------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 4، ص71-87،2011------

دراسة إنزيم ميتالوإندوببتايديز وعلاقته بمرض العجز الكلوي المزمن

لقاء سعيد عبد الله ذكرى علي علوش إسراء عبد الحق الجراح

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 28/ 2 / 2011 ؛ تاريخ القبول 16 / 5 / 2011)

الملخص

تضمن البحث دراسة كيموحياتية لإنزيم ميتالوإندوببتايديز في الدم، إذ قسمت الدراسة على قسمين:

القسم الأول: تنقية إنزيم ميتالوإندوببتايديز من بلازما الدم من شخص سليم ووجد أن الفعالية النوعية وعـدد مرات التنقية هي (5.07 U/mg) و(33.13) مرة على التوالي للمحلول المائي لراسب كبريتـات الأمونيـوم بتشبع (75%) لبلازما الدم (الحزمةA) بتقنية الترشيح الهلامي ، كما وجد أن للإنزيم وزناً جزيئيـاً تقريبيـاً (1000 ± 86000 دالتون) باستخدام نفس التقنية وأن إنزيم ميتالوإندوببتايديز يحتوي على عنصري الخارصين والكالسيوم ، وهو من نوع البروتينات السكرية، ويعمل بظروف مثلى لتحليل مادة الأساس الكـازئين عنـد الدقيقة الأولى وأس هيدروجيني (pH=6) باستخدام المحلول المنظم الستريت ودرجة حرارة (40ºC) وتركيز مادة أساس (0.25mM)، وبلغت قيمة السرعة القصوى Vmax (0.4 U/ml) وقيمة ثابت ميكياس-منتن Km (0.04 mM)، ولوحظ أن للإنزيم المعزول القابلية على تحليل العديد من المواد الببتيدية والبروتينية، وكانـت أعلى فعالية باستخدام كرامسدين إس والإنسولين، في حين أن أقل فعالية باستخدام ألبومين مصل البقر مقارنة بالكازئين، وتبين أن مادة رباعي حامض الخليك أثيلين ثنائي الأمين وخلات المنغنيز تعمل على تثبيط فعالية الانزيم.

القسم الثاني: دراسة سريرية لإنزيم ميتالوإندوببتايديز في مصل دم الأصحاء ومرضـى العجـز الكلـوي المزمن، إذ ظهر أن المعدل الطبيعي لفعالية الإنزيم U/ml(0.36±14.19) لمجموعة السيطرة لكلا الجنـسين وبفئات عمرية year (20-70)، كما وجد ارتفاع معنوي في فعالية الإنزيم U/ml(0.53±17.53) في مـصل دم مجموعة المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن من كلا الجنسين وبفئـات عمريـة year (20-80) مقارنة بمجموعة السيطرة، وتبين عدم تأثر فعالية الإنزيم في مجموعة السيطرة والمرضى بالعمر والجـنس والتدخين، في حين لوحظ ارتفاع الفعالية مع زيادة مدة المرض وكذلك لـوحظ ارتفـاع الفعاليـة للمرضـى

المصابين بداء السكر والمرضى المصابين بارتفاع ضغط الدم وداء السكر أو أمراض القلب، فضلا عن العجز الكلوي المزمن.

كما وجد ارتفاع معنوي لدى مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة في مستوى كل من اليوريا والمغنيسيوم والبوتاسيوم، في حين ظهر انخفاض معنوي في مستوى كل من البروتين الكلي والألبومين والكالسيوم والخارصين والصوديوم، ولم يلحظ فرق معنوي في مستوى الكلوبيولين والنحاس.

وأخيرا تم إيجاد معامل الارتباط الخطي وتبين ظهور علاقة طردية معنوية بين فعالية الإنزيم ومستوى كل من البروتين الكلي والألبومين والكلوبيولين والبوتاسيوم والنحاس في مجموعة السيطرة، وعلاقة طردية معنوية بين فعالية الإنزيم ومستوى كل من البروتين الكلي والكلوبيولين والخارصين والنحاس في مجموعة المرضى.

