناظرات الأنزيم :

$$\frac{[S]_b}{[S]_f} = - \frac{1}{K_s} [S]_b + \frac{n[E]_t}{K_s} \dots\dots\dots (17)$$

$[S]_b$ = تمثل تركيز الأنلين-4-نايتروأنلايد المرتبط
 $[S]_f$ = تمثل تركيز الأنلين-4-نايتروأنلايد الحر .
 $[E]_t$ = تركيز الأنزيم الكلي .
 K_s = ثابت تفكك المعقد (AAP-Alanine aminopeptidase) .
 n = عدد جزيئات الأرتباط .

2- حركيات مرتبة التفاعل لمتناظرات انزيم الانلين أمينو ببتيديز (AAP) I,II المنقاة من ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي:

يوضح الشكل (13) العلاقة بين زمن التفاعل وفعالية الأنزيم وبدرجة حرارة (37)°م



شكل (13): السياق الزمني لارتباط (الانلين-4-نايتروأنلايد) مع متناظرات AAP I و II .

ومن الشكل (1) يلاحظ ان السرعة تتناسب طرديا مع التركيز لحد التركيز الأمثل للمادة الأساس (2×10^{-3}) مول/لتر وهذا يعطي علاقة خطية موضحة بالشكل (13)، وعند رسم العلاقة بين $[S]$ \log مقابل الزمن والموضحة بالمعادلة الآتية [21]:

$$\log S = \log S_0 - \frac{k \cdot t}{2.303} \dots\dots\dots (13)$$

فان ميل الخط المستقيم الناتج يكون مساويا الى (-) $(K / 2.303)$ والذي منه تحسب قيمة ثابت السرعة (K) وقيمته مساوية الى :

$$k = \frac{V_{max}}{K_m} \dots\dots\dots (14)$$

اذ يوضح الشكل (14) قيم الثابت (k) للمتناظرين (I ، II) والمساوية 12 و 39 دقيقة⁻¹ على التوالي وهي تمثل وحدة الثابت عندما يكون التفاعل من المرتبة الاولى .

وان العلاقة بين ثابت التوازن K_a وثابت التفكك K_s تتمثل بالشكل الآتي :

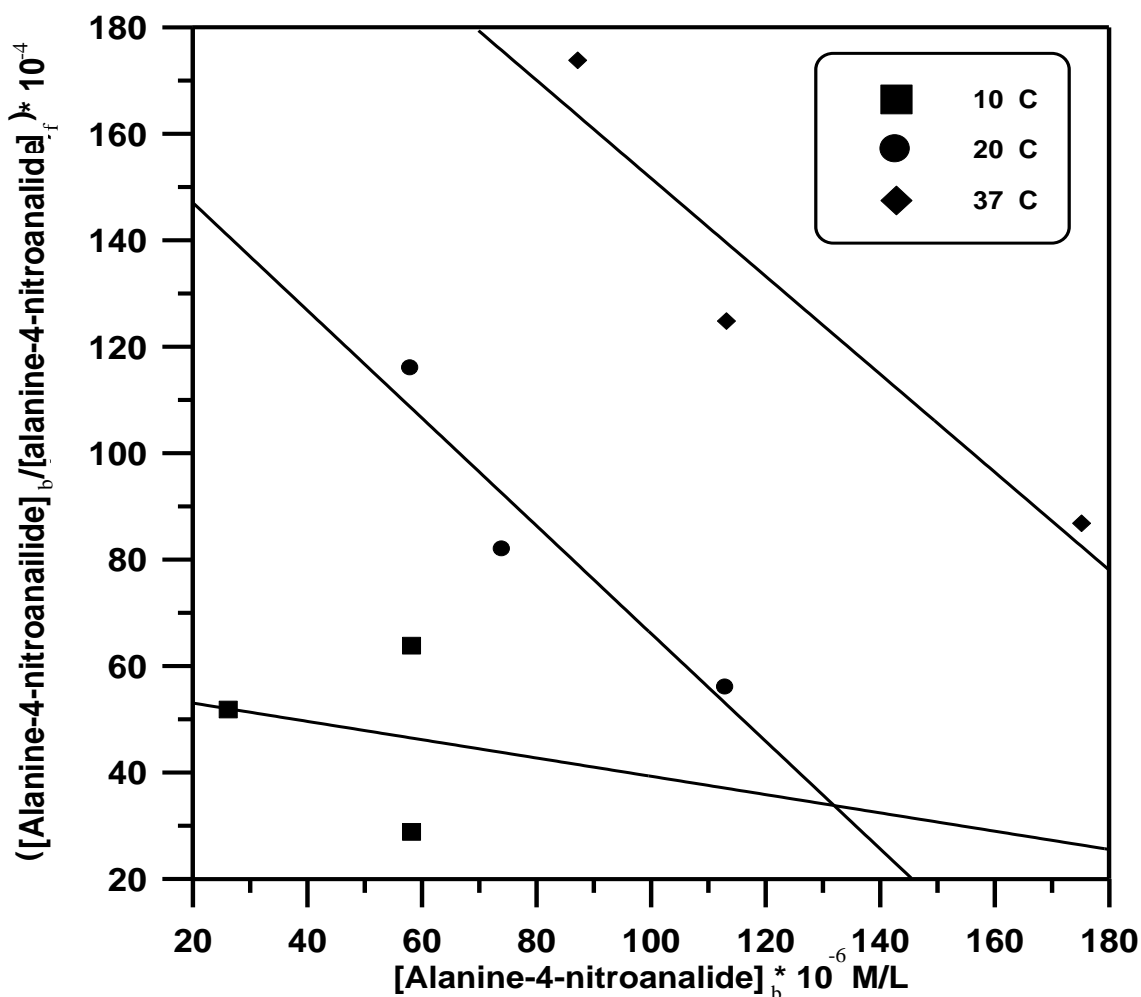
$$K_a = \frac{1}{K_s} \dots\dots\dots (19)$$

