دراسة الصفات الحركية لمتناظر أنزيم المالتيز I في أدرار المرضى المصابين بالداء السكري

تغريد علوم محمد علي* نزار أحمد ناجي سيران ستار صالح*****

***قسم الكيمياء، كلية التربية أبن الهيثم– جامعة بغداد**

****قسم الكيمياء، كلية العلوم– جامعة تكريت**

***** قسم الكيمياء، كلية العلوم– جامعة كركوك**

تاريخ الاستلام:٢٠١٠/٦/٢٩ ،تاريخ القبول:٢٠١١/٣/٨

الخلاصة

تضمن البحث الحالي دراسة الصفات الحركية لمتناظرأنزيم المالتيز I من أدرار المرضى المصابين بالداء السكري، أذ وجد أن المتناظرI يخضع لمعادلة ميكاليس–منتن، إذ كان التركيز الأمثل للمادة الأساس، المالتوز (300 ملي مول/دسم^3)، كما وجد حدوث أرتفاع في سرعة تفاعل المتناظر I مع أرتفاع الرقم الهيدروجيني الى أن يصل الى سرعة التفاعل القصوى عند (6.5) لفوسفات البوتاسيوم الدارئ و(7.5) لثلاثي أيثانول أمين ،وقد لوحظ أن المتناظر I لأنزيم المالتيز يخضع لمعادلة أرينوس حتى (25)°م وتم تعيين الثوابت طاقة التنشيط (Ea) و معامل درجة الحرارة(Q_{10}) لمتناظر المالتيز بعد أن تم قياس فعالية الأنزيم في عينات أدرار مرضى الداء السكري وتنقيته وفصل متناظراته في دراسة سابقة.

المقدمة

داء السكري من الأمراض السريرية الموصوفة بارتفاع نسبة السكر في الدم (Hyperglycemia) بسبب النقص المطلق أو النسبي للأنسولين، نتيجة عوامل عدة أهمها اختلال في عمل غدة البنكرياس والتمثيل الغذائي وخاصة السكريات في الكبد (Mader, 2001) ،أن مستوى السكر ضمن الحدود الطبيعية في الإنسان تتراوح (125-60)ملغم/مل من دم الإنسان الصائم. توجد أسباب عدة تساعد على حدوث الداء السكري منها الاختلال في الغدة الصماء (Endocrine disorder)، تناول بعض الأدوية التي لها تأثيرات جانبية على مستوى السكر، السمنة فضلاً عن الاختلال في التوازن الهرموني، كما أن عمر المريض له علاقة مباشرة في ظهور الداء السكري إذ كلما تقدم الإنسان في العمر كان احتمال الإصابة أكبر بالمرض،(Arneson& Brickell, 2007; Scott & Spener, 2000) كما بينت العديد من

الدراسات أن مرض السكر له ارتباط وثيق بالعوامل الوراثية وأن تحديد هذه العوامل مـــايزال غير واضح إذ يتركز تأثير هذه العوامل على حدوث التحطم المناعي الذاتي (Autoimmuno destruction) للخلايا المسوؤلة عن أنتاج الأنسولين(Rabha *et al.*, 2003).

أن أنزيم الألفا–D– كلوكوسيديز(EC 3.2.1.20)المعروف بالمالتيزالحامضـــي هـــوانزيم يتكون في الخلايا المبطنة للأمعاء الدقيقة للانسان التي تحلل السكر الثنائي المالتوز وهو يعد من صنف الأنزيمات المحللة للكاربوهيدرات (Hydrolysis) والذي يفرز بوساطة الخلايا الموجودة على سطح الزغابات في الأمعاء الدقيقة والتي تختلف في شكلها عن الأثنى عشر واللفائفي (Pena *et al.* 2004; Shim *et al.*, 2003). يحلل أنزيم المالتيز الرابطة الكلايكوسيدية مـــن نوع ألفا (4-1) بين جزيئات الفا– كلوكوزفي المالتوزمما يحرر جزيئتين من ألفا– كلوكوز (Bremeyer, 1975). يوجد المالتيز في البنكرياس (Dhanawansa *et al.*, 2002) ، الغشاء المخاطـــي للأمعاء الدقـــيقة،(Houghton& Carty, 1973; He *et al.*, 2006) ، الكـــبد (Rosenweig & Human, 1968)، الكلية (Sato *et al.*, 1999)، السائل المنوي للـــذكور في الانسان (Sheth & Rao, 1962; Lieberman & Eto, 2009)، مصل الدم فضلا عـــن وجوده في النبات، الفطروالخميرة (Li & Chan, 1983). إنَّ الخلل أو النقص فـــي المـــالتيز الحامضي يمكن أنْ يؤدي إلى مـــرض خـــزن الكلايكـــوجين نـــوع II (Pompe's disease) (Opuchlik *et al.*, 2006)، كما يفيد تحديد نشاط المالتيز في التعرف علـــى كفـــاءة وظيفـــة الخصية وخصوصا عند حدوث التهاب او انسداد فيها (Keulemans *et al.*, 2006).

