------مجلة علوم الرافدين، المجلد 23، العدد 2، ص111-127،2012------

دراسة كيموحياتية لإنزيم الكايتينيز وعلاقته بالثلاسيميا

براء رعد محمود **ذكرى علي علوش**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 29/ 6 / 2011 ؛ تاريخ القبول 21 / 11 / 2011)

الملخص

تضمن البحث دراسة سريرية لإنزيم الكايتينيز وعلاقته بمرض الثلاسيميا، اذ وجد ان المعدل الطبيعي لفعالية إنزيم الكايتينيز في مصل دم مجموعة السيطرة (1.79 ± 0.10 U/ml) ووجد انخفاض معنوي في فعالية الإنزيم لدى مجموعة المرضى عند مقارنته مع مجموعة السيطرة. كما وجد أن فعالية الإنزيم لا تتأثر بالجنس في حين تزداد مع تقدم العمر لدى مجموعتي السيطرة والمرضى، وبينت النتائج عدم تأثر فعالية الإنزيم بنوع المرض (ألفا او بيتا _ ثلاسيميا) وشدة مرض البيتا _ ثلاسيميا (الكبيرة والمتوسطة) واستئصال الطحال. كما وجد ارتفاع معنوي في مستوى كل من إنزيمي الكلوتاميت بايروفيت ترانس امينيز (GPT) و الكلوتاميت اوكزالواسيتيت ترانس امينيز (GOT) والحديد (Fe) والسعة الكلية لارتباط الحديد (TIBC) بينما وجد انخفاض معنوي في مستوى الهيموكلوبين لدى مرضى الثلاسيميا مقارنة بمجموعة السيطرة. ومن خلال ايجاد معامل الارتباط الخطي، تبين ارتباط إنزيم الكايتينيز بعلاقة عكسية معنوية مع الحديد و بعلاقة طردية معنوية مع إنزيم(GPT) لدى مجموعة السيطرة و بعلاقة طردية معنوية مع الهيموكلوبين لدى مجموعة المرضى.

أظهرت طريقة عزل إنزيم الكايتينيز من الجسيمات الحالة لبلازما الدم حزمتين بروتينيتين ووجد أعلى فعالية لدى (الحزمة B) مقارنة بطريقة عزل الإنزيم من محلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (75%) لبلازما الدم اذ وجدت ثلاث حزم بروتينية وكانت أعلى فعالية لدى (الحزمة E) بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل الحاوي على (Sephadex G-75). كما وجد أن الحزمتين البروتينيتين (B وE) لهما وزن جزيئي(1000 ± 39180 دالتون) و(1000 ± 36307 دالتون) على التوالي ووجد أن عدد مرات التنقية لإنزيم من الجسيمات الحالة لبلازما الدم اكبر من محلول راسب كبريتات الامونيوم. ودرست الظروف المثلى لعمل إنزيم الكايتينيز للحزمتين المعزولتين فوجد ان لهما زمن تفاعل امثل عند الدقيقة (35) و (30) والأس الهيدروجيني الأمثل عند (pH= 7) ودرجة حرارة مثلى (60C°) و (55C°) والتركيز الامثل

لمادة الأساس الكايتين الغروي (12 mg/ml) و (10mg/ml) وقيمة السرعة القصوى V_{max}(2.08U/ml) و (2.00U/ml) وقيمة ثابت ميكيلس– منتن K_m (2.12mg/ml) و (2.00mg/ml) على التوالي وتم تقدير الفعالية البايولوجية لإنزيم الكايتينيز المعزول من بلازما الدم (الحزمتين B و E) تجاه نمو بعض البكتريا والفطريات الممرضة ووجد أن لإنزيم القابلية على تثبيط نموها بنسبة (100%) للحزمة (B) و(50 %) للحزمة (E).

الكلمات الدالة: إنزيم الكايتينيز، مرض الثلاسيميا، المتغيرات السريرية.

Biochemical Study of Chitinase and its Relation with Thalassemia

Baraa R. Mahmood **Thikra A. Allwsh**
Department of Chemistry
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The present research is a clinical study of chitinase and its relation with thalassemia. It had been found that the normal range of chitinase activity in serum of healthy control (1.79 ± 0.10 U/ml), and it had been found that significant decrease of chitinase activity for patients group when compared with controls group. It was also found that the activity was not affected by sex whereas an increase was found with aging in both patients and control groups. The result demonstrated that the chitinase activity was not affected by the type of thalassemia (α or β - thalassemia), distress of β- thalassemia (major and intermediate) and splenctomy. The results show a significant increase in (GPT), (GOT), (Fe) and (TIBC) while also showed a significant decrease in hemoglobin level of thalassemia patients compared with control. Correlation coefficient between chitinase activity and clinical variables of thalassemia patients studied showed a significal reversible relation between chitinase and (Fe) and irreversible relation between chitinase and(GPT) in control. It also show a reversible relation between chitinase and hemoglobin in patients.

The isolation method of chitinase from lysosome of plasma (protein peak B) showed two protein peaks by gel filtration technique, using column containing sephadex G-75. The activity of a chitinase showed in(protein peak B).while the isolation method of chitinase from ammonium sulphate solution (75%) saturation of plasma showed three protein peaks by gel filtration technique, using same column. The activity of a chitinase showed in (protein peak E), a high number of purification showed in (protein peak B) compared with (protein peak E), it was found that the two peaks (B and E) had apparent molecular weight (39180 ± 1000 dalton) and (36307 ± 1000 dalton) respectively. The study of the optimum condition of chitinase activity in the two peaks show an optimum reaction time at (35), (30) minute, optimum pH at (7), optimum temperature at (60°C), (55°C), optimum concentration

of substrate colloidal chitin (12 mg/ml), (10 mg/ml), V_{max} (2.08 U/ml), (2.00 Uml) and K_m (2.12 mg/ml) and (2.00 mg/ml) respectively.

Finally the biological activity had been improved for the isolated chitinase from plasma (for B and E peak) upon the growths of some bacteria and fungi pathogen, it had been found that the enzyme had the ability to inhibit its growth at ratio (100%) for peak (B) and (50%) for peak (E).

Keywords: chitinase, thalassemia , clinical variables.

المقدمة

يعد إنزيم الكايتينيز من الإنزيمات المحللة **(** EC 3.2.1.14 **)** والاسم العلمي لإنزيم هو [Poly-β- 1,4- (2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolase]] (Nitsawang and Kanasawud, 2006)، وقد أطلق عليه اسم الكايتينيز نسبة إلى عمله في تحليل بوليمر الكايتين (Poly -N- acetyl -D- glucosamine)، إذ يعمل على كسر الآصرة الكلايكوسيدية بيتا 4,1 بين ذرة الكاربون ذات الرقم واحد (C_1) وذرة الكاربون ذات الرقم أربعة (C_4) لكل وحدتين متعاقبتين من N- اسيتايل كلوكوز امين (GlcNAc) في الكايتين (Xia *et al*.,2001).

