----- مجلة علوم الرافدين، المجلد 18، العدد 2، ص36-43، 2007-----

قياس فعالية انزيم 5 ` – نيوكليوتايديز وانزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الحوامل المصابات ببعض أمراض العظام

هدى يونس العطار إيمان سمير الصوفي

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2007/2/1، تاريخ القبول 2007/4/2)

الملخص

تضمنت الدراسة قياس فعالية كل من انزيمي 5 `– نيوكليوتايديز والفوسفاتيز القاعدي وتركيز الكالسيوم في (42) عينة دم لنساء حوامل مصابات ببعض امراض العظام فضلاً عن (25) عينة دم من مجاميع السيطرة من الوافدات الى العيادات الطبية الخاصة بالامراض النسائية، إذ تراوحت اعمارهن (20–40) سنة لكل من النساء الحوامل المصابات ومجاميع السيطرة.

أظهرت النتائج زيادة معنوية في فعالية الانزيمين 5 `– نيوكليوتايديز والفوسفاتيز القاعدي في مصل النساء الحوامل المصابات مقارنة بمجاميع السيطرة في حين ظهر إنخفاض معنوي في تركيز عنصر الكالسيوم في مصل النساء المصابات مقارنة بمجاميع السيطرة.

Estimation of `5 – Nucleotidase Activity and Alkaline Phosphatase in Serum of Pregnant Women With Some Bone Diseases

Huda Y. Al-Attar **Eman S. Al-Soffi**

Department of Biology

College of Science

Mosul University

ABSTRACT

Serum `5 – Nucleotidase, Alkaline phosphatase activities and Calcium concentration were measured in fourty – two pregnant women with some bone diseases. As well as in twenty-five healthy women as control group. In comparison to control group. The results show significant increase in serum `5 – Nucleotidase and Alkaline phosphatase activities and Singnificant decrease in serum calcium concentration in all patients.

المقدمة

من الاستعمالات المهمة للانزيمات هو استخدامها في المجالات الطبية، ففي حالات عديدة يتم قياس مستوى فعالية الانزيمات في الحالات الطبيعية والمرضية ويستفاد منها في تشخيص الامراض ومعالجتها (الجلبي وميكائيل، 2000). ومن هذه الانزيمات هي 5 ¯ – نيوكليوتايديز والفوسفاتيز القاعدي، يقع هذا الانزيم في مسار معقد يؤدي الى تكوين حامض اليوريك Uric Acid من نيوكليوتيدات البيورين، وبالرغم من وضوح المسار باتجاه التقويض الا ان مسارات الانقاذ موجودة وتعمل على استعادة النيوكليوتيدات وحتى القواعد النايتروجينية الطليقة الى نيوكليوتيدات مرة ثانية (Spychala et al., 1999) ويمثل عمل هذا الانزيم الخطوة النهائية ضمن مسار يؤدي الى تحويل الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP)Adenosine Triphosphate الى النيوكلوسيد الذي غالباً مايستخدم في استرداد النيوكليوتيدات. ويعمل الانزيم على إزالة الفوسفات غير العضوية المتأسترة مع ذرة الكاربون رقم (5) لسكر الرايبوز او الدي اوكسي رايبوز لجزئيات النيوكليوتيد (Kavatcu and Melzig, 1999). وهناك عدة طرق لقياس فعالية انزيم الـ 5 ¯ – نيوكليوتايديز، كما يمكن قياس فعالية انزيم 5 ¯ – نيوكليوتايديز بوساطة طرق الكيمياء النسيجية، فضلاً عن ذلك صممت عدة طرق لقياس فعالية الانزيم المذكور باستخدام اقتفاء النظائر المشعة، كما وضعت طريقة قياس فعالية الانزيم في مصل الدم من قبل الباحث Campbell (1962). ودرس الانزيم ايضاً في خلايا اللبائن المختلفة ودرس ايضاً في النباتات، وان انزيم 5 ¯ – نيوكليوتايديز انزيم متخصص يعمل على نيوكليوتيدات 5¯– احادي الفوسفيت البيورينية والبريمدينية. وتختلف خصوصية الانزيم تجاه مادة الاساس باختلاف المصدر الذي يؤخذ منه الانزيم (Belfield and Goldberg, 1971).