الهدف من البحث الحالي هو دراسة الصفات الحركية لمتناظر الأنزيم المالتيز I المنقى من أدرار المرضى المصابين بالداء السكري.

المواد وطرائق العمل

العينات:

تم جمع (50) عينة أدرار من الأصحاء (25) ذكور و(25) إناث تتراوح أعمارهم (-80 40)سنة، و(50)عينة مرضية أخذت من أدرار المرضى المصابين بالداء السكري (30) ذكور و(20) إناث، أعمارهم تتراوح (40-90)، تم التشخيص من قبل الأطباء الأخصائيين في مستشفى سامراء العام.

١– قياس فعالية أنزيم المالتيز في الأدرار:

تم قياس فعالية الأنزيم بالأدراربالأعتماد على طريقة Dahlqvist (1964)، إذ تعتمد هذه الطريقة على كمية الكلوكوز المتحرر بوساطة tris/glucose oxidase/peroxidase وتقاس امتصاصية NADP المختزل بفعل نشاط المالتيزعند طول موجي 340 نانوميتر (Perira & Sivakami, 1989; Potter *et al.*, 1980).

٢– دراسة الصفات الحركية لمتناظر المالتيزI:

تمت دراسة الصفات الحركية لمتناظر أنزيم المالتيز I في الأجزاء الناضحة الذي تم فصله وتنقيته من الأدرار وفقاً لطريقة KUMAR وذلك لغرض تخليصه من المثبطات ومن خلال أستخدام خطوتين (Salman, 2009).

١– الفرز الغشائي Dialysis

يوضح حوالي ١٠ سم٣ من الأدرار في كيس الفصل الغشائي ثم يُنزل الكيس في محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ لـــpH=٧,٤ مع التحريك المستمر بأستخدام جهاز المحرك المغناطيسي Magnetic Citerrer ولمدة ٢٤ ساعة في درجة حرارة الثلاجة (٤ درجة مئوية) للحفاظ على نشاط الأنزيم.

٢– الترشيح الهلامي Gel Filtration

تم تنقية الأنزيم من الأدرار بأستخدام عمود ترشيح الهلام سيفادكس G-25 الذي يعمل على أساس الأختلاف في الوزن الجزيئي وكما يلي :–

١– أستعمل عمود زجاجي بقطر ١,٥ مللتر وطول ٢٠ سم وضع في نهايته قليل من الصوف الزجاجي لمنع حبيبات الهلام من التسرب خارج العمود، ثم تم سكب المحلول العالق للهلام في العمود بصورة بطيئة ومتجانسة لمنع تكون فقاعات هوائية الى ان يصل ارتفاع الهلام الى ٨سم، يُغسل بعد ذلك عمود الهلام بكميات كافية من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ لـــpH =٧,٤ حتى يتم الحصول على معدل سرعة تدفق Floweret بمقدار ٥٠ سم٣/٣٠ دقيقة.

٢– أضيف ٥ سم٣ من الأدرار الفصل الغشائي ببطئ فوق سطح هلام الترشيح .

٣– ثم الفصل باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ له ٤٥ سم٣ من المحلول الدارئ وتم جمع ١٠ أنابيب من الأجزاء الناضجة وبحجم ٥ سم٣ وبدرجة حرارة (٤ درجة مئوية).

