

دراسات حركية لمتناظرات أنزيم الأسبارتيت أمينو ترانسفيريز IV,III,II,I AST المنقاة جزئياً من ادرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن

فراح غالي الصالحي* سامي عبد المهدي المظفر** تعريد علوم العقبي***

تاريخ قبول النشر 1 / 3 / 2010

الخلاصة:

تضمن البحث الحالي دراسة الصفات الحركية لمتناظرات أنزيم الأسبارتيت أمينو ترانسفيريز AST I و II و III و IV المنقاة جزئياً من ادرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن، أذ وجد أن المتناظرات الاربع تخضع لمعادلة ميكاليس- منتن، حيث كان التركيز الأمثل للمادة الأساس (حامض الأسبارتات) لكل من المتناظرات I و II و III و IV (166.5×10^{-3}) مول/لتر، كما وجد حدوث ارتفاع في سرعة تفاعل المتناظرات الاربع مع ارتفاع الدالة الحامضية الى أن يصل الى سرعة التفاعل القصوى عند الأس الهيدروجيني (7.4). وقد لوحظ أن المتناظرات تخضع لمعادلة آرينوس حتى Q_{10} و Ea وتم تعيين الثوابت Q_{10} و Ea لكل من المتناظرات الاربع.

الكلمات المفتاحية: (CRF), Chronic renal failure, (AST), Aspartate aminotransferase

المقدمة:

يعد أنزيم الأسبارتيت أمينوترانسفيريز AST من الانزيمات المهمة التي لها دور فعال في العمليات الايضية التي تحدث داخل جسم الانسان (11). أذ يقوم هذا الانزيم بتحفيز انتقال المجموعة الامينية من الحامض الاميني (الأسبارتيت أو الكلوتاميت) الى الحامض الكيتوني (الاوكرالواسيتيت أو الألفا كيتوكلوتارتيت) (12). ويعد AST مؤشراً حيوياً لتحديد الأذى الذي يصيب الكلية فقد لوحظ انخفاض نشاط AST عند إزالة إحدى الكليتين مما يؤكد أن مصدر أن هذا الأنزيم هو الكلية على نحو خاص ومن ثم الجهاز البولي على نحو عام (11)، في حين توصلنا بدراسة سابقة الى ارتفاع نشاط AST ومنتناظراته المنقاة جزئياً من ادرار المصابين بالعجز الكلوي المزمن مقارنة بالأصحاء (13).

وبسبب قلة الدراسات المتعلقة بالصفات الحركية لمتناظرات الانزيم AST I, II, III, IV المنقاة من ادرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن، لذا فإن الدراسة الحالية شملت تأثير التركيز المختلفة للمادة الأساس والدالة الحامضية ودرجة الحرارة على فعالية انزيم AST.

المواد وطرائق العمل:

العينات: Specimen

تم جمع (27) عينة ادرار من الأشخاص الأصحاء من منتسبي وطلبة كلية التربية للبنات - جامعة تكريت ومن كلا الجنسين، اذ كان عدد الذكور (9) وعدد الاناث (18)، وكانت اعمارهم

العجز الكلوي المزمن (Chronic renal failure) CRF هو نقص في وظيفة الكلية نتيجة مرض مزمن (1)، أو هو المتلازمة التي تحصل نتيجة عمليات هدم متوالية وغير عكسية للوحدات الكلوية Nephrons (2). ويمتاز CRF بمرحلة طويلة وهادئة تستمر لعدة أشهر مصحوبة بانتكاسات حادة تبقى لأيام أو لأسابيع (3). يتم تشخيص المراحل الأولى للمرض عن طريق وجود البروتين بالادرار، فقر الدم، ارتفاع ضغط الدم فضلاً عن ارتفاع مستوى الكرياتينين واليورينا في البلازما وكل ذلك يظهر خلال الفحص الروتيني للمريض (3،4). بما أن التدهور في وظائف الكليتين بطيء فلا تظهر أية علامات أو أعراض على المريض الى أن يبلغ معدل الترشيح الكبيبي 15 سم³ لكل دقيقة أو أقل من الدقيقة (3). يعد قياس نشاط الأنزيم في الأدرار طريقة حساسة وكموشر عند حصول أي أذى أو تلف في أنسجة الكلية (5) وبالأخص العجز الكلوي المزمن أذ تعد الظروف المرضية الجزء المهم والمسؤول عن الارتفاع الحاصل في نشاط بعض انزيمات الأدرار (5). وهناك مصادر عدة لأنزيمات الأدرار منها الكلى، القنوات الموجودة في الجهاز البولي التناسلي والمغطة بالخلايا الظهارية (6،7) الأحياء المجهرية (8)، مصل الدم، كريات الدم، الكبد. ومن هذه الأنزيمات (9، 10):

Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Lactate dehydrogenase (LDH), Acid phosphatase (ACP), Alkaline phosphatase (ALP), Alanine aminopeptidase (AAP)

*كلية التربية للبنات، جامعة تكريت.

