------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 4، خاص بالكيمياء, ص8-16، 2006 ------

دراسة فعالية أنزيم الأدينوسين دي أمنيز في مصل وكريات الدم الحمر للمرضى المصابين بابيضاض الدم الحاد والمزمن

زهراء محمد علي حمودات

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2006/1/4 , تاريخ القبول 2006/4/24)

الملخص

تم دراسة الفعالية النوعية لأنزيم الأدينوسين دي أمنيز في مصل ومتحلـل كريـات الـدم الحمـر للمرضى المصابين بابيضاض الدم ، أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية لفعالية الأنزيم في مصل ومتحلل كريات الدم الحمر للمرضى مقارنة بالأصحاء ومتجانسين من حيث الجنس والعمر، حيث ان معدل فعالية الادينوسين دي امنيز التي عبر عنها بنانومول من الادينوسين المزال منه الامين/دقيقة/ملغم بروتين فـي المصل ومتحلل كريات الدم الحمر في المرضى هي (35.42±5.64) و(94.48±5.99) على التوالي، بينما كان معدل الفعالية في الأصحاء (13.68±1.72) و(60.56±6.55) في المصل ومتحلل كريات الدم الحمـر على التوالي ، ووجد ان ليس لعامل الجنس والعمر ونوع المرض سواء ابيضاض الدم اللمفاوي الحـاد أو ابيضاض الدم النقوي المزمن تأثير معنوي على فعالية الأنزيم.

وأظهرت النتائج ازدياد في تركيز البروتين الكلي مع انخفاض في تركيز الكالسيوم لمصل المصابين في حين لم يظهر فرق معنوي للفوسفاتيز القاعدي والهيموكلوبين في الأصحاء وابيضاض الدم.

وبينت النتائج ايضا وجود علاقة طردية بين فعالية الأنزيم والبروتين الكلـي ($r=0.368;p<0.05$) وعكسي مع الكالسيوم في مصل المرضى.

Study of Adenosine Deaminase Activity in Serum and Erythrocytes from Patients Affected by Acute and Chronic Leukemia

Zahraa M. Hammodat
Department of chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

Adenosine deaminase specific activity was studied in serum and erythrocyte haemolysate for patients with leukemia.

The results show an increase with a significant difference of activity enzyme in serum and erythrocyte for patients compared with normal individuals of the same age and sex. The results obtained showed adenosine deaminase specific activity by unite of nmole of adenosine deaminated/min/mg protein in serum and erythrocyte haemolysate of patients were (35.42±5.64) and (94.48±5.99) respectively, while the mean value of activity in normal individuals were (13.68±1.72) and (60.56±6.55) in serum and erythrocyte haemolysate respectively.

The analysis also indicated that factors of sex, age and type of disease Acute Lymphocytic Leukemia or Chronic Myelocytic Leukemia have no effect on the activity of enzyme in patient's serum and erythrocytic haemolysate. Moreover, higher concentration of total protein the decline in calcium level is found in the serum of the patients, while no significant deference of alkaline phosphates and hemoglobin in leukemia and normal individuals

Finally, the statistical results has been shown that positive correlation between activity enzyme and total protein ($r=0.369; p<0.05$) and negatively with calcium ($r=0.505$; $p=0.0001$) in patient's serum.

المقدمة

يعد مرض ابيضاض الدم من الأمراض الخبيثة الذي يسبب اضطراباً في تكاثر ونمو الخلايا المكونة لأنسجة الدم Haemopoietic (Hean, 1995; William et al., 1991) فيحصل تكاثر غير منتظم لخلايا الدم البيض مما يؤدي إلى زيادة غير طبيعية في أعدادها (William et al.,1991; Edwards and Bouchier, 1999)، وهناك نوعان رئيسيان من مرض ابيضاض الدم:

- ابيضاض الدم الحاد Acute Leukemia: ويشمل ابيضاض الدم النقوي الحاد(AML) Acute Myelocytic Leukemia وابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (ALL) Acute Lymphocytic Leukemia
- ابيضاض الدم المزمن Chronic Leukemia: ويشمل ابيضاض الدم النقوي المزمن Chronic Myelocytic Leukemia (CML) وابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (CLL) Chronic Lymphocytic Leukemia.