إنزيم الكايتينيز من الإنزيمات الواسعة الانتشار في الطبيعة، إذ يوجد ضمن مدى واسع من الكائنات الحية. ففي الثدييات لوحظ وجوده في السوائل المختلفة لجسم، إذ يوجد في بلازما الدم ومصل الدم وخلايا الدم البيضاء (Escott and Adams, 1995) والعصارة المعدية للإنسان (Paoletti *et al*., 2007)، كما ويوجد الإنزيم في القناة الهضمية للثدييات والطيور، وكذلك تم استخلاصه من البنكرياس والغشاء المخاطي المعوي للبرمائيات والزواحف و الأسماك التي تتغذى على الحشرات ((Matsumiya *et al*., 2006)، أما في النباتات فلوحظ وجوده في البذور و الأنسجة النامية للنباتات (Moore *et al*., 2004)، وينتج الإنزيم أيضا بواسطة البكتريا والعفن والفطريات (Xia *et al*., 2001). تختلف الوظيفة الفسيولوجية للكايتينيز باختلاف الكائنات الحية، اذ يؤدي الإنزيم دورا مهما في التغذية والتكون التشكيلي والحماية والهجوم (Jolivet , 2005). ولوحظ ارتفاع فعالية الإنزيم عند الإصابة ببعض الأمراض مثل اضطرابات خزن الدهون واللاشمانيا ومرض كوشر والملاريا (Malaguarnera, 2006)، وقد بين (Barone *et al*., 2001) ان هنالك علاقة بين فعالية الإنزيم ومرض الثلاسيميا وان هذه العلاقة تعتمد على نوع المرض وطبيعة البيئة التي ينشأ فيها المريض.

الهدف من البحث: نظراً لعدم وجود دراسة سابقة عن إنزيم الكايتينيز في العراق فقد ركز هدف البحث على جزئين: الأول هو دراسة ألأهمية السريرية لإنزيم الكايتينيز لدى مرضى الثلاسيميا والثاني محاولة تنقية الإنزيم من دم الإنسان ودراسة خواصه الحركية.

المواد وطرائق العمل

النماذج:

جمع (66) أنموذج دم لأشخاص أصحاء ظاهرياً، تضمنت (32) أنموذجاً للذكور و (34) أنموذجاً للإناث تراوحت أعمارهم بين (1-55 year)، كما جمع (87) أنموذج دم لأشخاص مصابين بمرض الثلاسيميا، وقد شخصت حالة المرضى من قبل أطباء مختصين بالتعاون مع مستشفى الأثير التعليمي _ وحدة الثلاسيميا في الموصل، وتضم (42) أنموذجاً للذكور و(45) أنموذجاً للإناث تراوحت أعمارهم بين (2-43 year)، ودونت المعلومات الخاصة بالمرضى على استمارة استبيان خاصة لكل مريض أعدت لهذا الغرض.

تحضير عينات الدم: جمعت عينات الدم بوضعها في أنابيب تحتوي على مانع تخثر (EDTA).

مصل الدم: حضر حسب ما ذكر الباحثون (Bacchus *et al*., 1980).

بلازما الدم: تم الحصول على بلازما الدم من متبرع ذكر سليم بعمر (31) سنة وبمساعدة مركز نقل الدم بالموصل وقدرت كمية البروتين بطريقة لاوري (Lowry *et al*., 1951) والمحورة من قبل (Schacterle and Pollack, 1973) كما قدرت فعالية الإنزيم فيه بطريقة (Wang *et al*., 2006).

المتغيرات السريرية المدروسة:

تقدير الهيموكلوبين في الدم: باستخدام طريقة الباحثين (Drabkin and Austin , 1935)

تقدير فعالية إنزيم الكلوتاميت بايروفيت ترانس اميناز (GPT) وانزيم الكلوتاميت اوكزالواسيتيت ترانس اميناز (GOT) في مصل الدم: استخدمت طريقة الباحثين (Reitman and Frankel , 1957) باستخدام عدة التحليل الجاهزة (Kit) من شركة (Bio Merieux) الفرنسية.

تقدير الحديد (Fe) والسعة الكلية لارتباط الحديد (TIBC) في مصل الدم: تم استخدام طريقة الباحث (Williams *et al*., 1977).

عزل الإنزيم من الجسيمات الحالة: استخدمت طريقة (Lundbland *et al*., 1974) لتنقية إنزيم الكايتينيز باستخدام البنتونيت الذي يعمل على امتزاز الجسيمات الحالة (Dahiya *et al*., 2005) تم اخذ (42ml) من بلازما الدم وأضيف إليها (0.1 g) من البنتونيت.

ترسيب البروتين وفصله باستخدام كبريتات الأمونيوم: استخدم (42ml) من بلازما الدم، وأضيف إليه كبريتات الأمونيوم بحالتها الصلبة وبتشبع (75%) وحسب ما ذكر في (Robyt and White, 1987)

ثم قدرت فعالية الإنزيم وكمية البروتين في المحلول البروتيني الناتج ثم أجريت له عملية الفرز الغشائي اعتمادا على طريقة الباحث (Plummer, 1978) في محلول بيكاربونات الأمونيوم (0.1M) وبعد الانتهاء من عملية الفرز تم حساب الحجم النهائي للمحلول الناتج وقدرت فعالية الإنزيم وكمية البروتين في المحلول الناتج من الفرز الغشائي.

تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي: استخدمت هذه التقنية لعزل إنزيم الكايتينيز وتقدير وزنه الجزيئي التقريبي(Andrews, 1965)، إذ أستخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (100×1.6cm) الذي يحتوي على مادة الهلام من نوع (Sephadex G-75) وتم استرداد المواد البروتينية بمعدل جريان (40ml/hours) بمعدل (3.0 min) لكل جزء، وتمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قراءة شدة الامتصاص عند الطول الموجي(280nm) باستخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، فضلاً عن ذلك تمت متابعة فعالية إنزيم الكايتينيز في الأجزاء المفصولة، بعد ذلك جمعت الأجزاء البروتينية التي تمثل الحزمة الحاوية على فعالية إنزيم الكايتينيز، ثم جففت الحزم البروتينية باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) لغرض الحصول على هذه الحزم بشكل مركز.

العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم الكايتينيز المنقى جزئياً من بلازما الدم: تمت دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية الإنزيم لتحديد الظروف المثلى لعمل الإنزيم وتتضمن: تركيز الإنزيم وتركيز مادة الأساس وزمن التفاعل والأس الهيدروجيني ودرجة حرارة التفاعل.

تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز في مصل الدم: قدرت الفعالية حسب طريقة (Wang *et al.*, 2006) اذ يعمل الإنزيم على تحليل مادة الكايتين الى N– أسيتايل كلوكوز أمين والتي تكون معقدا ملونا بعد تفاعلها مع كاشف 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)-5,3- ثنائي نايترو حامض السليسليك، والذي تقاس له الامتصاصية عند طول موجي قدره (540nm)، وقدرت الفعالية على انها عدد وحدات الإنزيم في مللتر من مصل الدم.

تقدير الفعالية البايولوجية لإنزيم الكايتينيز المعزول: تم تقدير الفعالية البايولوجية لإنزيم الكايتينيز المعزول من الجسيمات الحالة ومن محلول راسب كبريتات الأمونيوم باستخدام طريقة (Wang *et al.*, 2006) المحورة الى نسبة (1)إنزيم: (3) وسط غذائي، حيث استخدمت كائنات مجهرية فطرية وبكتيرية تم الحصول عليها من كلية العلوم / قسم علوم الحياة، مع إضافة المضاد الحيوي Streptomycin (0.1 g/L) إلى الأطباق المجهزة لاختبار الفعالية البايولوجية (بالنسبة للفطر فقط)، مع تجهيز أطباق مقارنة بنفس النسبة السابقة ولكن يستعاض عن كمية الإنزيم بكمية مماثلة من الماء المقطر المعقم.

التحليل الإحـصائي: تم تحليل النتائج إحصائيا، إذ استخدم اختبار (Anova) و (T-test) و (Z- test)، وتـم إيجاد معامل الارتباط الخطي (Correlation coefficient"r") لإيجاد العلاقـة بـين الإنـزيم والمتغيـرات السريرية لمجموعتي السيطرة والمرضى.

النتائج والمناقشة

الجزء الأول: فعالية إنزيم الكايتينيز في مصل دم مجموعة السيطرة والمعدل الطبيعي له:

وجد أن المعدل الطبيعي لفعالية الإنزيم في مصل دم مجموعة الـسيطرة (1.79 ± 0.10 U/ml) وكمـا مبين في جدول (1) وهو أعلى من المعدل الذي حدده (Barone *et al.*, 1998) في بلازما الدم، وقد يعـزى

ذلك الى اختلاف طريقة قياس فعالية الإنزيم، بالإضافة إلى اختلاف البيئة والتغذية بين الأفـراد والـشعوب (Barone *et al.*, 2001)، كما وجود ارتفاع معنوي عند مستوى الاحتمالية (P< 0.05) في فعاليـة الإنـزيم للفئة العمرية الثالثة مقارنة بالفئة العمرية الاولى والفئة العمرية الثانية، وكذلك وجود ارتفاع معنـوي عنـد مستوى الاحتمالية (P< 0.05) للفئة العمرية الثانية مقارنة بالفئة العمرية الأولى مما يدل على تـأثر فعاليـة إنزيم الكايتينيز في مصل دم مجموعة السيطرة بالعمر وهذا يتفق مع ما ذكره (Artieda *et al* ., 2003) بأن فعالية إنزيم الكايتينيز تزداد مع تقدم العمر. بينما لم يوجد فرق معنوي في فعالية الإنـزيم بـين الـذكور و الإناث كما مبين في جدول (1) .

الجدول 1: فعالية إنزيم الكايتينيز في مجموعة السيطرة والمرضى.

Parameters		Control group	Patient group
Chitinase activity U/ml Mean ± S.E	**Sex**		
	Female	1.68 ± 0.11	1.23 ± 0.10**
	Male	1.90 ± 0.17	1.35 ± 0.11**
	Age		
	First age stage (≤ 8 year)	1.46 ± 0.09 *	1.09 ± 0.10 *
	Second age stage (9-13 year)	1.74 ± 0.10 *	1.17 ± 0.09 *
	Third age stage (≥ 14 year)	2.17 ± 0.12 *	1.61 ± 0.15 *
	Total mean	1.79 ± 0.10	1.29 ± 0.11**

* Significant at (P< 0.05) . ** Significant at (P<0.001)

الوحدة الانزيمية (U) : كمية الانزيم التي تعمل على تحويل مايكرومول واحد من مادة الاساس الى المادة الناتجة (N-اسيتايل كلوكوز امين) في الدقيقة الواحدة .

فعالية إنزيم الكايتينيز في مصل دم مجموعة المرضى: تم تقدير فعالية إنزيم الكـايتينيز فـي مـصل دم أشخاص مصابين بمرض الثلاسيميا، ووجد أن معدل فعالية إنزيم الكايتينيز في مصل دم مجموعة المرضى (1.29 ± 0.11 U/ml) كما مبين في جدول (1)، وبينت النتائج وجود ارتفاع تدريجي فـي فعاليـة الإنزيم مع تقدم العمر، اذ وجد ارتفاع معنوي عند مستوى الاحتمالية (P< 0.05) للفئة العمرية الثالثة مقارنة مع الفئة العمرية الاولى والثانية وهذا يتفق مع ما وجده (Arteida *et al.*, 2003)، كما لوحظ عدم وجود فرق معنوي في فعالية الإنزيم بين الذكور والإناث. وعند مقارنة فعالية الإنزيم في مصل دم مجموعة المرضـى

بفعاليته في مصل دم مجموعة السيطرة تبين وجود أنخفاض معنوي عند مستوى الاحتمالية ($p<0.001$) في فعالية الإنزيم لدى مجموعة المرضى حسب المعدل الكلي والعمر والجنس. كما مبين في جدول (1).

تأثير عدد من العوامل على فعالية إنزيم الكايتينيز في مجموعة المرضى: بينت النتائج الموضحة في الجدول (2) عدم تأثر فعالية الإنزيم بنوع المرض (الفا او بيتا – ثلاسيميا) وشدة مرض البيتا – ثلاسيميا (البيتا – ثلاسيميا الكبيرة والبيتا – ثلاسيميا المتوسطة) واستئصال الطحال.

الجدول 2: العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم الكايتينيز في مجموعة المرضى.