**كلية العلوم، جامعة بغداد.

***كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد.

الأنزيم (I, II, III, IV) باستعمال تراكيز مختلفة من حامض الاسبارتيك (200, 166.5, 100, 80, 40, 20) ملي مول / لتر لحساب التركيز الأمثل لمتناظرات الأنزيم (I, II, III, IV) فضلاً عن

تعيين قيم ثانت ميكاليس- منتن (Km) باستعمال طريقة لينوفر-بيرك من خلا العلاقة بين مقلوب السرعة $1/v_0$ ومقلوب تركيز المادة الأساس $[S]$.

ب- تأثير الدالة الحامضية:

درس تأثير الدالة الحامضية على سرعة تفاعل المتناظرات (I, II, III, IV) إذ تم تحضير المادة الأساس بتركيز 166.5 ملي مول/لتر في قيم مختلفة من الدالة الحامضية لمحلول دارى الفوسفات (6.8, 7.0, 7.4, 7.6, 8.0) وتم التفاعل في حمام مائي بدرجة حرارة 37°C وحضنت الأنابيب لمدة (60) دقيقة.

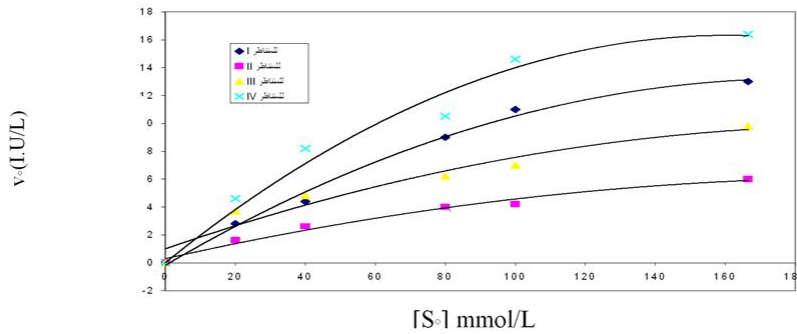
ج- تأثير درجة الحرارة:

درس تأثير درجات الحرارة المختلفة في سرعة تفاعل متناظرات الأنزيم (I, II, III, IV) (AST) إذ أجري التفاعل في درجات حرارية مختلفة (5, 10, 20, 37, 50, 60) $^{\circ}\text{C}$ ، بوجود محلول الفوسفات الدارى ذي الدالة الحامضية (7.4) ، وتركيز (166.5×10^{-3}) ملي مول /لتر من محلول المادة الأساس (حامض الاسبارتيك) . ولحساب قيم الثوابت E_a و Q_{10} تم الاعتماد على المعادلات التالية:

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

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

النتائج والمناقشة:



شكل رقم (1): العلاقة بين تراكيز مختلفة من (حامض الاسبارتيك) ملي مول /لتر وسرعة تفاعل المتناظرات I, II, III, IV المنقاة من ادرار المرضى المصابين بـ (CRF).

تتراوح بين (17-65) سنة، وذلك بعد التاكيد من عدم اصابتهم باي مرض من امراض الجهاز البولي . اما الانموذجات المرضية للمصابين بالعجز الكلوي المزمن CRF فقد تم جمع (25) عينة اخذت من (11) ذكرا و(13) أنثى تتراوح أعمارهم بين (70-22) سنه ، وتم التشخيص من قبل الأطباء الاخصائيين في مستشفى تكريت التعليمي. اذ جمع الادرار المطروح من قبل المريض خلال 24 ساعة في قنينة جافة ونظيفة ، وتم قياس نشاط الأنزيم بعد أخذ العينة مباشرة ، أي لا يتم حفظها لليوم التالي .

طرائق العمل:

1- قياس نشاط أنزيم الاسبارتيك أمينوترانسفيريز AST ومتناظراته في الادرار:

قيس نشاط الأنزيم بالادرار ومتناظراته بالاعتماد على طريقة Reitman and Frankel (1957) ، اذ تعتمد هذه الطريقة على تقدير نشاط الأنزيم من كمية الاوكزواستيت المتكونة خلال التفاعل والتي تعتمد على تفاعل الاوكزالو استيت المتكون مع (4,2) ثنائي نايثرو فنيل هايدرازين) لتكوين أحد مشتقات الفينيل هايدرازين تحت ظروف محددة من درجة الحرارة ودالة حامضية (12).