وجميع هذه الأنواع مميتة إذا تركت بدون معالجة (الصغري وآخرون، 1992)، وقد وجدت زيادة في فعالية أنزيم الأدينوسين دي أمنيز Adenosine Aminohydroase (EC 3.5.4.4) في مرضى ابيضاض الدم وحالات مرضية عديدة، مثل مرض داء كريف وداء هاشيموتو (Karbowink et al., 2002) ومرضى المصابين بفرط الغدة الدرقية(علي، 2004)، كما أشار الباحثين صالح والجوادي (2000) إلى وجود زيادة معنوية كبيرة في فعالية الأنزيم لمتحال كريات الدم وكذلك مصل الدم للأطفال المصابين بفقر دم البحر المتوسط(الثلاسيميا) Thalassemia غير المعالجين مقارنة مع الاطفال الطبيعيين، إذ يحفز التحال المائي للإزالة الأمينية غير العكسية بتفاعل التحال المائي للادينوسين أو ديوكسي أدينوسين لينتج الأنوسين وديوكسي أنوسين على التوالي (Gakis, 1996; Kobayashi et al., 1993; Ungerer et al., 1992 ;Chottoner et al., 1987)، وقد وجد ثلاث متناظرات متماثلة للأنزيم، ويعد أنزيم الأدينوسين دي أمنيز الثاني المركب الرئيسي في مصل الدم(Ratech et al., 1988; Rotandaro, 1981) ويوجد الأنزيم بمستوى عالي في الطحال والرئتان والعقد اللمفاوية بينما يوجد في مستوى قليل في عضلة القلب Myocardium والعضلات والكليتان والمثانة والكبد (Yasuda et al., 1996)، وقد لوحظ زيادة في فعالية الأنزيم في الأنسجة اللمفاوية وهنالك علاقة عكسية بين فعالية الأنزيم والمناعة (Gakis,1996; Ungerer et al., 1992). ويعتقد أن الأنزيم من الأنزيمات المستهدفة للمعالجة الكيمياوية لذا استهدف البحث الحالي كمحاولة لدراسة هذا الأنزيم في مصل وكريات الدم الحمر لحالات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد وابيضاض الدم النقوي المزمن في أثناء المعالجة بالمقارنة مع الحالات الطبيعية.

المواد وطرائق العمل

1. الحالات المرضية والطبيعية

تضمنت الدراسة (35) حالة إصابة بمرض ابيضاض الدم في أثناء المعالجة (19 إناث، 16 ذكور)، إذ اشتملت على (18) حالة إصابة بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد و (17) حالة إصابة بابيضاض الدم النقوي المزمن، تراوحت أعمارهم بين (15-70) سنة ، جمعت من مستشفى حازم الحافظ للأورام والطب النووي في الموصل والمستمرين على العلاج وذلك بعد التشخيص من قبل الاختصاصيين، وتضمنت الدراسة أيضاً (40) حالة شخص طبيعي (18 إناث، 22 ذكور) تراوحت أعمارهم بين (15-70) سنة، وقسمت الحالات المرضية والطبيعية إلى ثلاث فئات عمرية (15-25 و 26-41 و 42-70 سنة)، ودونت المعلومات الخاصة بالمرضى وفق استمارة الاستبيان المعدة لهذا الغرض، وقد تم جمع الدم الوريدي في أنابيب نظيفة وجافة وخالية من موانع التخثر وفصل مصل الدم، وحفظ في درجة حرارة (-20ºC) في المجمدة لحين إجراء القياسات، وأهملت عينة الدم المتحللة في جميع الفحوصات وخصوصاً قياس فعالية الأنزيمات.

2. فصل كريات الدم الحمر:

استخدم دم غير متخثر بحجم (4-5) مليلتر لفصل كريات الدم الحمـر باتبـاع طريقـة Beulter وجماعته (1977)، ثم حضر منها متحلل كريات الدم الحمر باتبـاع طريقـة Price وStevens (1989) لغرض الكشف عن تواجد فعالية أنزيم الأدينوسين دي أمنيز.