Chitinase activity U/ml Mean ± S.E	Type of thalassemia
1.41 ± 0.17	Alpha- thalassemia
1.17± 0.07	Beta- thalassemia
1.24 ± 0.07	major β- thalassemia
1.11 ± 0.08	intermediate β- thalassemia
1.37 ± 0.15	splenctomy
1.21 ± 0.07	non splenctomy

المتغيرات السريرية لدى مجموعة المرضى مقارنة بالسيطرة: تم في هذه الدراسة قياس عدد من المتغيرات الحيوية التي تتأثر بمرض الثلاسيميا ومقارنتها مع مجموعة السيطرة وكما موضح في الجدول (3)**.** إذ وجد هناك انخفاض معنوي عند مستوى الاحتمالية ($P< 0.001$) في مستوى الهيموكلوبين لدى المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة وهذا يتفق مع ما بينه (Hughes–Jones *et al.*, 2004) من أنخفاض مستوى الهيموكلوبين لدى مرضى الثلاسيميا، وقد يعزى السبب في ذلك الى الانحلال السريع لكريات الدم الحمراء، وبالتالي نقصان كمية الهيموكلوبين المجهزة للجسم**.** كما وجد ارتفاع معنوي عند مستوى الاحتمالية ($P< 0.001$) في فعالية أنزيم (GPT) و(GOT) لدى مرضى الثلاسيميا وهذا يتفق مع ما وجده (Virgillis *et al.*, 1981)، و قد يعزى ذلك الى تضرر خلايا الكبد نتيجة لترسب الحديد فيها والذي يزداد نتيجة لعمليات نقل الدم المتكررة. وجد ارتفاع معنوي عند مستوى الاحتمالية ($P< 0.001$) في مستوى الحديد و(TIBC) لدى مرضى الثلاسيميا مقارنة بمستواه لدى مجموعة السيطرة وهذا يتفق مع ما وجده (Hughes – Jones *et al.*, 2004)، وقد يعود سبب ذلك الى الانحلال السريع لكريات الدم الحمراء، وكذلك الحاجة المستمرة والمتزايدة لإجراء عمليات نقل الدم لمرضى الثلاسيميا.

الجدول 3 : المتغيرات السريرية المقاسة لدى مجموعتي السيطرة والمرضى.

Patient group mean ± S.E	Control group mean ± S.E	Parameters
8.6±0.19 * g/100ml	11.51± 0.12 g/100ml	Hb
70.43 ± 4.43* U/ml	28.96±1.33 U/ml	GPT
90.84 ± 3.64* U/ml	46.25 ± 1.99 U/ml	GOT
215.04 ± 8.09* µg/ 100ml	112.39 ±4.13µg/100ml	Fe
322.54 ± 12.84* µg / 100ml	268.17 ± 6.54µg/100ml	TIBC

* significant at (P< 0.001)

العلاقة بين فعالية إنزيم الكايتينيز وعدد من المتغيرات السريرية لدى مجموعتي المرضى والسيطرة:

لإيجاد العلاقة بين فعالية الإنزيم وعدد من المتغيرات لدى مجموعة المرضى ومجموعة السيطرة تم إيجاد معامل الارتباط الخطي (Correlation coefficient "r") وكما موضح في الجدول (4).

وجدت علاقة عكسية معنوية عند مستوى الاحتمالية (P<0.01) بين مستوى الحديد في مصل دم مجموعة السيطرة وفعالية الإنزيم، وقد يعزى سبب ذلك الى أن ارتفاع مستوى الحديد في مصل الدم قد يؤدي الى انخفاض فعالية إنزيم الكايتينيز لاحتمالية تأثيره على الخلايا الملتهمة وبالتالي تقليل انتاجها لإنزيم الكايتينيز، وهذا يتفق مع ما ذكره (Artieda *et al*., 2003). كما يظهر وجود علاقة طردية معنوية عند مستوى الاحتمالية (P<0.05) بين فعالية إنزيم (GPT) وفعالية إنزيم الكايتينيز في مجموعة السيطرة وقد يعزى سبب ذلك إلى احتمالية مساهمة إنزيم الكايتينيز في عملية إعادة بناء الأنسجة المتضررة ومنها الكبد (Artieda *et al.* , 2003). ووجود علاقة طردية معنوية عند مستوى الاحتمالية (P<0.05) بين مستوى الهيموكلوبين وفعالية الإنزيم في مجموعة المرضى، وقد يعزى ذلك إلى ما بينته النتائج من وجود انخفاض في فعالية الإنزيم ومستوى الهيموكلوبين لدى مجموعة المرضى المصابين بالثلاسيميا.

الجدول 4: معامل الارتباط الخطي بين فعالية إنزيم الكايتينيز وبعض المتغيرات السريرية في مصل دم مجموعتي السيطرة والمرضى.

Patient group correlation person	Control group correlation person	Parameters
1.000	1.000	Chitinase
0. 191*	0 . 069	Hb
-0.039	0. 963	GPT
0.112	- 0. 105	GOT
0.181	0. 322**	Fe
-0.034	- 0. 181	TIBC

* significant at (P< 0.05) ** significant at (P< 0.01)

الجزء الثاني: عزل وتنقية إنزيم الكايتينيز من بلازما الدم: وجدت حزمتان بروتينيتان (B وA)، عند عزل الإنزيم من الجسيمات الحالة لبلازما الدم باستخدام البنتونيت بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل الحاوي على (Sephadex G-75) وكما مبين في الشكل (1) وتبين أن الحزمة البروتينية (B) تمتلك فعالية لإنزيم، وعليه عدت الحزمة البروتينية الرئيسية والممثلة لإنزيم في الدراسات اللاحقة. وخلاصة نتائج مراحل تنقية الإنزيم من محلول الجسيمات الحالة لبلازما الدم مدرجة في الجدول(5).

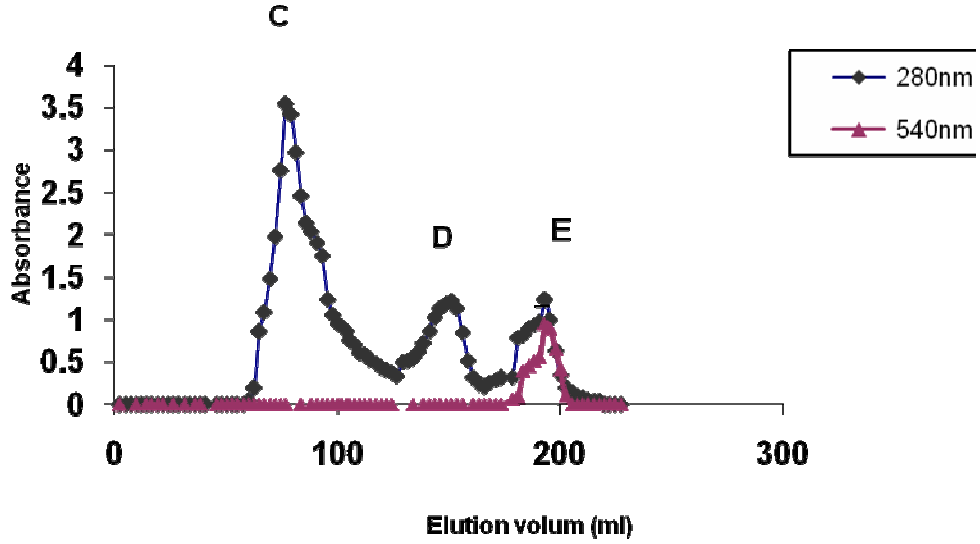
الشكل 1 : المظهر الجانبي لروغان إنزيم الكايتينيز المنقى جزئيا من الجسيمات الحالة لبلازما الدم بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (1.6 cm× 100) والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95cm)، حيث ان (A و B) الحزم البروتينية.