لذا يمكن حساب قيمة ثابت التوازن K_a للمعقد المتكون (AAP-Alanine aminopeptidase) والذي يمثل بالمعادلة الآتية :

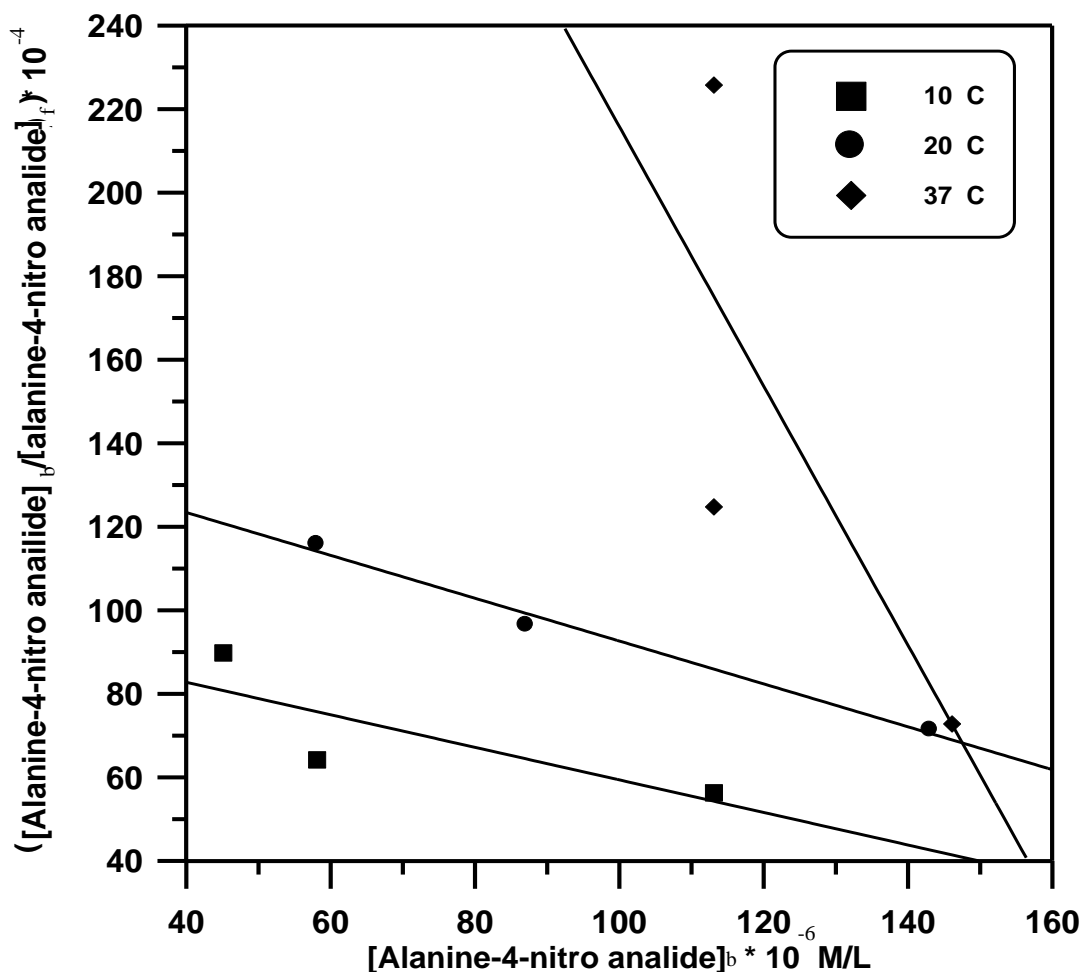
$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} \dots\dots\dots (20)$$