3. قياس المتغيرات الكيموحيوية

أ- قياس فعالية الأنزيم الأدينوسين دي أمنيز

قيست الفعالية النوعية لأنزيم الأدينوسين دي أمنيز في مصل الدم ومتحلل كريـات الـدم الحمـر باستخدام الطريقة اللونية المتبعة من قبل الجلبي وميكائيل (2000) وتعتمد هذه الطريقة على تحديد كميـة الأمونيا الناتجة لونياً باستخدام كاشف ماريباخ Marbach's reagent عند الطول الموجي (630) نانوميتر، وتم التعبير عن الفعالية النوعيـة للادينوسـين دي امنيـز بنـانومول مـن الادينوسـين المـزال منـه الأمين/دقيقة/ملغم بروتين وبالرجوع الى المنحني القياسي لكبريتات الامونيوم.

ب- قياس فعالية الأنزيم الفوسفاتيز القاعدي

قيـست فعاليـة الأنـزيم الفوسـفاتيز القاعـدي (ALP) فـي مـصل الـدم باسـتخدام طريقـة (Kind and King, 1954) .

ج- قياس تركيز البروتين الكلي

قدر البروتين الكلي بطريقة بايوريت (Crandall, 1983).

د- قياس تركيز الكالسيوم

قدر الكالسيوم بالطريقـة اللونيـة وباستخـدام عـدة التحليـل (Kits) الجـاهزة مـن شركـة Biomeriux.

و- قياس تركيز الهيموكلوبين

قدر الهيموكلوبين باستخدام طريقة (Drabkin and Austin, 1935).

4. التحليل الإحصائي:

حللت نتائج الدراسة الحالية إحصائياً باستخدام اختبار t-Test لبيان الاختلاف بين مجموعتين عـن مستوى الاحتمالية ($p\leq 0.05$)($p=0.0001$) . كما تم إيجـاد معامـل الارتبـاط الخطـي Correlation Coefficient لإيجاد العلاقة بين الفعالية النوعية لأنزيم الأدينوسين دي أمنيز والمتغيـرات الكيموحيويـة المقاسة (Armitage, 1974).

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج ان الفعالية النوعية لأنزيم الأدينوسين دي أمنيز في متحال كريات الدم الحمر أعلى مما في المصل وبفرق معنوي عند مستوى الاحتمالية ($p<0.00$) في مجموعة الأصحاء ومجموعة المصابين بابيضاض الدم.

ويبين الجدول (1) ان الفعالية النوعية للأنزيم في المصل ومتحال كريات الدم الحمر في مرضى ابيضاض الدم أعلى مما في مصل ومتحال كريات الدم الحمر في الأشخاص الأصحاء وبفرق معنوي عند مستوى احتمالية ($p<0.0001$) وهذا يتفق مع ما توصل اليه كل من (Gakis,1996;Ungerer et al.,1992; Liso et al., 1978)، وربما يعزى سبب الزيادة في فعالية الأنزيم إلى زيادة معدل سرعة تحال كريات الدم الحمر غير المكتملة العمر مما يؤدي إلى إلقاء محتوياتها من الأنزيمات إلى المصل وبالتالي يؤدي إلى زيادة فعالية الأنزيم، كما يتفق ايضاً مع (Kobayashi et al.,1993;Chottiner et al.,1987) في وجود زيادة فعالية الأنزيم في كريات الدم الحمر في أمراض السرطان.

الجدول 1 :الفعالية النوعية لأنزيم الأدينوسين دي أمنيز في مصل ومتحال كريات الدم الحمر في الأصحاء والمرضى

مصدر الأنزيم	الانحراف القياسي ± المعدل		**قيمة P
	*الفعالية النوعية الأصحاء	*الفعالية النوعية المرضى	
مصل	13.68 ± 1.72	35.42 ± 5.64	0.000
متحال كريات الدم الحمر	60.56 ± 6.55	94.48 ± 5.99	0.000

*الفعالية النوعية: نانومول من الادينوسين المزال منه الأمين/دقيقة/ملغم بروتين.