الجدول 5 : خلاصة نتائج مراحل تنقية إنزيم الكايتينيز من محلول الجسيمات الحالة لبلازما الدم.

مراحل التنقية		البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية U	الفعالية النوعية U/mg	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
بلازما الدم		3234	151.1	0.05	100	1.00
عزل الجسيمات الحالة		118	28.0	0.23	18.5	4. 6
الترشيح الهلامي	الحزمة الثانية (B)	5.00	13.0	2.61	8.6	52.00

الوحدة الانزيمية (U) : كمية الانزيم التي تعمل على تحويل مايكرومول واحد من مادة الاساس الى المادة الناتجة (N-اسيتايل كلوكوز امين) في الدقيقة الواحدة .

في حين وجدت ثلاث حزم بروتينية لمحلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (75%) لبلازما الدم بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام نفس عمود الفصل، كما في الشكل (2). ومن خلال متابعة فعالية الإنزيم وجد أن الحزمة البروتينية (E) تمتلك فعالية إنزيم الكايتينيز وعليه عدت الحزمة الفعالة الرئيسية والممثلة لإنزيم في الدراسات اللاحقة. وخلاصة نتائج مراحل تنقية إنزيم الكايتينيز من محلول راسب كبريتات الامونيوم لبلازما الدم مدرجة في الجدول (6).



الشكل 2: المظهر الجانبي لروغان إنزيم الكايتينيز المنقى جزئيا من محلول راسب كبريتات الامونيوم (بتشبع 75%) لبلازما الدم بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (1.6 cm × 100) والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95 cm)، حيث ان (C و D و E) الحزم البروتينية.

الجدول 6: خلاصة نتائج مراحل تنقية إنزيم الكايتينيز من محلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (75%) لبلازما الدم.

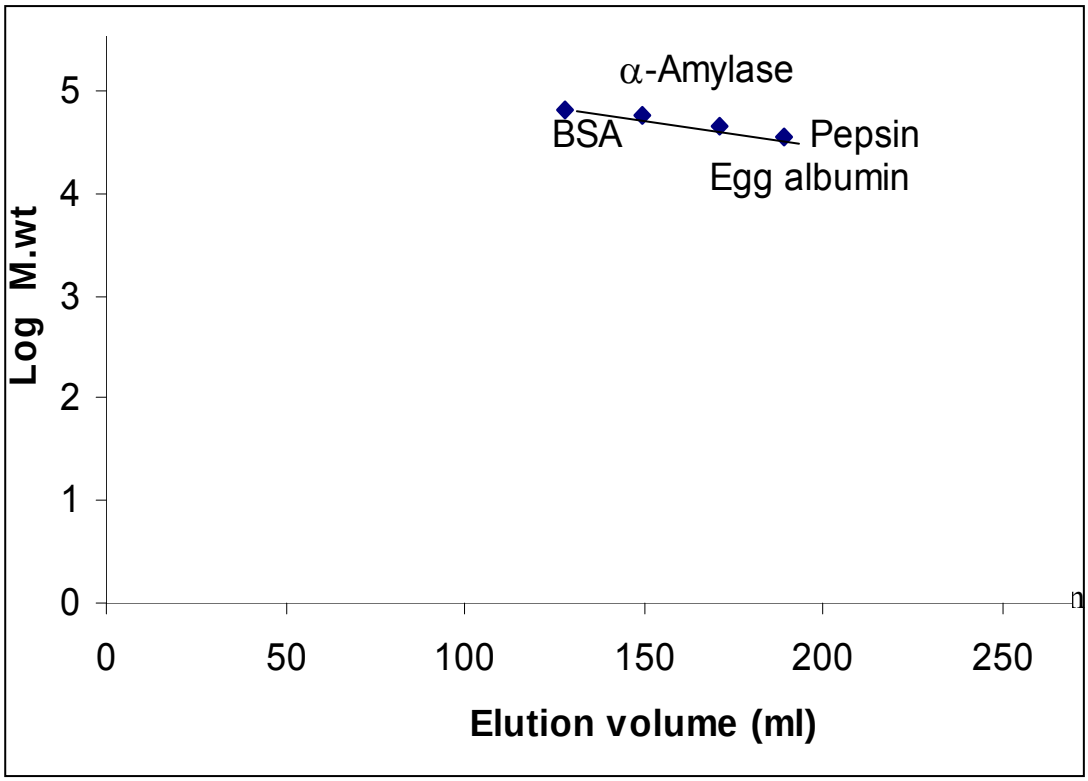
مراحل التنقية		البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية U	الفعالية النوعية U/mg	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
بلازما الدم		3234.0	151.1	0.05	100	1.00
الترسيب بكبريتات الامونيوم بتشبع (75%)		620.20	60.0	0.096	39.70	1.92
الفرز الغشائي		580.00	58.30	0.10	38.50	2.01
الترشيح الهلامي	الحزمة الثالثة (E)	25.70	42.20	1.64	27.90	32.80

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم الكايتينيز بتقنية الترشيح الهلامي: تم إمرار عـدد مـن المركبـات المعلومة الوزن الجزيئي التي تتراوح أوزانها بين (204-2000000) دالتون لغرض تعيين خواص العمـود وكما موضح في الجدول (7) وعند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئـي، تبـين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم وكما مبين في الشكل (3).

الجدول 7: العلاقة بين الوزن الجزيئي وحجم روغان المواد المستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي.

المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (ml)
الدكستران الازرق Blue dextran	2000000	56.9
البومين مصل البقر BSA	67000	128
انزيم الفا – اميليز α-Amylase	58000	150
البومين البيض Egg albumin	45000	171
انزيم الببسين Pepsin	36000	189
التربتوفان Tryptophan	204	222.2
الحزمة البروتينية (**B**)	39810	187.8
الحزمة البروتينية (**E**)	36307	193.1

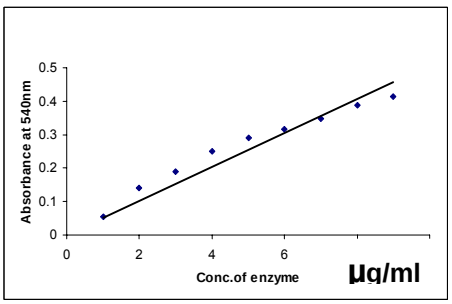
إذ وجد أن الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم الكايتينيز (الحزمة B) (1000 ± 39810 دالتون) و (الحزمة E) (1000 ± 36307 دالتون) وهذا يتفق مع ما وجده (Renkema *et al.* , 1995 ; Renkema *et al.*, 1997) بأن الوزن الجزيئي لإنزيم الكايتينيز المعزول من طحال مرضى كوشر أنسجة جسم الانسان هو (39000 دالتون).

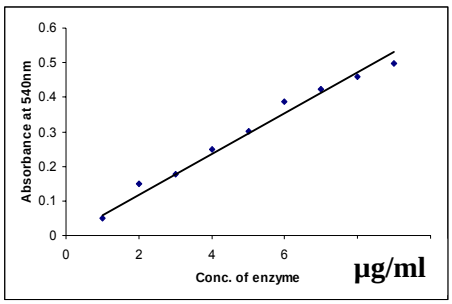


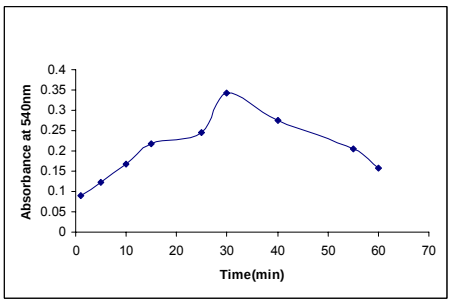
الشكل 3: المنحنى القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي

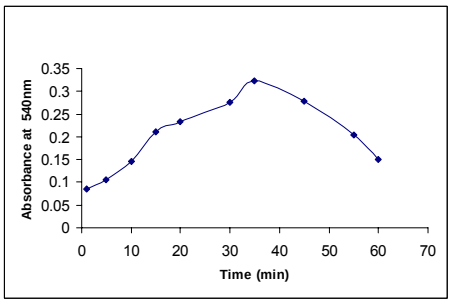
دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم الكايتينيز: ان الظروف المثلى التي تم التوصل اليها من خلال هذه الدراسة لقياس فعالية إنزيم الكايتينيز المنقى جزئيا من الجسيمات الحالة (الحزمة B) ومن محلول راسب كبريتات الامونيوم (الحزمة E) موضحة في الشكل (4) و الجدول (8) .

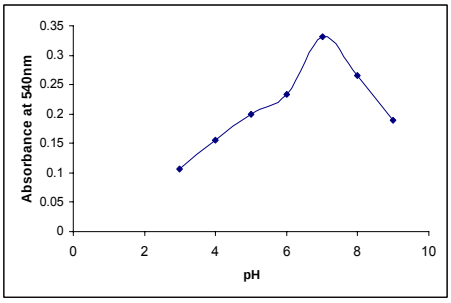
(الحزمة E) **(الحزمة B)**

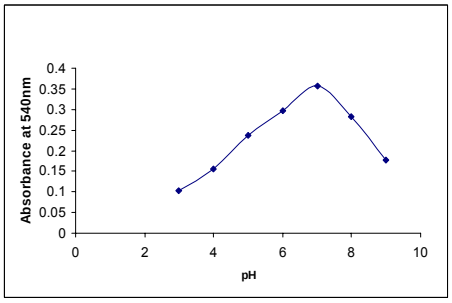


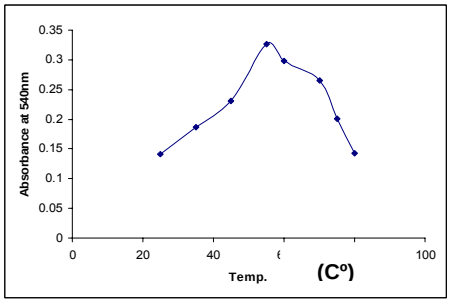


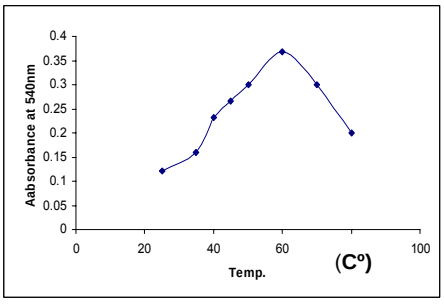


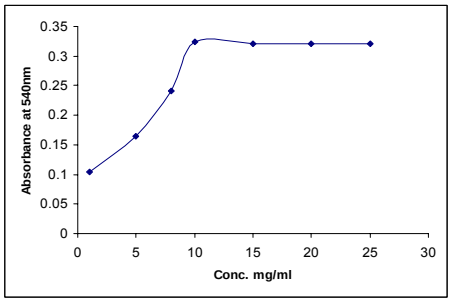


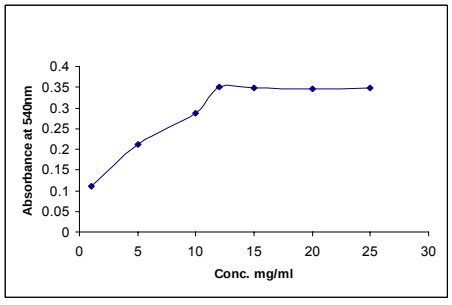












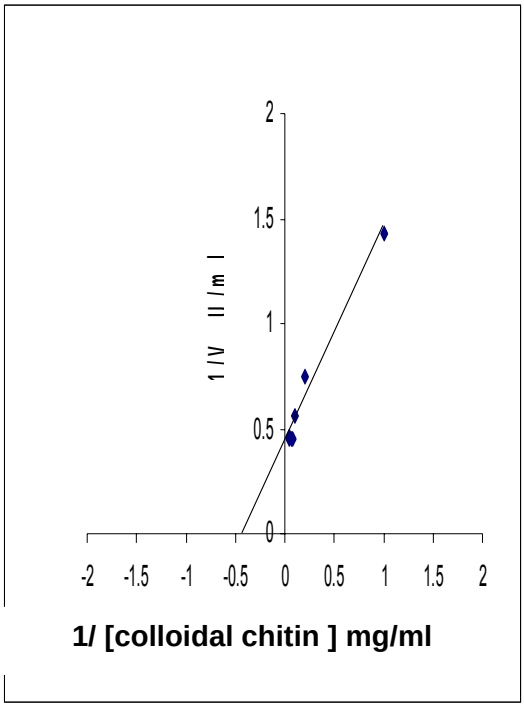
الشكل 4: الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم الكايتينيز المنقى جزئيا (الحزمتينB و E).