وعند رسم العلاقة بين $[S]_b / [S]_f$ مقابل $[S]_b$ نحصل على علاقة خطية ميلها مساوي الى (-) الشكلين (15) ، (16) . وأما نقطة تقاطع الخط المستقيم مع المحور الأفقي فسيكون مساويا إلى القيمة ($n [E]_t / K_s$) وبما ان قيمة K_s معلومة فيمكن حساب قيمة $n[E]_t$ والتي تمثل التركيز الكلي لجزيئات الارتباط . وقيمة ثابت تفكك K_s تتمثل بالمعادلة :

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \dots\dots\dots (18)$$



شكل (15) : رسم Scatchard لارتباط المادة الأساس مع المتناظر (I) وبدرجات حرارية مختلفة (10 , 20 , 37)⁰ م .



شكل (16): رسم Scatchard لارتباط المادة الاساس (الالنين-4-نايتروأنلايد) مع المتناظر II وبدرجات حرارية مختلفة (37,20,10)°م.

اهمال الخطوة المتعكسة (الخطوة المحددة للسرعة) ودليل ذلك ما يأتي:

1- القيم العالية لثابت الاتزان للمتناظرين (II,I) إذ إن $K_{-1} < K_{+1}$.

2- قيم الدوال الترموديناميكية (ΔS^* و ΔH^* و G^*) في الجدول (3) مقارنة بقيمها بالحالة الاساس والمستقرة.

هذا يعني أنه سيضمن انتقال معظم الجزئيات باتجاه تكوين المعقد (-) AAP-Alanine-4-

(nitroanilide) ومن ثم سيطرة خطوة K_{+1} على معادلة سرعة التفاعل بالمعادلة الارتباطية كما ذكر سابقاً. باعتبار ان الخطوة من المعادلة الارتباطية قريبة من الاتزان (كما في الخطوة المحددة للسرعة) أي لاوجود لحالة التوازن.

نستنتج من الدراسة الحالية ان اختلاف قيم الثوابت الحركية لمتناظرات الانزيم AAP I, II مثل K_m ، التركيز الامثل للمادة الاساس، الدالة الحامضية تؤكد تباين هذه المتناظرات وأحتمالية تكونها في أنسجة مختلفة. كما نستنتج من الدراسات الترموديناميكية ان القوة الدافعة للتفاعلات الارتباطية تعتمد على دالة التغير بالانتروبي

جدول (4): قيم الثوابت الحركية لارتباط المادة الاساس مع المتناظرات (I و II) وبدرجة حرارة (37)°م.

| Isoenzyme | K_{+1} mole ⁻¹ min ⁻¹ | K_{-1} ×10 ⁻³ min ⁻¹ | $K_a = \frac{K_{+1}}{K_{-1}}$ mole ⁻¹ | $K_s = (K_{+1}/K_{-1})$ ×10 ⁻³ mole ⁻¹ |
|-----------|---|--|---|---|
| I | 12 | 2.66 | 4.5 | 0.22 |
| II | 3.9 | 3.25 | 1.2 | 0.83 |

ومن متابعة قيم الثوابت في الجدول رقم (4) يتضح ان المعقد (الالنين-4-نايتروأنلايد) أما ان يتحلل في تفاعل عكسي الى المواد المتفاعلة واما يتجه نحو إعطاء الناتج وتحرير الانزيم ، إذ ان القيمة العالية لثابت الأتزان K_a تجعلنا نفترض ان ميكانيكية التفاعل تتضمن خطوة واحدة متعكسة ويجب ان تكون متبوعة بخطوة بطيئة نسبياً والتي بدورها تكون متبوعة بخطوة أكثر سرعة. ومن الممكن

intesthne mucosa-purification and characteristics,Z Med Lab Diagn.,21(1);9-17.

9. Muhammed,A. Maurice,P. Jan, F.C. and Glatz,B. 2003, Do tissue damage biomarkers used to assess machine-perfused NHBD kidneys predict long -term renal function post-transplant? Clinica Chimica Acta, 338,pp33-43.
10. Sidorowicz,W. Hsia, W.C., Zownir, O.M.and Behal, F.J.1980,Multiple molecular forms of human alanine aminopeptidase :immunochemical propertiess,Clin.Chim.Acta.,107;24 5-256.
11. Lopponen,S.L and Makinen ,M. 1985, Amicrotiter plate assay for N-acetyl- β -D-glucos-aminidase using an fluorogenic substrate, J.Ana .Biochem., 148;50-53.
12. AL-Akabie, T.U..2006, Biochemical studies of Alanine aminopeptidase isoenzymes partially purified from patients urine having urinary tract cancer, Ph.D. thesis, College of Education,Tikrit university.
13. Jung,K. and Scholz.,D. 1980 An optimized assay of alanine aminopeptidase activity in urine, Clin. Chem.,26(9);1251- 1254.
14. Mattenheimer,H. Frolk,W.H and Simane,Z.1986,Identifiction of inhibitors of urinary alanine aminopeptidase, Clin.Chim.Acta.,160;129;135.
15. Kao,Y.J. Starnes W.L and Behal, F.J. 1987,Human kidney alanine aminopeptidase: physical and kinetic properties of a sialic acid containing glycoprotein. Biochem., 17(15);2990-4.
16. Tsushima,H. Sumi,H. Ikeda,R. Yoshida,E. Mihara,H and Havu,V. 1990,Low molecular weight alanine aminopeptidase of human serum: separation and some