2- دراسة الصفات الحركية لمتناظرات الاسبارتيك أمينوترانسفيريز I, II, III, IV:

تمت دراسة الصفات الحركية لمتناظرات الأنزيم (AST) (I, II, III, IV) المفصولة والمنقاة جزئياً بدراستنا السابقة من ادرار مرضى العجز الكلوي المزمن (13) كما يلي:

أ- تأثير تركيز المادة الأساس (حامض الاسبارتيك)

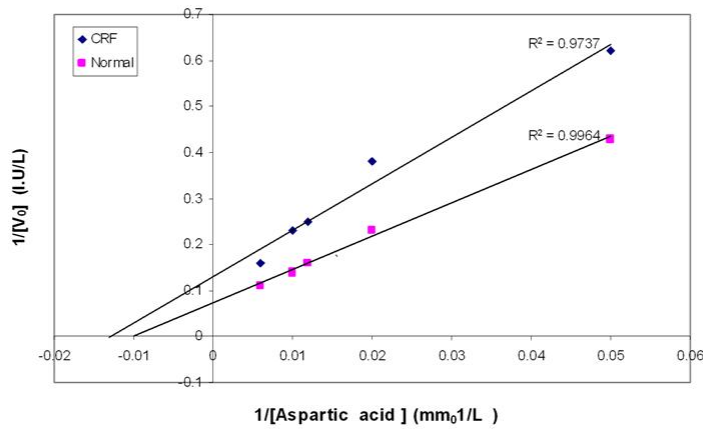
تم دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمادة الأساس (حامض الاسبارتيك) على سرعة التفاعل لمتناظرات

جدول رقم(1): قيم ثابت ميكاليس - منتن (Km)
لمتناظرات (AST) I, II, III, IV المنقاة
جزئياً" من إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بـ
(CRF) بالاعتماد على معادلة لينوفربيرك

Enzyme	Substrate	Km (mole / liter)	
		1/v Vs 1/s	
		Normal	CRF
Isoenzyme I	Aspartic acid	40×10^{-3}	142.8×10^{-3}
Isoenzyme II	Aspartic acid	100×10^{-3}	76.9×10^{-3}
Isoenzyme III	Aspartic acid	40×10^{-3}	33.3×10^{-3}
Isoenzyme IV	Aspartic acid	38.4×10^{-3}	83.3×10^{-3}

لقد أوضحت نتائج الدراسة تأثير تركيز المادة الأساس (حامض الأسبارتيك) في سرعة التفاعل الأنزيمي للمتناظرات I, II, III, IV مع ارتفاع تركيز المادة الأساس حتى يصل إلى السرعة القصوى عند التركيز (1.665 مللي مول/لتر)، ومن ثم تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض عند التراكيز العالية من المادة الأساس نتيجة لحدوث التثبيط (14) كما موضح في الشكل رقم(1).

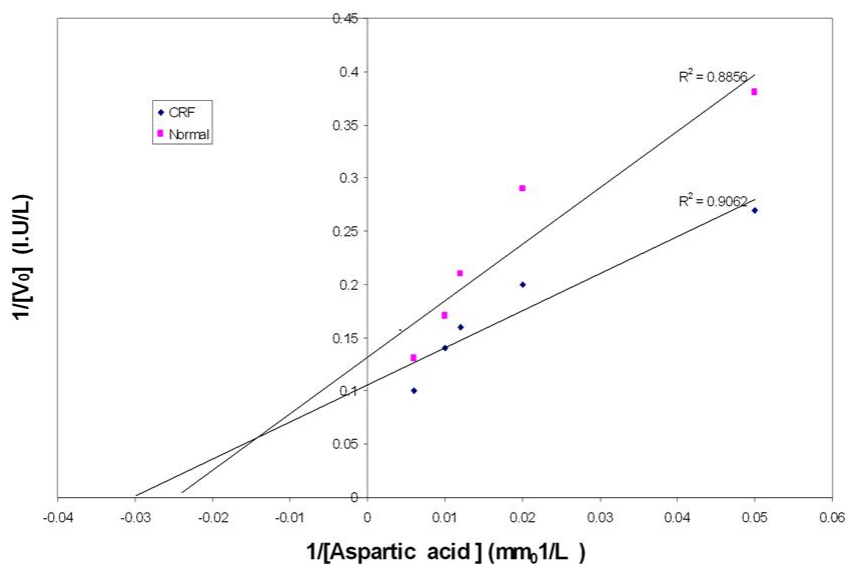
ويشير الجدول رقم(1) إلى وجود فرق واضح بين قيم ثابت ميكاليس- منتن Km التي تم حسابها بالاعتماد على معادلة لينوفربيرك لمتناظرات الأنزيم I, II, III, IV في إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن.