الجدول 8: الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم الكايتينيز المنقى جزئيا من الجسيمات الحالة (الحزمة B) ومن محلول راسب كبريتات الامونيوم (الحزمة E).

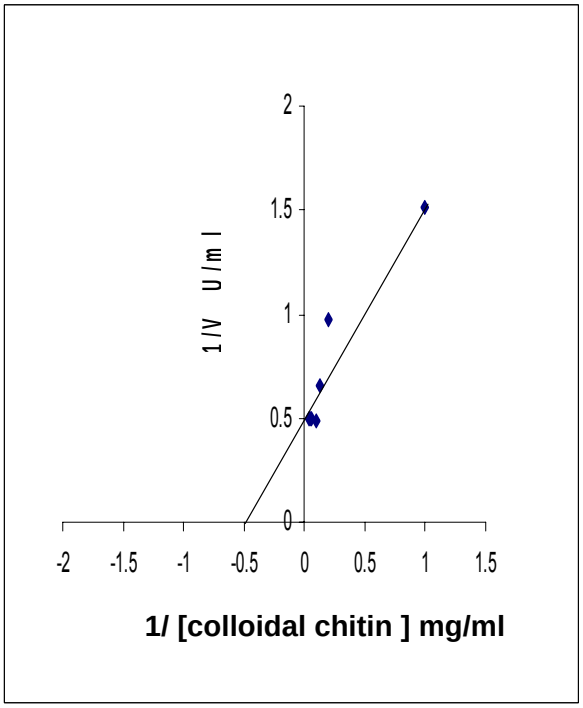
إنزيم الكايتينيز	تركيز الإنزيم µg/ml	زمن التفاعل min	pH المحلول المنظم	درجة الحرارة C°	تركيز المادة الاساس mg/ml
الحزمة B	8	35	7	60	12
الحزمة E	8	30	7	55	10

وباستخدام رسم لاينويفر – برك (Lineweaver – Burk plot) كما موضح في الشكل (5) وجد ان قيمة السرعة القصوى (V_{max}) لإنزيم الكايتينيز المنقى جزئيا من الجسيمات الحالة (الحزمة B) تساوي (2.08 U/ml) وقيمة ثابت ميكيلس – منتن (K_m) تساوي (2.12mg/ml)، وقيمة (V_{max}) ل لإنزيم المنقى جزئيا من محلول راسب كبريتات الامونيوم (الحزمة E) تساوي (2.00 U/ml) وقيمة (K_m) يساوي (2.00 mg/ml)، وهذا يتفق مع ما وجده (Dahiya *et al.*, 2005).

(الحزمة B)

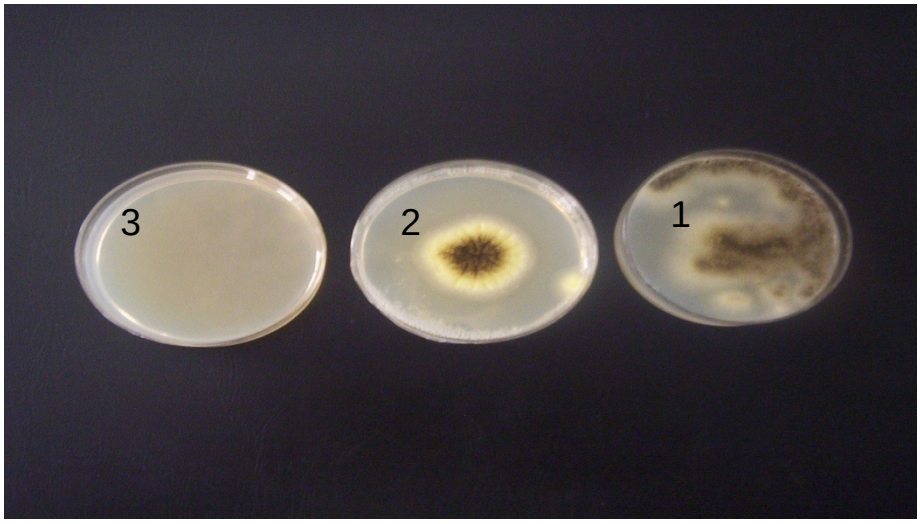


(الحزمة E)

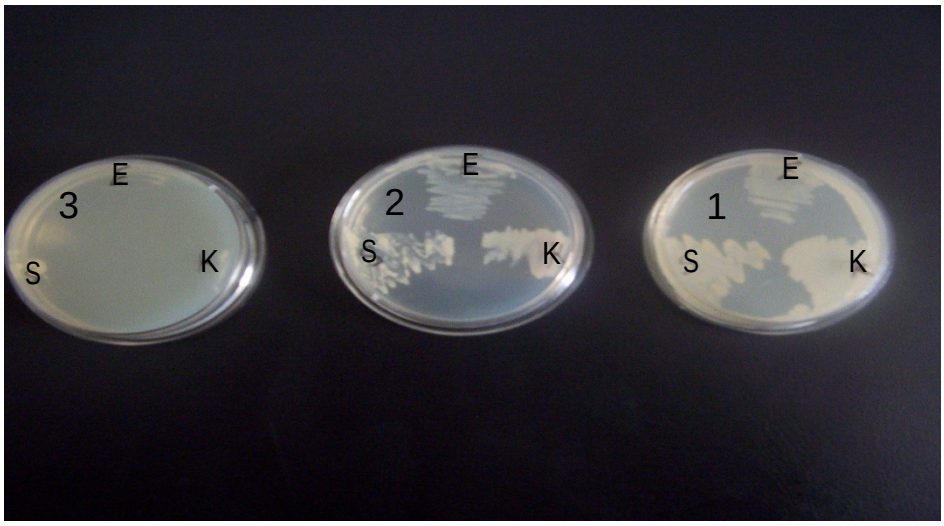


الشكل 5: رسم لاينويفر – برك لتوضيح قيمة ثابت ميكيلس – منتن والسرعة القصوى لانزيم الكايتينيز المنقى جزئيا (الحزمتينB و E).