ومن الصفات الحركية المدروسة لمتناظر أنزيم المالتيزI هي :–

أ– تأثير تركيز المادة الأساس (المالتوز):

درس تأثير التراكيز المختلفة للمادة الأساس (المالتوز) على سرعة تفاعل المتناظر I لأنزيم المالتيز بأستعمال تراكيز مختلفة من المالتوز(200,166.5,100,80,40,20)ملي مول/ مليلتر لحساب التركيز الأمثل لمتناظر الأنزيم. وكذلك تم تعيين قيم ثابت ميكاليس– منتن(Km) للمادة الأساس (المالتوز) تبعاً لرسم لينوفر– بيرك من خلال العلاقة بين مقلوب السرعة الأولية [$v_\circ$] ومقلوب المادة الأساس [$s_\circ$] (Murray *et al.*, 2003) .

ب– تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الأنزيم:

درس تأثير الرقم الهيدروجيني على سرعة فعالية المتناظر I وذلك بتحضير المادة الأساس بتركيز(300) ملي مول/مليلتر في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (7.5,7.0,6.0,6.5,5.5) لفوسفات البوتاسيوم الدارئ وتم التفاعل في حمام مائي بدرجة حرارة (25)م° وحضنت الأنابيب لمدة (30) دقيقة.

ج– تأثير درجة الحرارة:

درس تأثير درجات الحرارة المختلفة في سرعة تفاعل متناظر الأنزيم المالتيز I، إذ تم أجراء التفاعل في درجات حرارية مختلفة (45,35,25,15,5)م°، باستعمال المالتوز بتركيز(300) ملي مول/مليلتر ورقم هايدروجيني (6.5) لفوسفات البوتاسيوم الدارئ .

ء– تأثير درجة الحرارة في قيمة السرعة القصوى V_{max} لمتناظر أنزيم المالتيز I:

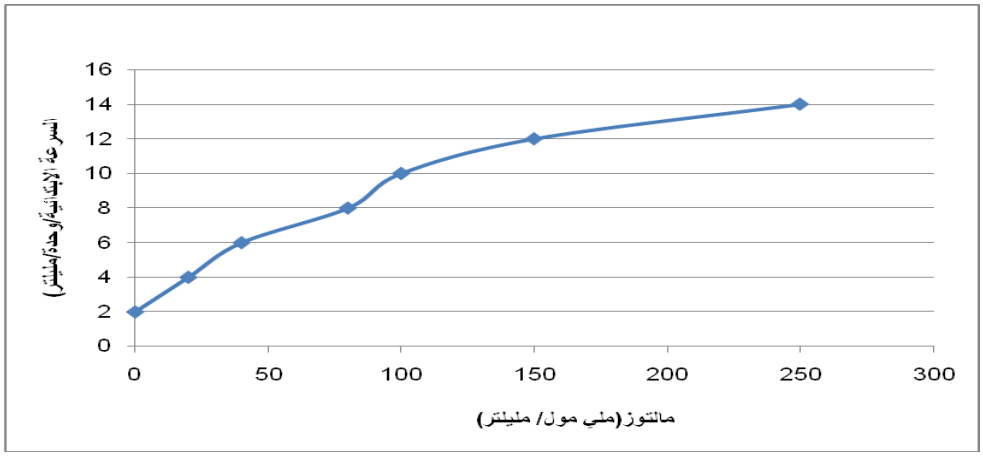
درس تأثير درجة الحرارة في قيمة V_{max} إذ أجري التفاعل الأنزيمي في درجات حرارية مختلفة (45,35,25,15,5) م°، باستعمال المادة الأساس (المالتوز) عند رقم هايدروجيني (6.5) لفوسفات البوتاسيوم الدارئ وحسبت قيمة V_{max} أعتماداً على المعادلات ذات العلاقة (Murray *et al.*, 2003).