($\Delta S > 0$) مما يدل على أهمية التأثيرات الكارهة للماء في تكوين المعقدات الناتجة.

المصادر:

1. Manisha,Jh. Jie,L. Rebecca,B. Ashish, M. and Barton, G.2007,Urinary tract disease and bladder cancer risk: acase – control study, Cancer Causes andControl.,18(8); 839-845.
2. Myrhoj, T. Andersen,M.B. and Bernstein, I. 2008, Screening for urinary tract cancer with urine cytology in Lynch syndrome and familial colorectal cancer, Familial Cancer, 7(4); 303-307.
3. Furukawa, J. Miyake, H. Hara, I andTakenaka, A, 2007, Upper urinary tract recurrence following radical cystectomy for bladder cancer, Intl. J. Uro, 14(6);496-499.
4. Takayanagi, A. Masumori, N. Takahashi,A and Takagi, Y. 2012. Upper urinary tract recurrence after radical cystectomy for bladder cancer: Incidence and risk factor, Intl J.Uro, 19(3); 229-233.
5. Michael, S. 2008, An automated assay of urinary alanine aminopeptidase activity, Clin Chem Lab Med, 46, 537-40
6. Birgit,H. Lehmann,A. and Gero, K,2000, Diagnostic value of urinary alanine aminopeptidase and N-acetyl- β -D glucosaminidase in comparison to α 1 microglobulin as a marker in evaluating tubular dysfunction in glomerulonephritis patients, Clinica Chimica Acta, 297, 93-102.
7. Tsushima,H. Sumi.,H. Ikeda,R. Yoshida, E. Mihara, H.and Hopsuhaw, V.1990.Low molecular weight alanine aminopeptidase of human serum :separation and some characterhstics.Biomed Biochim Acta.,49(5);38-327.
8. Hutter, H.J. Graving hoff, Jand I. Bohme,1980,Alanine aminopeptidase in human small

19. Segel " Biochemical Calculation " Culifornia. 1976 .
20. Donald,V, 2008. Principles of Biochemistry,(3ed John WileyandSons, Inc).pp11-17.
21. Tinco,S. Wang,P "Physical Chemistry .,4th,U.S.A ,198.2002.
- characteristics. Biomed. Biochin. Acta., 49(5);327-38.
17. Wielend.G. and Molinof P. 1980,Thermodynamic of agonist and antagonist interaction with mammalian beta adrenergic receptors. Mol. Pharmacol, 18; 341-347.
18. Atkins.P.W .,"Physical Chemistry .,8th.Oxford .Univ,pres Oxford 2006.

Kinetic and thermodynamic Studies Of Alanine Aminopeptidase(AAP) Isoenzymes I,II Partially Purified From Patient's Urine With Urinary Tract Cancer

*Taghreed U.Al-Akobie**

*College of Eudction- Ibn Al-Haytham, Baghdad university

Abstract

The activity of Alanine aminopeptidase(AAP) was measured in the urine of healthy and urinary tract cancer patients , the results showed higher activity of (AAP) in patients compared to healthy . AAP was Purified from the urine of healthy and patients with urinary tract cancer by dialysis and gel filtration (Sephadex G – 50) and two isoenzymes of (AAP) were separated from urine by using ion-exchang resin (DEAE – Sephadex A – 50) in previous study.

The kinetics studies showed that both isoenzymes I and II obeyed Michaelis – Menton equation . with optimal concentration of alanine-4-nitroanilide as substrate for isoenzymes I and II which was (2×10^{-3} mol/L). The two isoenzymes obeyed Arrhenius equation up two 37° C and their E_a and Q_{10} constants were determined . The binding of alanine-4-nitroanilide by two isoenzymes I , II were studied and the kinetic constant (k_{+1} , k_{-1} , K_a , K_s) were indicated that the reaction was first order at 37° C .Thermodynamic parameters of the standard state (ΔG° , ΔH° , ΔS°) and the transition state (ΔG^* , ΔH^* , ΔS^*) were determined by using Vant Hoff and Arrhenius equations.