** معنوي ($p\leq0.05$)

ودرس تأثير عامل الجنس على الفعالية النوعية للأنزيم في مصل ومتحال كريات الدم الحمر للمرضى ، إذ تبين وكما موضح في الجدول (2) ان عامل الجنس لا يؤثر على فعالية الأنزيم معنوياً، فضلا عن تأثير العمر على الفعالية النوعية للأنزيم للفئات العمرية الثلاثة (15-25 و 26-41 و 42-70 سنة) في المصل ومتحال كريات الدم الحمر للمرضى حيث أظهرت النتائج الإحصائية وكما مبين في الجدول (3) ان عامل العمر لا يؤثر على فعالية الأنزيم معنوياً سواء في المصل أو في متحال كريات الدم الحمر.

الجدول 2 :الفعالية النوعية للأنزيم في مصل ومتحال كريات الدم الحمر في المرضى حسب الجن

الجنس	الانحراف القياسي ± المعدل			
	*الفعالية النوعية للأنزيم في المصل	**قيمة P	*الفعالية النوعية للأنزيم في متحال كريات الدم الحمر	**قيمة P
الذكور	34.74 ± 4.99	0.552	92.71 ± 4.86	0.141
الإناث	36.44 ± 6.73		97.13 ± 6.86	

*الفعالية النوعية: نانومول من الادينوسين المزال منه الأمين/دقيقة/ملغم بروتين.

** معنوي ($p \leq 0.05$).

الجدول 3 :الفعالية النوعية للأنزيم في مصل ومتحال كريات الدم الحمر في المرضى حسب العمر

مصدر الأنزيم	*الفعالية النوعية للأنزيم					
	الانحراف القياسي ± المعدل			a**	b**	c**
	25-15	41-26	70-42			
المصل	35.53± 9.77	37.46 ± 2.80	33.97 ± 3.68	0.729	0.774	0.147
متحال كريات الدم الحمر	92.27 ± 4.86	95.06 ± 4.42	95.47 ± 6.86	0.467	0.340	0.905

مقارنة الفئات العمرية c= 1 and 3 b = 2 and 3 a = 1and 2

*الفعالية النوعية: نانومول من الادينوسين المزال منه الأمين/دقيقة/ملغم بروتين.

** معنوي ($p \leq 0.05$).

أشارت النتائج الإحصائية وكما نبين في الجدول (4) إلى عدم وجود فرق معنـوي فـي الفعاليـة النوعية للأنزيم بين مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (ALL) وابيضاض النقـوي المـزمن (CML) سواء في المصل أو في متحال كريات الدم الحمر.

الجدول 4 :مقارنة فعالية الأنزيم النوعية في مصل ومتحال كريات الدم الحمر بين مرضى ALLو CML

مصدر الأنزيم	الانحراف القياسي ± المعدل		**قيمة P
	*الفعالية النوعية للأنزيم في مرضى ALL	*الفعالية النوعية للأنزيم في مرضى CML	
المصل	35.86 ± 6.64	34.60 ± 3.4	0.58
متحال كريات الدم الحمر	94.93 ± 6.55	93.64 ± 5.17	0.634

*الفعالية النوعية: نانومول من الادينوسين المزال منه الأمين/دقيقة/ملغم بروتين.

** معنوي ($p \leq 0.05$).

ودرست المتغيرات الكيموحيوية في مصل المرضى، يبين الجدول (5) حصول ارتفاع في تركيـز البروتين الكلي في مصل المرضى وبفرق معنوي عند مستوى الاحتمالية ($p<0.05$)، وربما يعزى زيـادة البروتين الكلي إلى زيادة الكلوبيولين في بعض الحالات السرطانية وهذا يتفق مع (Nomori et al., 1997 ; Wotton, 1974).

واظهر الجدول (5) انخفاض في تركيز الكالسيوم في مصل المرضى وبفرق معنوي عند مـستوى احتمالية ($p<0.0001$)، ويعود سبب الانخفاض إلى سوء الامتـصاصMalabsorption اوبـسبب تـأثير بعض الأدوية المعالجة أو نتيجة سوء التغذيةMalnutrition (Tietz,1986). في حين لم يظهر وجود فرق معنوي في فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي وتركيز الهيموكلوبين (الجدول 5).