النتائج والمناقشة

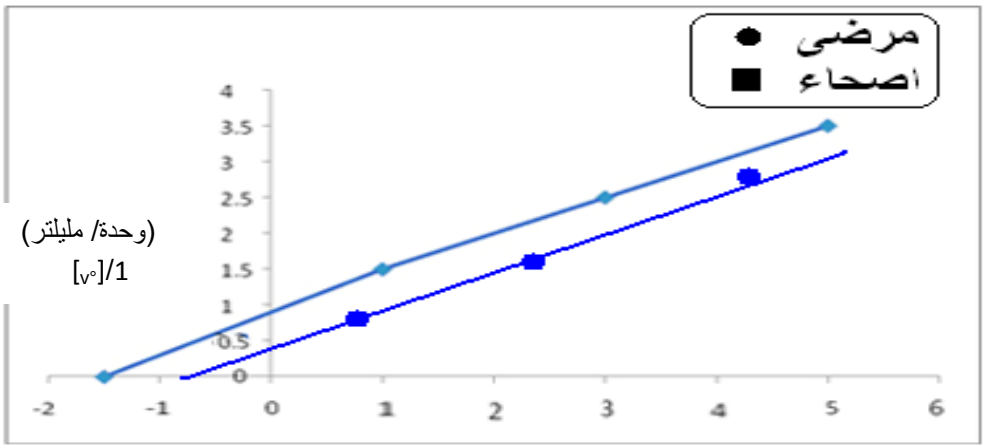
لقد أوضحت الدراسة تأثير تركيز المادة الأساس (المالتوز) في سرعة التفاعل الأنزيمي للمتناظر I حيث وجد ان أرتفاع تركيز المادة الأساس يزيد من سرعة الأنزيم حتى يصل الى السرعة القصوى عند التركيز (300)ملي مول/ مليلتر، ومن ثم تبدأ سرعة التفاعل بالأنخفاض عند التراكيز العالية من المادة الأساس نتيجة لحدوث التثبيط كما موضح في الشكل رقم (1).

وتشير نتائج الدراسة إلى أن قيم ثابت ميكاليس– منتن Km التي تم حسابها بالأعتماد على معادلة لينوفر–بيرك للمتناظر I في أدرار الاصحاء قد بلغت (0.76×10^{-3} مول /لتر) وكما موضح في الشكل (2). أما في أدرار المرضى المصابين بالداء السكري فقد بلغت قيم Km (0.012

$x10^{-3}$ مول/لتر) وما موضح في الشكل (3). يشير الجدول رقم (1) الى وجود فرق واضح بين قيم الـــKm لمتناظر الأنزيم في أدرار الاصحاء والمرضى المصابين بالداء السكري فوجد أن قيمة الـــKm للمتناظر I في أدرار الاصحاء أكثر من قيمته في أدرار المرضى المصابين بالداء السكري وهذا يدل على أن الفة متناظر الانزيم للمالتوز في أدرار المرضى المصابين بالداء السكري أكبر من ألفته في أدرار الأصحاء وهذا يعود الى الاختلاف في التركيب البنائي ومراكز الأرتباط في الحالة المرضية (AL- Akabi, 2006) .



شكل (1): العلاقة بين تراكيز مختلفة من المادة الأساس (المالتوز) ملي مول/دسم^{3} وسرعة تفاعل المتناظرI المنقى من أدرار المرضى المصابين بالداء السكري.