أما انزيم الفوسفاتيز القاعدي فينتمي الى صنف الانزيمات المحللة مائياً التي تساعد على انفلاق المركبات الحاوية على اصرة فوسفات الاستر بوجود الماء عند الرقم الهيدروجيني (10.0 – 9.6) لينتج عنه تكوين الكحول وحامض الفوسفوريك (Wotten, 1974). يتواجد هذا الانزيم في عدة أعضاء في الجسم مثل الكبد والكلى وكذلك اغشية الخلايا ، كما يوجد بتراكيز عالية في الغشاء الظهاري للامعاء وفي العظام (خلايا التعظم) والانابيب الكليوية الدقيقة والمشيمة (Zilva et al., 1988). ويأتي القسم الاكبر من الانزيم الموجود في الدم من النسيج العظمي والكبدي ويتم افرازه في الدورة الدموية من هذين النسيجين ولهذا فان ارتفاع نشاط هذا الانزيم غالباً مايرجع الى مرض أحد هذين العضوين، كما يلاحظ ارتفاعه في الحالات المرضية كاليرقان الانسدادي والتهاب الكبد الفايروسي والتهاب القناة الصفراوية والتهاب العظام (Murry et al., 1993).

أما عنصر الكالسيوم فله تأثير بايولوجي مهم إذ يعمل بوصفه عاملاً مساعداً ضمن الانزيمات داخل الخلايا (Carroll and Schade, 2003). كما يعمل مراسلاً ثانوياً في معظم وظائف الخلايا (Sherwood, 2004). كما أن له دور رئيسي في بناء هيكل الجسم لمعظم الفقريات ومنها الانسان وان نقص عنصر الكالسيوم يسبب العديد من امراض العظام كما في لين العظام وتخلخلها والتي من خصائصها قلة في كتلة العظم وكثافته والتي تؤدي الى كسر في العظم تحت ضغط بسيط (Khitam et al., 2002).

المواد وطرائق البحث

اولاً : العينات:

لغرض إجراء هذا الاختبار تم جمع (42) عينة دم من نساء حوامل مصابات ببعض امراض العظام كالروماتيزم وهشاشة ووهن العظام من الوافدات الى بعض عيادات الامراض النسائية في مدينة الموصل فضلاً عن جمع (25) عينة دم من الاناث الحوامل السليمات ظاهرياً من منتسبات جامعة الموصل.

ثانياً : طريقة العمل :

أجريت الاختبارات التالية على مصل الدم:

1. اختبار فعالية انزيم 5 ˉ – نيوكليوتايديز:

تم قياس فعالية انزيم 5 ˉ – نيوكليوتايديز في مصل الدم باتباع الطريقة المحورة من الباحثين (Wood and Williams, 1981; Campbell, 1962). والتي تعتمد على قياس كمية الفوسفيت المتحررة من تحضين المصل (الانزيم) ومادة الاساس (5-AMP) واحتسبت فعالية انزيم 5 ˉ – نيوكليوتايديز عن طريق أخذ الفرق في الامتصاصية بين النموذج والسيطرة، إذ تمثل الامتصاصية في انبوب النموذج فعالية انزيم 5 ˉ – نيوكليوتايديز وانزيم الفوسفاتيز القاعدي معاً، أما الامتصاصية في انبوب السيطرة فتمثل فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي فقط لان انزيم الـ 5 ˉ – نيوكليوتايديز تم تثبيطه بواسطة ايون النيكل (Ni+2)، وهكذا فان الفرق في الامتصاصية بين النموذج والسيطرة يمثل فعالية انزيم 5 ˉ – نيوكليوتايديز، إذ تم القياس باستخدام المحول المنظم Sodium diethyl barbiturate buffer بتركيز (40) ملي مولار ودالة حامضية (7.5) وتركيز (10) ملي مولار في المادة الاساس (Adenosine Monophosphate)، فضلاً عن (10) ملي مولار كلوريد النيكل و (0.1) مولار كبريتات النحاس وتعرف الوحدة الانزيمية (U) بانها كمية الانزيم التي تعمل على تحرير واحد مايكرومول من الفوسفيت اللاعضوي في الدقيقة الواحدة، اما وحدة قياس فعالية الانزيم فتمثل عدد وحدات الانزيم (U) الموجودة في لتر واحد من المحلول. وبالنسبة لمحتويات الانابيب فهي كالاتي:

- محلول الاختبار Test solution:

تم وضع (1) مليليتر من المحلول الكاشف المستخدم في انبوبة الاختبار ثم أضيف اليها (10) مايكروليتر من المصل.

- المحلول القياسي Standard solution:

تم وضع (1) مليليتر من المحلول الكاشف المستخدم في انبوبة اختبار ثانية، ثم أضيف اليها (10) مايكروليتر المحلول القياسي.

- المحلول الكفء Blank solution:

تم وضع (1) مليليتر من المحلول الكاشف المستخدم في انبوبة اختبار ثالثة، بعد ذلك مزجت الانابيب الثلاثة وحضنت في حمام مائي بدرجة (37) م مدة عشر دقائق لاتمام التفاعل، ثم قيست شدة اللون عند طول موجي (618) نانوميتر مقابل محلول الكفء إذ بقي اللون ثابتاً مدة (60) دقيقة.

وأحتسبت فعالية الانزيم وحدة/لتر (U/L) وقيست الامتصاصية عند طول موجي (618) نانوميتر.

2. اختبار فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي :

تم استخدام عدة Kit من انتاج شركة (Bio. Merieux) الفرنسية، حيث اتبعت الطريقة المشار اليها في عدة العمل، وتم احتساب فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في العينة بوحدة لكل لتر (U/L).

3. اختبار عنصر الكالسيوم :

تم تقدير تركيز عنصر الكالسيوم باستخدام عدة Kit جاهزة من انتاج شركة (Bio. Merieux) الفرنسية، حيث اتبعت الطريقة المشار اليها في عدة العمل، وتم احتساب تركيز عنصر الكالسيوم في العينة بوحدة (ملي مول/لتر).

التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج احصائياً إذ استخدم اختبار t-test لعينات السيطرة و Z-test لعينات المريضات وتم تثبيت مستويات المعنوية ($P<0.05$, $P<0.001$) وعدت النتائج معنوية عند مستوى ($P<0.05$) او أقل (Kirkwood , 1988) .

النتائج والمناقشة

بينت نتائج الجدول (1) ادناه وجود زيادة معنوية ($P<0.01$) في فعالية انزيم 5 $^{-}$ نيوكليوتايديز في مصل الاناث الحوامل مقارنة بمجموعة السيطرة ولجميع الفئات العمرية، ويعود هذا الى ضعف مناعة الجسم وقلة مقاومته للامراض بتقدم الحمل والعمر (Edwards & Bouchier, 1999)، وربما يعود الى أن انزيمات النيوكليوتايديز لها متناظرات انزيمية عديدة، منها مانكون مرتبطة بالجدار ومنها مايكون سايتوبلازمي لانهما يسهمان في تنظيم الايض الخلوي للخلايا المختلفة (Hokari and Sakagishi, 1992) وان لانزيمات النيوكليوتايديز وظيفة متخصصة ومهمة تؤدي الى خفض شحنة الطاقة أثناء زيادة تحمل العمل وضيق التنفس والجهد كالتي تحدث في حالات الحمل (Zimmermann, 1992). وتظهر الاهمية السريرية لهذا الانزيم من خلال تغير قيم فعاليته في العديد من الامراض كامراض الكبد والحمل (Wood and Williams, 1981). ولوحظ زيادة فعالية هذا الانزيم في بعض حالات الامراض السرطانية ولاسيما التي تؤدي الى حدوث انسداد في القناة الصفراوية (Kaplan and Pesce, 1989). كما اثبتت الدراسات ايضاً حدوث إنخفاض في فعالية انزيم 5 $^{-}$ نيوكليوتايديز في الامراض الوراثية للانسان، (Hokari et al., 1998). وهكذا يتضح أن انزيم 5 $^{-}$ نيوكليوتايديز من الانزيمات التي يمكن استخدامها في التشخيص وتتبع التأثيرات المرضية (Al-Kubasi, 1989).