الجدول 5 :تراكيز المتغيرات الكيموحيوية في مصل الأصحاء ومرضى ابيضاض الدم

المتغيرات الكيميوحيوية	الأصحاء	المرضى	قيمة P
	الانحراف القياسي ± المعدل	الانحراف القياسي ± المعدل	
فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي K.A.U./100ml	7.65 ± 2.86	7.71 ± 1.76	0.91
البروتين الكلي g/L	72.40 ± 6.46	79.97 ± 9.27	0.003
الكالسيوم mmol/L	2.05 ± 0.26	1.74 ± 0.222	0.000
الهيموكلوبين g/L	110.73 ± 6.92	105.82 ± 18.48	0.26

العلاقة بين الفعالية النوعية لأنزيم الادينوسين دي امنيز وبعض المتغيرات الكيموحيوية في مصل المرضى

لإيجاد العلاقة بين الفعالية النوعية لأنزيم الأدينوسين دي أمنيز وبعض المتغيرات السريرية المقاسة في مصل المرضى، تم إيجاد معامل الارتباط الخطيCorrelation Coefficient، يبين الجدول (6) وجود علاقة طردية معنوية بين فعالية الأنزيم الأدينوسين دي أمنيز وتركيز البروتين الكلي، وعلاقـة عكـسية معنوية بين فعالية الأنزيم وتركيز الكالسيوم، في حين لا توجد علاقة بين فعالية الأنـزيم وفعاليـة أنـزيم الفوسفاتيز القاعدي وتركيز الهيموكلوبين.

ومن خلال المعلومات التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة يمكن الاستنتاج إلى انـه بالإمكـان اعتبار أنزيم الادينوسين دي امنيز أحد الأنزيمات التشخيصية التي تختلف في فعاليتها في حالات ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد وابيضاض الدم النقوي المزمن مقارنة بقيمها في الحالات الطبيعية ممـا يعنـي انـه بالإمكان استخدام الأنزيم في تشخيص هذه الحالة بالإضافة إلى إمكانية التكهن بمقدار الضرر اللاحق عند الإصابة، فضلاً عن ذلك وجود علاقة طردية معنوية بينت فعالية الأنزيم وتركيز البروتين الكلي وعلاقـة عكسية معنوية بين فعالية الأنزيم وتركيز الكالسيوم عند مرضى ابيضاض الدم.

الجدول 6 :العلاقة بين الفعالية النوعية لأنزيم أدينوسين دي أمينيز والمتغيرات الكيموحيوية في مصل مرضى ابيضاض الدم

المتغيرات الكيميوحيوية	فعالية الأنزيم في مصل المرضى
فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي K.A.U./100ml	-0.05 0.968
البروتين الكلي g/L	0.369* 0.005
الكالسيوم mmol/L	-0.505** 0.0001
الهيموكلوبين g/L	-0.139 0.304

** معنوي (0.01)

*معنوي (0.05)

المصادر العربية

الجلبي، قصي عبد القادر وميكائيل، محمد حسين، 2000. دراسة مقارنة لخواص وفعالية أنزيم الادينوسين دي امنيز في مصل وكريات الدم الحمر للإنسان. مجلة علوم الرافدين، المجلد 11، العدد 3، ص23-32.

اصغري، رياض، محمد خيري حلبي، وليد سنكري، عدنان تكريتي، زياد درويش، سلوى الشيخ، محمد بديع حمودة، شريف السالم وفيصل الصباغ، 1992. أساسيات الطب الباطني (سيسل لوب المختصر) .الجزء الأول، (مترجم)، مطبعة الداؤدي، دمشق.

صالح، سعد غانم والجوادي، ولاء عبد الواحد، 2000. فعالية أنزيم الادينوسين دي امينيز في دم الأطفال المصابين بالبيتا-ثلاسيمياء الكبيرة في محافظة نينوى، مجلة علوم الرافدين، (مقبول للنشر).