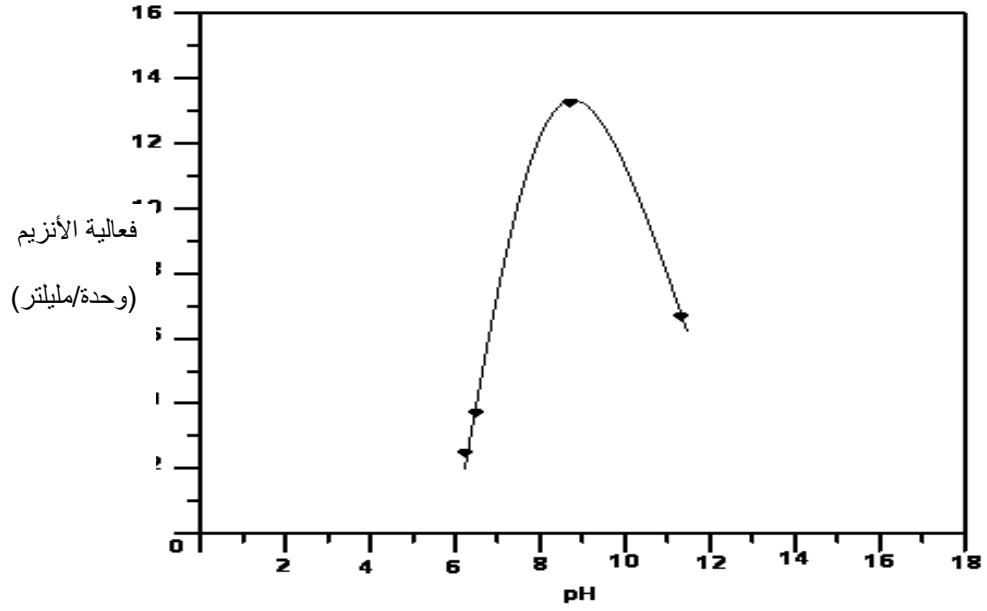


شكل(2): رسم لينوفر– بيرك لحساب ثابت ميكاليس– منتن للمتناظرI المنقى من ادرار الأصحاء والمرضى المصابين بالداء السكري.

جدول (1): يوضح قيم ثابت ميكاليس– منتن (Km) لمتناظر أنزيم المالتيز I المنقى جزئياً من أدرار الأصحاء والمرضى المصابين بالداء السكري بالاعتماد على معادلة لينوفر– بيرك.

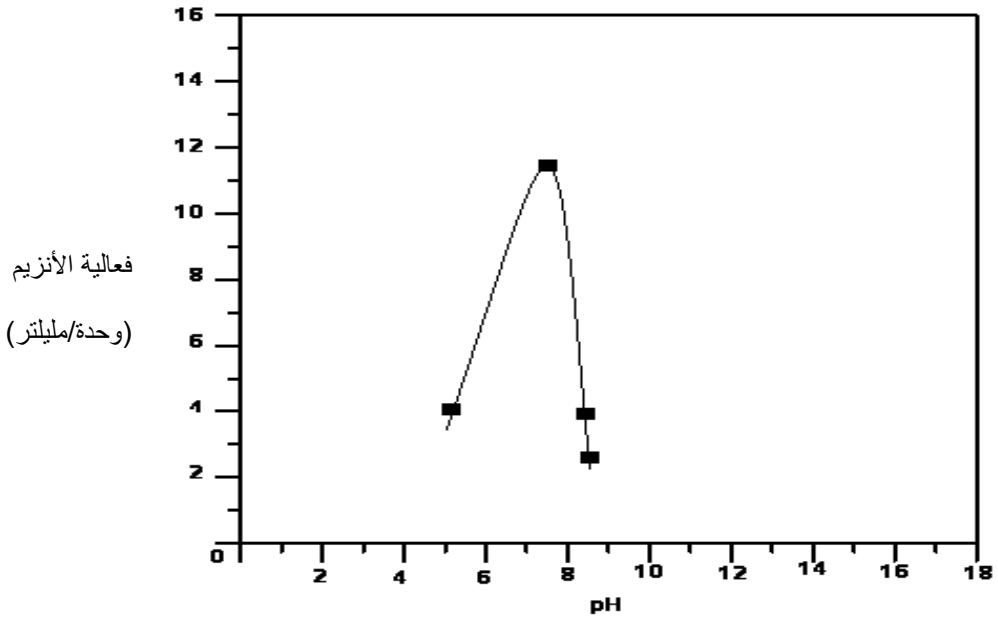
Enzyme	Substrate	Km (mole / liter)x 10^{-3}	
		1/v Vs. 1/[S]	
Isoenzyme I	maltose	Healthy	Diabetes mellitus
		0.76	0.012

كما أوضحت نتائج الدراسة حدوث أرتفاع في سرعة تفاعل متناظر الأنزيم المالتيزI مع أرتفاع الدالة الحامضية الى أن يصل الى سرعة التفاعل القصوى عند الرقم الهيدروجيني (6.5) لفوسفات البوتاسيوم الدارئ و(7.5) لثلاثي أيثانول أمين وهذا يتطابق مع الدراسات السابقة أذ لوحظ بأن الأنزيم المنقى من أدرار الانسان يعمل في دالة حامضية تتروح بين (6.5 -7.5)، في حين الرقم الهيدروجيني الأمثل له يكون عند (7.0-7.5) (AL-Akabi, 2006). بعدها تنخفض سرعة التفاعل مع أرتفاع الرقم الهيدروجيني ،وكما موضح في الشكلين (3) و(4).