الكلمات الدالة: إنزيم ميتالوإندوببتايديز، مرض العجز الكلوي المزمن، المتغيرات السريرية.

Studying of Metallo Endopeptidase and its Relation with Chronic Renal Failure

Liqa'a S. Abdulla **Thikra A. AL-Allwsh** **Isra'a A. AL- Jarah**

Department of Chemistry
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The research includes a biochemical study of metallo endopeptidase in the blood, which is divided into two parts: The first part includes purification of metallo endopeptidase from plasma. It has been found that the specific activity and the number of purification is (5.07U/mg) and (33.13) respectively for the aqueous solution of the ammonium sulphate precipitation of the plasma (peakA) using gel filtration technique. In addition to that, It has been found that the enzyme has approximate molecular weight (86000±1000) dalton using the same technique. It has been demonstrated that metallo endopeptidase contains zinc and calcium elements, which is a kind of glycoproteins .The optimal conditions to analyze the casein substrate in one minute and pH optimum (6) using citrate buffer at (40ºC) and a substrate concentration of (0.25mM). Maximum velocity and Mich-menten were determined and found to be (0.4U/ml) (0.04mM)respectively.

The enzyme activity was studied using gramicidin S and insulin as a substrate which showed high activity, while the activity was decreased by bovine serum albumin compared with casein. The enzyme activity decreased when EDTA and manganese acetate were used.

The second part includes a clinical study of metallo endopeptidase in the serum of individuals and patients with chronic renal failure. It has been shown that the normal value of metallo endopeptidase is (14.19±0.36)U/ml of the control group for both sexes, their ages ranged between (20-70) year. There was a significant increase in the enzyme activity

(17.53±0.53)U/ml in the serum of the patients affected by chronic renal failure from both sexes. It was also obvious that the enzyme activity was not effected in control and patients group by age, sex and smoking while the increase in activity was demonstrated with the increase of the disease's period as well as there was a significant increase in the enzyme activity in the patients affected by diabetes mellitus, hypertension and diabetes mellitus or heart diseases, aside from chronic renal failure .

A significant increase has been shown at urea, magnesium and potassium levels, while there was a significant decrease of total protein, albumin, calcium, zinc and sodium levels. However, no significant difference was observed at globulin and copper levels for patient group compared with the control group.

Finally, a linear correlation coefficient between the activity and each of the total protein, albumin, globulin, potassium and copper in the control group was observed, and a significant correlation between the activity and each of the total protein, globulin, zinc and copper in the patients group.

Keywords: Metallo endopeptidase, Chronic renal failure, clinical variables.

المقدمة

يعد إنزيم ميتالوإندوببتايديز (EC 3.4.24.11) من عائلة الببتايديزات (peptidases) من نوع II وهي من إنزيمات التحال المائي إذ يعمل الإنزيم على كسر الآواصر الببتيدية للببتيدات والبروتينات داخل سلسلةالببتيد (Almenoff and Orlowski, 2006) كما يطلق عليه Membrane metallo endopeptidase (MME)عندما يكون مرتبطاً بالغشاء البلازمي للخلايا في الأنسجة (Jeohn *et al.*, 1999)، في حين يطلق عليه Metallo endopeptidase عندما يكون بشكله الذائب في الدم والإدرار(Erdos and Skidgel, 1989) كما يطلق عليه Enkephalinase و Kidney borde metallo endopeptidase و Common acute lymphocytic leukemia antigen (Swiss institute of bioinformatics, 2009) وبين الباحثون (Sumitomo *et al.*, 2005) أن إنزيم ميتالوإندوببتايديز يعمل على تحليل العديد من الببتيدات الهرمونية والعصبية داخل الجسم وإبطال نشاطها الأيضي بواسطة تحليل الآواصر الببتيدية وخاصة آصرة (Gly-Phe) من النهاية الأمينية للأحماض الأمينية الهيدروفوبية أو الأروماتية خصوصاً مع الفينايل آلانين (Phe) أو التايروسين (Tyr) داخل سلسلة الببتيد.