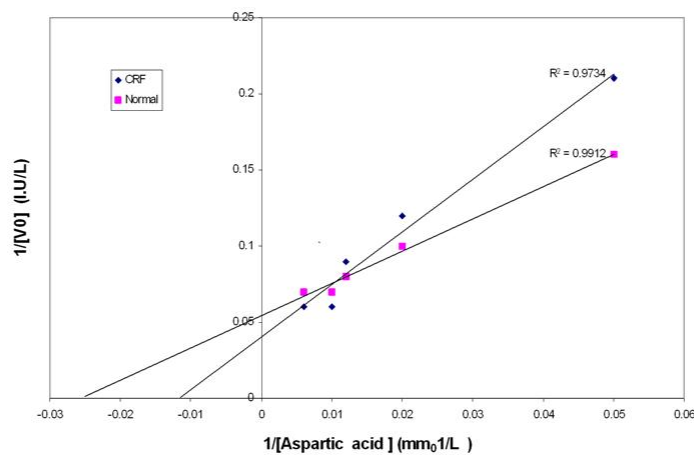
شكل رقم(3): رسم لينوفربيرك لحساب ثابت ميكاليس-منتن للمتناظر II المنقى من إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بـ (CRF)

بلغت (100×10^{-3} مول/لتر) و (40×10^{-3} مول/لتر) على التوالي أما في إدرار المرضى المصابين بـ (CRF) فقد بلغت (76.9×10^{-3} مول/لتر) و (33.3×10^{-3} مول/لتر) على التوالي وهذا يدل على أن ألفة المتناظران II, III لـ (حامض الأسبارتيك) في إدرار الأصحاء أقل من الفتهما في إدرار المرضى المصابين بـ (CRF) وهذا يعود إلى الاختلاف في التركيب البنائي ومراكز الارتباط في الحالة المرضية (8) وكما موضح في الشكلين (3) و(4).

وجد أن قيمة Km للمتناظر I, IV في إدرار الأصحاء (40×10^{-3} مول/لتر) و (38.4×10^{-3} مول/لتر) في حين بلغت (142.8×10^{-3} مول/لتر) و (83.3×10^{-3} مول/لتر) في إدرار المرضى المصابين بـ (CRF) وهذا يدل على أن ألفة متناظري الأنزيم I, IV لـ (حامض الأسبارتيك) في إدرار الأصحاء أكبر من ألفتهما في إدرار المرضى المصابين بـ (CRF) وكما موضح في الشكلين (2) و(5)، فيما نجد أن قيمة Km للمتناظرين II, III في إدرار الأصحاء



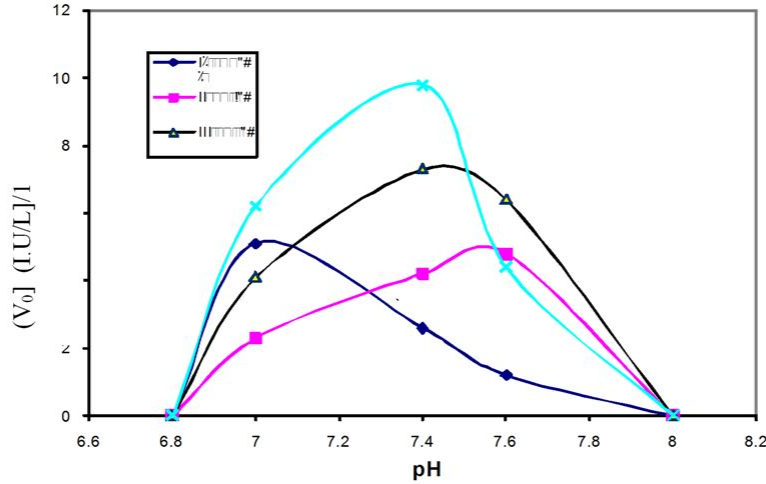
شكل رقم (4): رسم لنيوفر بيرك لحساب ثابت ميكالس-منتن للمتناظر III المنقى من إدرار الاصحاء والمرضى المصابين بـ (CRF)



شكل رقم(5): رسم لنيوفر بيرك لحساب ثابت ميكالس-منتن للمتناظر IV المنقى من إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بـ(CRF)

الحامضية (7.4) للمتناظر IV,III,II,I وتشير الدراسات السابقة الى أن الأنزيم يعمل في دالة حامضية ذات مدى (8.0-7.5) وكما موضح في الشكل رقم (6).