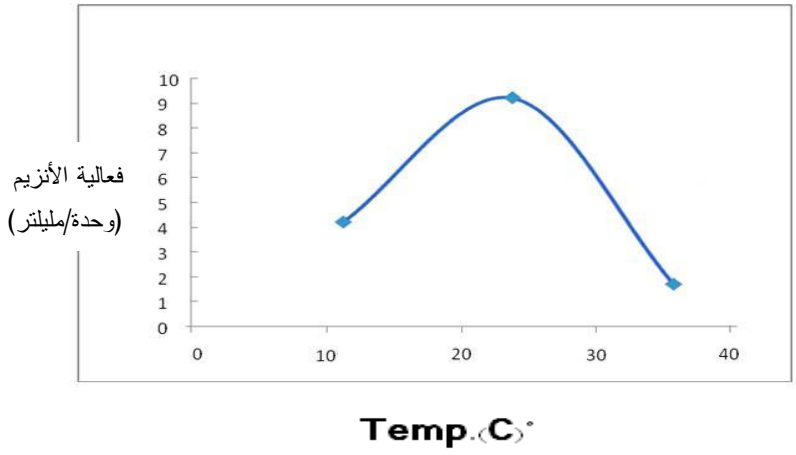
شكل(3): تأثير الرقم الهيدروجيني لفوسفات البوتاسيوم الدارئ على سرعة تفاعل المتناظر I المنقى من إدرارالمرضى المصابين بالداء السكري.

المرضى المصابين بالداء السكري.



شكل (4): تأثير الرقم الهيدروجيني لثلاثي أيثانول أمين على سرعة تفاعل المتناظر I المنقى من إدرارالمرضى المصابين بالداء السكري.

كذلك أظهرت نتائج الدراسة تأثير درجة الحرارة في سرعة تفاعل متناظر الأنزيم المالتيز I وفي السرعة القصوى V_{max} وكما موضح في الشكل رقم (5)، ترتفع سرعة التفاعل بأرتفاع درجة الحرارة الى حد الوصول الى سرعة التفاعل القصوى عند الدرجة الحرارية (25) م° ومن ثم تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض، أن ارتفاع درجة الحرارة لـــ10 م° سوف يزيد من فعالية الانزيم من (50 -100)% في حين تتغير درجة الحرارة من (1-2) م°يمكن أن يزيد الفعالية من (10-20)% (منسي و الشريده، ٢٠٠٠) .فعالية الأنزيم(وحدة/مليلتر)



شكل (5): تأثير درجات الحرارة على سرعة تفاعل المتناظرI لأنزيم المالتيز

أما الشكل (6) فيوضح العلاقة بين لوغارتيم السرعة القصوى Vmax اامتناظرI ضد مقلوب درجة الحرارة المطلقة التي خطاً مستقيماً والتي تتبع معادلة أرينوس الآتية:

$Lnk=-Ea/RT+Constant$

وقد أظهرت النتائج بأن المتناظرI يخضع لمعادلة أرينوس حتى درجة (25) م° كما تم حساب الطاقة المنشطة للتفاعل Ea وذلك من ميل الخط البياني للوغاريتم Vmax ضد ($1/ T x10^{-3}$) مقلوب درجة الحرارة والمتمثل بالمعدلة الآتية:

$Logk=-Ea/2.3R*1/T+LogA$

لذا فان ميل الخط البياني = $-Ea/ 2.3 R$ والتقاطع =Log A (ثابت أرينوس) ويوضح الجدول (2) قيم الطاقة المنشطة Ea وقيم Q_{10} من خلال المعادلة الآتية:

$Ea=2.3RT_{2*}T_1LogQ_{10}/10$

إذ أن:

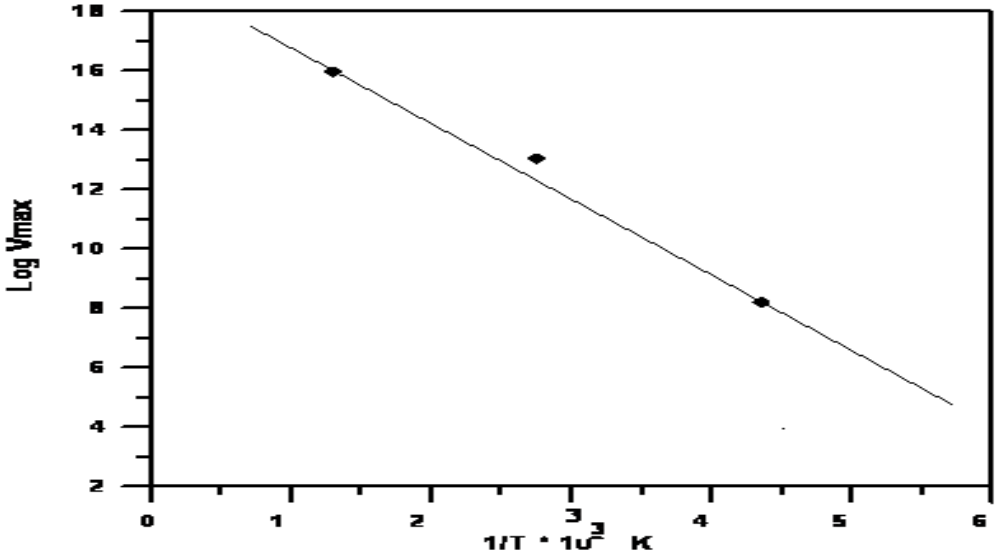
طاقة التنشيط: Ea

معامل درجة الحرارة :Q_{10}

الثابت العام للغازات (1.987): R

درجة الحرارة المطلقة: T

ومن ملاحظة الجدول رقم(2) نجد أن قيمة Q_{10} تطابق الحقيقة القائلة بأن قيم معامل درجة الحرارة Q_{10} للتفاعلات الأنزيمية تقع بين (2-1) أي تقع ضمن مدى التفاعلات الانزيمية .



شكل (6): منحني أرينوس للعلاقة بين لوغاريتم السرعة القصوى لمتناظر I ومقلوب درجة الحرارة المطلقة.

جدول (2): يوضح قيم E_a و Q_{10} لمتناظر انزيم المالتيز I.

Enzymes	E_a (Cal)/ mol	Q_{10}
Isoenzyme I	11.362	1.0007

References

- AL-Akabi ,T.U., (2006): Biochemical studies of alanine aminopeptidase isoenzyme partially purified from patients urine having urinary tract cancer Ph.D. thesis, College of Education, Tikrit university.
- Arneson,W. and Brickell, J., (2007): Clinical chemistry A laboratory Perspective, F. A Davis Company, 149 p.
- Bremeyer,H.U., (1975): Method of enzymatic analysis, AcademiPress, NewYork,2ndedition, 209 p.
- R. Dhanawansa, A. Faridmoayer, G. Van der Merwe, Y.X.Li and Ch.H. Scaman, (2002): Overexpression, purification, and partial characterization of Saccharomyces cerevisiae processing alpha glucosidase l, Glycobiology, Vol. 12, No. 3, pp. 229-234.
- He ,Z., Bolling L., Tonb, D., Nadal, a.and Mehta, D., (2006): An Automated method for the determination of Intestinal Disaccharidase and Glucoamylase Activity, Journal of Automated Methods and Management in Chemistry, 4 p.
- Houghton, S.E. and Mc Carty, C.F., (1973): The isolation , partial characterization, and subfraction of human intestinal brush borders, Gut, Vol.14, No.7, pp.529-534.
- Keulemans, J. L.M., Kroos, M. A., Vander Beer ,N.M.E. and Reuser, A. J.J., (2006): A new diagnostic assay for glycogen storge disease type II in mixed leukocytes, J. Molecular Genentics and Metabolism, Vol.88, No.1, pp. 22-28.
- Li, K. B. and Chan, K.Y., (1983): Production and properties of alpha – glucosidase from Lactobacillus acidphilus, Appl Environ Microbiol, Vol.46, No.6, pp. 1380-1387.
- Lieberman, I. and Eto, W.H., (1956): Purifiction and Properties of Equine serum maltase, The Journal of Biological chemistry, Downloaded from www.jbc.org byon june 9, 2009, 900 p.
- Mader, S.S, (2001): Understanding human anatomy and physiology, exclusive rigts by the Mc Graw- Hill companies, Inc, 4th edition, pp. 322- 331.
- Murray, R. K. ,Granner, d. k., Mayes , P. A. ,Rodwell , v. w., (2003): Harpers Illustrated Biochemistry , London , pp. 60-71
- Opuchlik, A., Lugwska,a. Nadaj, A., Bojakowski J., Tylki- Szymaska A. and kaminska, A. (2006): Juvenal onest acid maltase defeicincy

presenting as a rigid spine syndrum,J. Neuromuscular Disorders, Vol.16, No.4, pp. 282-285.