الجدول 1 : فعالية انزيم 5 ˉ – نيوكليوتايديز في مصل دم الحوامل مقارنة بمجاميع السيطرة وحسب الفئات العمرية.

الفئات العمرية (سنة) / المتغيرات	25 – 20 سنة		30 – 26 سنة		40 – 31 سنة	
	السيطرة	الاناث الحوامل	السيطرة	الاناث الحوامل	السيطرة	الاناث الحوامل
فعالية انزيم 5'-NT (وحدة / لتر)	± 11.98 0.32	** ± 16.22 0.76	± 12.41 0.28	*** ± 18.63 0.51	± 14.20 0.38	*** ± 22.07 1.02

** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية ($P<0.01$).

*** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية ($P<0.001$).

كما يوضح الجدول (2) وجود زيادة معنوية في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي وهذا يتوافق مع ماجاء به Rosalki (1998) و Hoshino وآخرون (1998) وهذا يعود الى زيادة فعالية الاورمات العظمية وتكوين العظام إذ أن هذه الاورمات هي مصدر الفوسفاتيز القاعدي في العظم (Bishop et al., 1985). وأن مستويات فعالية هذا الانزيم هي من الدلائل المهمة لتكون العظم وادمصاصه كنتيجة لتحطم الكولاجين (Ross and Knowlton, 1998) فضلاً عن أن الفوسفاتيز القاعدي ذات علاقة بعملية تكون العظم الفعالة خاصة (Kleerkoper, 2001; Swaminathan, 2001). ويرتفع نشاط الانزيم ايضاً في سرطان العظم والكبد والبنكرياس والبروستات وأنسجة اخرى، وتنخفض فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في قصور الغدة جنب الدرقية وفي حالة تأخر نمو الاطفال (Wotton, 1974).

وتدل الدراسات على أن وظيفة انزيم الفوسفاتيز القاعدي وظيفة ايضية، وتتركز أهميته في تشخيص نوعين من الحالات المرضية امراض العظام وامراض الكبد ، حيث تتميز امراض العظام بزيادة ملحوظة في مستوى هذا الانزيم في مصل الدم، ومن أهم هذه الامراض مرض كساح العظام وسرطان العظام (Martin et al., 1985). كما أكدت العديد من الدراسات أن هناك زيادات ملحوظة في حالة الحمل عند المرأة وتعزى هذه الزيادة الى افراز انزيم الفوسفاتيز القاعدي من قبل المشيمة (العمري، 1982).

الجدول 2 : فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل دم الحوامل مقارنة بمجاميع السيطرة وحسب الفئات العمرية.