علي، موفق خليل حسن، 2004 . قياس بعض المتغيرات الكيموحيوية والفسلجية في الأصحاء والمرضى المصابين بفرط الدرقية ونقصها بالدم في مدينة الموصل. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية

Armitage, P., 1974. Statistical methods in Medical Rescarch",3rd ed.,Blackwell scientific publications,U.K.:116,72 p.

Beulter, E., Bium, K.G., Valentine Kaplan, J.C., Loka, G.W., Ramot, B. and Vallnlinl, W.N., 1977. Inernational committee for standarization in haematology. Recommended methods for Red-Cell. Enzyme Analysis,J.Haematol,35:pp.331-340.

Chottiner, E.G., Cloft, H.J., Tartaglia, A.P. and Mitchel, B.S.,1987. Elevated adenosine deaminase activity and hereditary hemolytic anemia. Evidence for abnormal transliational control of protein syntheisi.J. Clin.Invest.49:1001-1005.

Crandall, G.D., 1983. Biochemistry laboratory, New York, Oxford University press. 29, 83p.

Drabkin, D.L., and Austin, J.H., 1935. Spectrophotometric Studies. H. Preparation from washed blood cells: Nitric Oxide hemoglobin and sulf hemoglobin. J. Biol. Chem.,112: pp.51-65.

Edwards, C.R.W., and Bouchier, I.A.D., 1991. Davidson's Principles and practice of Medicine.18thed., Churchill livingstone, London. 237 p.

Gakis, C., 1996. Adenosine daminase (ADA) isoenzymes ADA 1 and ADA2, diagnostic and biological role.Eur.Respir.J., 9: pp.632-633.

Hean, P.J., 1995. Principles of Hematology. Wm.C.Brown publishers, Boston.

Karbowink, M., Zasada, K., Wyczechowska, D. and Fabianowska-Majewska, K., 2002. Purine metabolism in leukocytes and erythrocytes in graves' or Hashimoto disease.Endocr. Rev., 28(1): pp.207-215.

Kind, P.R., and King, E., 1954. Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolysed phenol with amino antipyrine. J.Clin., Pathol;7: pp.322-326.

Kobayashi, F., Ikeda, T., Marumo, F., and Sato, C., 1993. Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease.Am..J.,88: pp.266-271.

Liso, V., Tursi, A., Specciha, G., Loria, P. and Bonomo, L.,1978. Adenosine daminase activity in Acute lymphoblastic leukemia.Cytochemical,Immunological and Clinical Correlations.Scand J.Haematol.21: pp.167-175.

Nomori, H., Horio, H., Kobagashi, R. and Morinaga, S., 1997. Serum clara cell protein levels in lung cancer patients an assessment of preparative values and postoperative changes. Surg.Tody, 27(2), pp.124-129.

Price, N.C., and Stevens, L., 1989. Fundamentals of enzymology, 2nd.Oxford University press. pp.656-662.

Ratech, H., Martiniuk, F., Borer, W.Z. and Rappaport, H., 1988. Differential expression of adenosine deaminase isoenzymes in acute leukemia.Blood,72: pp.1627-1632.

Rotandaro, L., 1981. Multiple forms of adenosine deaminase in the thymus of the bovibe fetus and calf.Boll.Soc.Ital.Biol.Sper,57: pp.2355-2360.

Tietz, N.W., 1986. Textbook of Clinical Chemistry. W.B.Saunders company, USA.

Ungerer, J.P.J., Oosthuizen, H.M., Bissbort, S.H. and Vermaak, W.J.H., 1992. Senim adenosine deaminase. Isoenzymes and diagnostic application.Clin.Chem.38: pp.1322-1326.

William, W.J., Beuler, E., Erslev, A. and Lichtman, M.A., 1991. Hematology, International Edition.4th ed.McGraw-Hill publishing Company, New York. pp.312-315.

Wotton, I.D.P., 1974. Micro-Analysis in Medical Biochemistry, 5th Ed., Churchill. Livingstone, pp.206-207.

Yasuda, J., Tanabe, T., Hashimoto, A. and Too, K., 1996. Adenosine deaminase (ADA) activity in tissues and sera from normal and leukemia catte.br.Vet.J.,152:pp.485-488.