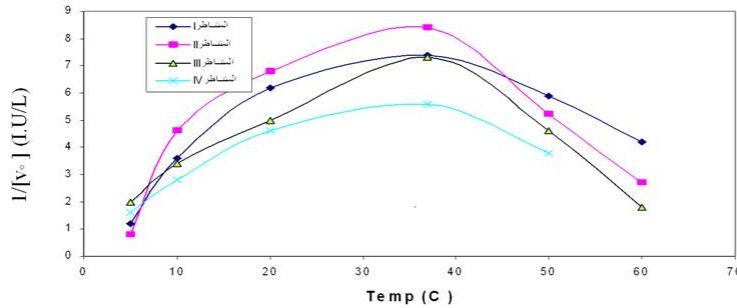
كما أوضحت نتائج الدراسة حدوث ارتفاع في سرعة تفاعل متناظرات AST IV,III,II,I مع ارتفاع الدالة الحامضية الى أن يصل الى سرعة التفاعل القصوى عند الدالة



شكل رقم (6): تأثير الأس الهيدروجيني على سرعة تفاعل المتناظرات IV,III,II,I المنقاة من ادرار المرضى المصابين بـ (CRF).

الحرارة الى حد الوصول الى سرعة التفاعلات القصوى عند الدرجة الحرارية (37)°م ومن ثم تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض.

كذلك أظهرت نتائج الدراسة تأثير درجة الحرارة في سرعة تفاعل متناظرات الأنزيم IV,III,II,I وفي السرعة القصوى Vmax وكما موضح في الشكل (7) إذ ترتفع سرعة التفاعل بأرتفاع درجات



شكل رقم (7): تأثير درجة الحرارة في سرعة تفاعل المتناظرات IV,III,II,I

$\ln k = -Ea/RT + \text{constant}$
وقد أظهرت النتائج بأن المتناظرات IV,III,II,I لمعادلة أرينوس حتى درجة (37)°م . كماتم حساب طاقة التنشيط للتفاعل Ea وذلك من ميل الخط

أما الشكل رقم (8) فيوضح العلاقة بين لوغاريتم السرعة القصوى Vmax للمتناظرات IV,III,II,I ضد مقلوب درجة الحرارة المطلقة التي تعطي خطأ مستقيماً والتي تتبع معادلة أرينوس الآتية (16):

Ea: طاقة التنشيط
 Q₁₀: معامل درجة الحرارة
 R: الثابت العام للغازات (1.987)
 T: درجة الحرارة المطلقة (كلفن)
 ومن ملاحظة الجدول نجد أن قيمة Q₁₀ تطابق الأدبيات العلمية بأن قيم معامل درجة الحرارة Q₁₀ للتفاعلات الأنزيمية تقع بين (2-1) أي تقع ضمن مدى التفاعلات الأنزيمية (17).

البياني للوغاريتم V_{max} ضد 1/T*10⁻³ والتمثل بالمعادلة الآتية:

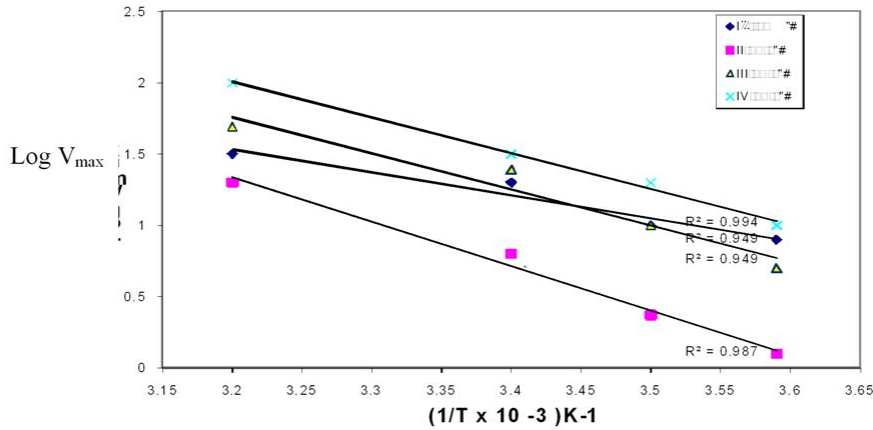
$$\log k = -Ea/2.3R * 1/T + \log A$$

لذا فإن ميل الخط البياني = -Ea/2.3R

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

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

حيث أن:



شكل رقم (8): رسم لعلاقة أرينوس بين تأثير مقلوب درجة الحرارة المطلقة ضد لوغاريتم السرعة القصوى لمتناظرات الأنزيم I, II, III, IV.