الفئات العمرية (سنة) / المتغيرات	25 – 20 سنة		30 – 26 سنة		40 – 31 سنة	
	السيطرة	الاناث الحوامل	السيطرة	الاناث الحوامل	السيطرة	الاناث الحوامل
فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (وحدة / لتر)	± 58.22 7.71	** ± 60.31 8.32	± 59.46 5.43	** ± 64.11 6.21	62.54 4.80±	*** ± 68.18 7.14

** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية (P<0.01) .

*** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية (P<0.001) .

ويتوضح من الجدول (3) وجود إنخفاض معنوي (P<0.01) في تركيز الكالسيوم في مصل الاناث الحوامل وبتقدم العمر مقارنة بمجموعات السيطرة، وهذا قد يعود الى قلة الكالسيوم عن طريق الغذاء او نقص فيتامين D او يعود الى فقدان التعرض للاشعة فوق البنفسجية بسبب ارتداء الملابس السميكة، فضلاً عن أن الاناث المتقدمات بالسن ليس لهن القدرة على امتصاص الدهون ومنها فيتامين D وهذه الحالة تحدث في الاناث الحوامل اللواتي يعانين من اضطراب الهضم وهذا يقود الى انخفاض مستوى الكالسيوم (AL-Qazaz, 2002; Seeley et al., 1992).

كما أن العديد من الدراسات أكدت أن للتغذية تأثير كبير على عمليات الايض في العظم خاصة بناء التركيب الهيكلي لجسم الانسان (Khitam et al., 2002).

الجدول 3 : تركيز الكالسيوم في مصل دم الحوامل مقارنة بمجاميع السيطرة وحسب الفئات العمرية.

الفئات العمرية (سنة) / المتغيرات	25 – 20 سنة		30 – 26 سنة		40 – 31 سنة	
	السيطرة	الاناث الحوامل	السيطرة	الاناث الحوامل	السيطرة	الاناث الحوامل
تركيز الكالسيوم (ملي مول / لتر)	± 2.56 0.13	** ± 2.34 0.16	± 2.27 0.19	** ± 2.08 0.18	± 2.16 0.16	** ± 1.96 0.09

** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية (P<0.01).

*** فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية (P<0.001).

المصادر العربية

الجلبي، قصي عبد القادر وميكائيل، محمد حسين، 2000. دراسة مقارنة لخواص وفعالية انزيم الادينوسين دي أمينيز في مصل وكريات الدم الحمراء للانسان. مجلة علوم الرافدين، المجلد (11)، العدد (3)، ص 23–32.

العمري، محمد رمزي، 1986. الكيمياء السريرية العملي. دار التقني للطباعة والنشر، المعهد الطبي التقني / قسم التحليلات المرضية، الطبعة الاولى، ص 157–163.

المصادر الاجنبية

Al-Kubasi, S.B., 1989. Community-Based Approaches for the Primary Prevention and Control Diabetes Mellitus Among Baharrin Population, J., Bahrrain Med. Soc., Vol. 11, No. 1, pp.4 - 5.

Al-Qazaz, H.Kh., 2002. Biochemical Features and Treatment of Osteomalacia. M.Sc. Thesis, College of Pharmacy, University of Mosul – Iraq.

Belfied, A. and Goldberg, D.M., 1971. Activation of Serum 5'- Nucteotidase by Magnesium Ions and Its Diagnostic Application. J., Clin. Path. Vol. 22, pp.144-151.

Bishop, L., Dubenvonlaufen, J.L. and Fody, E.P., 1985. Clinical Chemisty: Principles, Procedures and Correlations. J.B. Lippincott company, London.

Campell, D.M., 1962. Determination of 5'- Nucteotidase in Blood Serum. Biochem. J., Vol. 82, pp.34-39.

Carroll, M.F. and Schade, D.S., 2003. A Practical Approach Hyper- Calcemia. Am. Fam. Phys., Vol. 67, pp.1959-1966.

Edwards, C.R.W. and Bouchier, I.A.D., 1999. Davidson's Principles and Practice of Medicine. 18th ed., Churchill Livingstone, London. pp.471-538.

Hokari, S., Miyazaki, S., Haseqawa, M. and Komoda, T., 1998. Enhanced Activity of Pyrimidine 5'- Nucleotides in Rat Red Blood Cells During Erythropoiesis. Bio. Chem.., Vol. 379, pp.329-333.