الفعالية البايولوجية لإنزيم الكايتينيز المعزول: يتضح من خلال المقارنة بين نمو الأحياء المجهرية في الوسط الغذائي الحاوي على إنزيم الكايتينيز المعزول (الحزمتين B و E) ونموها في الوسط الغذائي الخالي من إنزيم الكايتينيز، ان للحزمة البروتينية (المركب ألبروتيني B) القابلية على تثبيط نمو كلٍ من الفطر والبكتريا بنسبة (100%)، في حين أن للحزمة البروتينية (المركب ألبروتيني E) القابلية على تثبيط النمو بنسبة (50%) وكما موضح في الشكلين (4) و (5) على التوالي وهذا يتفق مع ما ذكره (Wang *et al.*, 2006).



الشكل 4: تأثير المركبان البروتينيتين (B وE) على نمو الفطر
1-طبق المقارنة 2- المركب البروتيني (E) 3- المركب البروتيني (B)



الشكل 5: تأثير الحزمتين البروتينيتين (B وE) على نمو البكتريا
1 - طبق المقارنة 2- المركب البروتيني (E) 3- المركب البروتيني (B)
Escherichia coli = E *Klebsiella* spp. = K *Staphylococcus aureus* = S

المصادر الأجنبية

Andrews, P. (1965) . The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weight over awide rang . *J. Biol. Chem*. **96**, 595.

Artieda, M.; Cenarro , A. ; Ganan , A.; Jerico , I.; Gonzalvo , C. ; Casado , J.; Vitoria, I.; puzo , J.; Pocovi , M. ; Civeira , F. (2003) . Serum chitotriosidase activity is increased in Subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1645.

Bacchus, R.; Kilshaw, B.H.; Madkour, M.; Al – Bassam, M.S. ; Al – Farhan, C. B. (1980). Preliminary students in a reference rang for Saudi Arabian males: (1) serum uric acid . *Saudi Med. J*. **1**(3), 161 – 162.

Barone, R.; Bertrand, G.; Simpore, J.; Malaguarnera, M. ; Musumeci, S. (2001). Plasma chitotriosidase activity in β- thalassemia major: a comparative study between Sicilian and Sardinian patients . *Clin. Chem. Acta*. **306**(1-2), 91–96.

Barone, R.; Di Gregorio, F.; Romeo, M.; Schiliro, G. ; Pavone L. (1998). Plasma chitotriosidase activity in patients with β-thalassemia . *Blood Cells. Mol. Dis*. **25**(1), 1-8.

Dahiya, N.; Tewari, R.; Tiwari, R.P. ; Hoondal, G.S. (2005). Chitinase form *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. *Electron. J. Biotechnol*. **8** (2).

Drabkin, D. L. ; Austin, J. H. (1935). *J. Biol. Chem*. 112 – 51.

Escott, G. M. ; Adams, D. J. (1995). Chitinase activity in Human serum and Leukocytes;. *Infect. Immun. Dec*. **63**(12), 4770 – 4773.

Hughes – Jones, N.C. ; Wickramasinghe , S. N. ; Hatton , C. (2004). "Lecture Notes on Hematology" . 7th edn., Black well Publishing Ltd , Oxford , UK . pp. 45 – 50 .

Jolivet, B. (2005). Synthesis of some furanone derivatives: putative quorum sensing or chitinase inhibitors . Ph. D. Thesis University of Basel.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. ; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin – phenol reagent . *J. Biol. Chem*. 193 , 265 – 275.

Lundbland, G.; Hederstedt, B.; Lind J. ; Steby, M. (1974). Chitinase in goat serum . *Eure. J. Biochem* . 46, 367 – 376.

Malaguarnera, L. (2006). Chitotriosidase: the yin and yang . *Cell. Mol. Life Sci*. **63** (24), 3018 – 3029.

Matsumiya, M.; Arakane, Y.; Haga, A.; Muthukrishnan, S. ; Kramer, K. J. (2006). Substrate specificity of chitinases from two species of fish, Greenling, *Hexagrammos otakii*, and Common Mackerel , *Scomber japonicus* , and the insect , Tobacco Hornworm , *Manduca sexta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **70**(4), 971–979.

Moore, K. G.; Price, M.S.; Boston, R.S.; Weissinger, A. K. and Payne G. A. (2004). A chitinase from Tex 6 maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*. *Phytopathol*. 94: 82 – 87.

Nitsawang, S. and Kanasawud, P. (2006). A rapid process for purification of chitinase from the latex of *Carica Papaya*. *Chiang Mai J. Sci*. 33 (2): 237 – 242.

Paoletti, M.G.; Norberto, L.; Damini, R.; Musumeci, S.(2007). Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Ann. Nutr. Metab*. **5**(3): 244 – 251.

Plummer, T.D. (1978). "An Introdaction of Practical Biochemistry". 2nd ed ., McGraw – Hill Book ; Co . V. K., 48, 52, 174, 270, 274.

Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum gluetmic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56 – 63.

Renkema, G.H. ;Boot , R.G. ; Strijland , A.; Donker–Koopman , W.E. ; van der Berg , M.; Muijser, A.O.; Aerts , J.M. (1997). Synthesis ,sorting ,and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur. J. Biochem* .244: 279 –285.

Renkema, G. H. ; Boot , R. G. ; Muijsers , A. O. ; Donker – koopman , W. E. and Aerts , J. M. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a noval member of the chitinase family of proteins. *J. Biol .Chem*. **270** (5): 2198 – 2202.

Robyt, F. J. and White, J. B. (1987). "Biochemical Techniques Theory and Practice". Books Cole Publishing Co., U.S.A., 14, 235–236, 246, 263, 269.

Schacterle, G. R. and Pollack, R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. *Anal. Biochem.* 51: 654 – 655.

Virgillis, S. ; Cornecchia , G.; Sanna , G.; Argioav , F. ; Galaneile , R. ; Foirelli , C.; Riad , A.; Cusso , P.; Bertolino , F. and Cao , A. (1981). Chronic liver disease in transfusion dependent thalassemia iron quantitation and distribution . *Acta . Hematologica*. 64 : 32 – 38 .

Wang, S. ; Lin , T. ; Yen , Y. ; Liao , H. and Chen , Y. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus Subtilis* W- 118 chitinase. *Carbohydr. Res*. 341: 2507 – 2515.

Williams, L.; White, J.M. and Flashka, C.M. (1977). The measurement of iron and total iron binding capacity by using colorimetric test (ferrozine). *Clin. Chem*. 23: 237 – 239.

Xia, G.; Jin, C.; Zhou, J.; Yang, S.; Zhang, S. and Jin, C. (2001). A noval chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ – 407. *Eur. J. Biochem*. 268: 4079 – 4085.