- Pena,P.,Risopatron,J.,Villegas,J.,Miska,W.,Schill,W.B.and Sanchez, R., (2004): Alapha glucosidase in the human epididymis: topgraphic and clinical application, A ndrologia, Vol. 36, No. 5, pp. 315- 320(6).
- Perira B. and SivaKami,S., (1989): Neutral maltase / glucoamylase from Rabbit renal cortex, Biochem. J, Vol. 126, pp. 43-47.
- Potter, JL., Robinson, HB., Kramer ,JD. and Schafter, IA., (1980): Apparent normal leukocyte acid maltase activity in glycogen storge disease type II (Pompe's disease), J. clinical Chemistry, Vol.26, pp.1914-1915.
- Rabha, V., Vimaleswaran, K.S., Deepa, R. and mohan,v., (2003): The genetice of diabetes mellitus, lndian J Med Res, Vol.117, pp. 225- 238.
- Rosenweig, N. and Human, R.H. (1968): Control of Jejunal sucrose and maltase activity by dietary sucrose of fryctose in man : A model for the study of enzyme regulation in men, J. Clin. Invest, Vol.47, No.10, pp. 2253-2262.
- Salman.M.H.(2009): Thermodynamic & Kinatic Study On Maltase Isoenzymes Partially Purified From Urine Of diabetic Patients,M.Sc. thesis, College of Education, Tikrit university.
- Sato ,S., Okamoto ,K., Minami ,R., Kori, H. and Yamaoto,S., (1999): Trehalose can Be used as a Parenteral Saccharide Source in Rubbits, The Journal of Nutrition, Vol.129, No.1, pp.158-164.
- Scott, L.J.and Spener, C.M., (2000): Miglitol: a review of it's therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus , Drugs, vol.59, No.3, pp. 521-49.
- Sheth, A. R. and Rao,Shanta S., (1962): Maltase activity in human semen, Cellular and Molecular life sciences, Vol.18, No.8, pp.370-372.
- Shim, Y- J., Doo, H., Ahn, S., Kim ,Y., Seong, J.and Min, I-S. B-H. (2003): Inhibitory effect of equeos extract from the gall of Rhus chinensis on alpha- glucosidase activity and postprandial blood glucose,Journal of Ethnopharmacology, Vol.85, No.2-3, pp.283-287.

المصادر

- منسي، عرسان أرشيد والشريدة ، محمد شريف، (٢٠٠٠): مقدمة في الكيمياء الحيوية السريرية (١)، الطبعة الأولى ،عمان –الأردن، دار وائل للنشر.

Study of Kinetics Properties of Maltase Isoenzyme I in The Urine Of Patients With Diabetes Mellitus

Tagreed U.Mohmad* Nazar A. Naji Sayran S. saleh*****
*** Department of Chemistry, College of Education IBN Al- Hatham**
****Department of Chemistry, College of Science**
University of Tikrit
***** department of Chemistry, College of Science-University of Kirkuk**

Accepted: 8/3/2011، Received:29/6/2010

Abstract

In this research, the kinetics study of one isoenzyme of Maltase, which purified from the urine of diabetes mellitus patients was studied. Maltase isoenzyme was obeyed Michaelis- Mentons eqution. The optimum concentration of their substrate Maltose was (300 mmol/dm^3). Their Km values was determined. Isoenzyme of Maltase have shown an optimum pH at (6.5) for phosphate buffer and (7.5) for tri ethanol amine. Maltase isoenzyme obeyed Arrhenius eqution up to 25°C and their Ea and Q_{10} constant were determined, after measuring the activity of Maltase of urine of diabetes mellitus patients. Isoenzyme of Maltase was separated and purified in previous study from urine of patients of diabetes mellitus.