Hokari, S. and Sakagishi, Y., 1992. Purification and Characterization of Cytoplasmic 5'(3') – Nucleotidase from Rabbit Spleen: Characteristics Differences of the Enzyme from the Rat Spleen Nucleotidase. Comp. Biochem. Physiol., Acta., Vol. 657, pp.399-405.

Hoshino, H., Kushida, K., Takahashi, M. and Kawana, K., 1998. Characteristics of Biochemical Markers in Patients with Metabolic Bone Disorders. Endocr. Res., Vol. 24, No. 1, pp.55-64.

Kaplan, L.A. and Pesce, A.J., 1989. Clinical Chemisty Theory Analysis and Correlation. 2nd ed., Pub., C.V. Mos by Company, U.S.A.

Kavucta, M. and Melzig, F., 1999. In Vitro Effect of Selected Flavonoids on the 5'- Nucteotidase Activity. Pharmaize, Vol. 54, No. 6, pp.457-459.

Khitam, A.A., Abdul-Wahab, R.H., Jwad, H., 2002. Serum Zinc, Copper, Iron and Selenium in Osteoporotic Patients. Iraqi J. Comm. Med. Oct. 2002, Vol. 15, No. 4, pp.85-88.

Kirkwood, B.R., 1988. Essentials of Medical Statistics. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1st ed., pp.43-56.

Kleerekoper, M., 2001. Biochemical Markers in Bone Turnover: Why Theory, Research and Clinical Practice are Still in Conflict. Clin. Chem., Vol. 47, No. 8, pp.1347-1349.

Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwall, V.W. and Cranner, D.K., 1985. Harper's Review of Biochemistry. 20th ed., Lange Medical Publication Los Altos, California.

Murry, R.K., Granner, D.K., Mayers, P.A. and Rodwell, V.W., 1993. Harper's Biochemistry 22 ed. Middle East Edition. Lebanon, pp.679-689.

Rosalki, S.B., 1998. Biochemical Markers of Bone Turnover. Int. J. Clin. Pract., Vol. 52, No. 4, pp.255-256.

Ross, P.D. and Knowlton, W., 1998. Rapid Bone Loss is Associated with Increased Levels of Biochemical Markers. J. Bone. Miner. Res., Vol. 13, No. 2, pp.297-392.

Seeley, R.R., Stephens, T.D. and Tate, P., 1992. Anatomy and Physiology. 2nd ed., Mosby Year Book. Boston. 934 p.

Sherwood, L., 2004. Human Physiology, from Cell to System. 5th ed., Thomson Learning Inc., USA, pp.81-83, 701-707, 733-735.

Spychala, J., Albert, G.Z. and Beverly, S.M., 1999. Tissue- Specific Regulation of the 5'- Nucteotidase Promotor J. Biol. Chem. Vol. 24, No. 32, pp.22705-22712.

Swaminathan, R., 2001. Biochemical Markers of Bone Turnover. Clin. Chem. Acta., Vol. 313, pp.95-105.

Tietz, N.W., 1986. Text book of Clinical Chemistry. W.B. Sanders Company, Philadelphia.

Wood, R.J. and Williams, D.G., 1981. Colorimetric Determination of Serum 5'- Nucteotidase without Deproteinization. Clin. Chem.., Vol. 27, No. 3, pp.464-465.

Wotton, I.D., 1974. Microanalysis in Medical Biochemistry. LDD. London, Group Limited, pp.113-116.

Zilva, J.F., Pannall, P.R. and Mayn, P.D., 1988. Clinical Chemistry in Diagnosis Treatment. 5th Edition. Adward Arnold. London, pp.213-225.

Zimmermann, H., 1992. 5' – Nucleotidase: Molecular Structure and Functional Aspects. Biochem. J., Vol. 285, pp.345-365.