- 2-Isselbacher, K.J. 1987. Harrison's principle of internal medicine 2. New York, 11th ed. pp 1140-1158.
- 3-Edwred, C.R.W. 2006. Davidson's principle and practice of Medicine a text book for student doctors. British Government, 20th ed. pp 512-514.
- 4-Whitby, L., Smith, A. and Becktt, G. 1989. Lecture notes on clinical chemistry. Black well Scintific Publications, 4th ed, pp 108-169.
- 5-Maruhn, D., Wehling, K. and Metz, U.J. Clinica. 1986. Chemica. Acta, 160: 150-155.
- 6-Kumar, A., Pandey, H.N., Sharma, G., Pandey, D.N., and Sur B.K. 1987. Urinary aspartate transaminase

جدول رقم (2): قيم (Ea), (Q₁₀) لمتناظرات (AST) I, II, III, IV

Enzymes	Ea (cal)	Q ₁₀
Isoenzyme I	7263	1.5
Isoenzyme II	12868	1.9
Isoenzyme III	8401	1.6
Isoenzyme IV	10720	1.9

المصادر

- 1-Anderson, J. 1989. Muir's text book of pathology. Longman Group Ltd, 12th ed, pp 183-260.

- 12-Reitman,S. and Frankel,S.1975. Amer. J.Clin.Path. 28:56.
- 13- Al-Salihi ,F.Gh. , AL-Mudffer,S.A. ,Al-Akobie,T.U.2009. Activity of Aspartate aminotransferase and its isoenzymes partially purified from urine of patients with chronic renal failure., Proceedings of 1st Scientific Conference-College of Science,Tikrit University.
- 14-Marino,G, Anna Maria. G, Scardi. V, and Zito. R. 1966.Purification and general properties of aspartate a ox heart,Biochem J. 99(3):589-594.
- 15-Wielend,G. and Molinof, P.1981. Life Sci, 29:31.
- 16- Al-Mudaffer,S.1976. Iraqi Med.J. 24:17.
- 17-Segal,I.,1976, Biochemical calculation ,J.Wiley& Sons Inc., 2nd ed., p.408
- (AST)activity and figurine,J. Physiol.Pharmac.31(1): 13-17.
- 7-Al-Madani,N.A.2006.Biochemical studies of lactate dehydrogenase with partial purification of its isoenzymes from urine of patients with renal diseases .M.Sc.thesis,College of Education for women ,Tikrit university.
- 8-Al-Akobie,T.U.2000.Biochemical studies of Aspartate aminotransferase isoenzymes; isolation and partial purification from urine of patients with chronic renal failure .M.Sc.thesis,College of Eudction for women ,Tikrit university.
- 9-Okane,D.and Gunsalus,I.C.1974. J.Biol.Chem. 107:433.
- 10-DC. Gaze. 2007. The role of existing and novel cardiac biomarkers for cardioprotection, Curr. Opin.Invest.Drugs,8(9): 711-717.
- 11-Hibbs,C.M.and Coles,E.H. 1965. Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y). 118;1059.

Kinetic studies of AST isoenzymes I,II,III,IV partially purified from patient's urine with chronic renal failure

*Ferah Gh.Al-Salihi** *Sami A. AL-Mudffer ***
*Tagreed U.Al-Akobie**

*College of Eudction for women,Tikrit university

** College of science,Baghdad university

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

Abstract:

In this research, the kinetic studies of four isoenzymes of Aspartate aminotransferase, which partially purified from the urine of chronic renal failure patients were carried out .The four isoenzymes were obeyed Michaelis-Menton's equation and the optimum concentration of their substrate (Aspartic acid) was (166.5×10^{-3}) mole/liter,and their Km values were determined.

Four isoenzymes I,II,III,IV have shown an optimum pH at 7.4.The four isoenzymes obeyed Arrhenius equation up to 37° C and their Ea and Q10 constants were determined .