يوجد الإنزيم في أعضاء مختلفة من جسم الحيوان والإنسان مثل الكلية والدماغ والقلب والرئة (Landry *et al.*, 1993)، كما يوجد في الطفيليات (Grellier *et al.*, 1989) والبكتريا (Gobbetti *et al.*, 1998) و بين الباحثون (Sansoe *et al.*, 2006) أن للإنزيم أهمية سريرية إذ لوحظ ارتباط فعاليته بالعديد من أمراض الكلى وذلك لوجود الإنزيم بتراكيز عالية في غلافها ويعرف العجز الكلوي المزمن بأنه نقص

دائم ومستمر في وظائف الكلى إلى الحد الذي يجعلها غير قادرة على حفظ البيئة الداخلية للجسم ضمن الحدود الطبيعية (Henry, 2001).

ونظراً لعدم وجود دراسة سابقة عن إنزيم ميتالوإندوببتايديز فقد ركز هدف البحث على جزئين: الأول هو محاولة تنقية الإنزيم ودراسة خواصه والثاني دراسة أهمية الإنزيم السريرية في مرضى العجز الكلـوي المزمن.

المواد وطرائق العمل

النماذج: جمع (100) أنموذج دم لأشخاص أصحاء ظاهرياً، تراوحت أعمارهم بين (20-70 year) ضمنت (53) نموذجاً للذكور و(47) نموذجاً للإناث، كما جمع (73) نموذج دم لأشخاص مصابين بمرض العجز الكلوي المزمن والذين يتعالجون بالديازة الدموية المستمرة، وتم سحب نماذج الدم لمجموعة المرضى قبل إجراء عملية الديازة الدموية التي تستغرق (3-4) ساعات، وقد شخصت حالة المرضى من قبل أطباء مختصين بالتعاون مع مستشفى ابن سينا التعليمي _ وحدة الكلية الاصطناعية، تراوحت أعمارهم بين (20-80 year)، وتتضمن (38) نموذجاً للذكور و(35) نموذجاً للإناث، ودونت المعلومات الخاصة بالمرضى على وفق استمارة استبيان خاصة لكل مريض أعدت لهذا الغرض.

تحضير عينات الدم

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

بلازما الدم : أخذ (25ml) بلازما من متبرع ذكر سليم بعمر (25) سنة وبمساعدة مركز نقل الدم وقدر كمية البروتين بطريقة لاوري (Lowry *et al*., 1951) والمحورة من قبل(Schacterle and Pollack, 1973) كما قدرت فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز فيه (Kanazawa and Johnston, 2007) .

ترسيب البروتين وفصله باستخدام كبريتات الأمونيوم: استخدم (25ml) 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 ميتالوإندوببتايديز 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 وضع مادة الهلام على ارتفاع (95cm)، وتم إمرار المحلول المائي لراسب كبريتات الأمونيوم بتشبع (75%) بعد أن أجري له فرز غشائي على عمود الفصل باستخدام (2ml) من النموذج، وتبع ذلك (2ml) من الماء المقطر للغسل، فقد استخدم الماء المقطر لاسترداد المحلول،

بعد ذلك تم استرداد المواد البروتينية بمعدل جريان (48ml/hours) وبمعدل (4ml/5.0min) لكل جزء، فقد تمت 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 ميتالواندوببتاديز في الأجزاء المفصولة، بعد ذلك جمعت الأجزاء البروتينية التي تمثل الحزمة الحاوية على فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز.

تم تجفيف الحزم البروتينية باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) لغرض الحصول على هذه الحزم بشكل مركز.

العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز المنقى جزئياً

تمت دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية الإنزيم لتحديد الظروف المثلى لعمل الإنزيم وتتضمن: تركيز الإنزيم وتركيز مادة الأساس، زمن التفاعل، الأس الهيدروجيني، درجة حرارة التفاعـل والمنـشطات والمثبطات، كما تم إجراء تجربة استبدال مادة الأساس الكازئين ببعض المواد الببتيدية والبروتينية. وكـشف مولش (Plummer, 1978) محتـوى الإنـزيم للأيونـات المعدنيـة بتقنيـة طيـف الامتـصاص الـذري *Atomic absorption spectrophotometry* (Burtis and Ashwood, 1999).

تقدير فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز في مصل الدم: قدرت فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز استنادا إلى طريقة الباحثين (Kanazawa and Johnston, 2007) إذ يعمل الإنزيم على تحليل مادة الأساس الكازئين وتقاس الامتصاصية للمادة الناتجة عند طول موجي قدره (275nm) وقدرت الفعالية على أنها وحدات الإنزيم في مللتر من مصل الدم، إذ إن الوحدة الإنزيمية (U): هي كمية الإنزيم التي تعمل على تحويل مايكرومول واحد من مادة الأساس إلى المادة الناتجة في الدقيقة الواحدة لكل مللتر من مصل الدم.

المتغيرات السريرية المدروسة

تقدير اليوريا في مصل الدم: استخدمت الطريقة إلانزيمية لـلباحثين (Wills and Savory, 1981) باستخدام عدة التحليل الجاهزة (Kits) من شركة (Biomerieux) الفرنسية .

تقدير البروتين الكلي في مصل الدم: استخدمت طريقة بايوريت (Burtis and Ashwood, 1999).

تقدير الألبومين في مصل الدم:استخدمت طريقة بروموكريسول الأخضر (Doumas *et al*., 1971) باستعمال عدة التحليل الجاهزة (Kits) من شركة (Biolabo) الفرنسية.

تقدير الكلوبيولين في مصل الدم: قدر تركيز الكلوبيولين في مصل الدم استنادا الى المعادلة الآتية:

Conc . globulin = Conc. total protein – conc. albumin (Burtis and Ashwood , 1999) (g /100ml).

تقدير تركيز بعض العناصر في مصل الدم بتقنية طيف الامتصاص الذري: تم تقدير تركيز الكالسيوم والخارصين والنحاس والمغنيسيوم في أنموذج مصل الدم (Burtis and Ashwood, 1999).

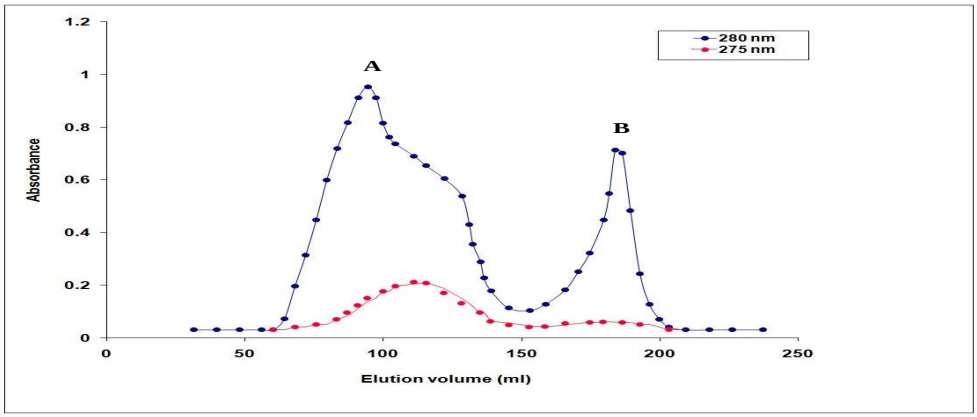
تقدير تركيز الصوديوم والبوتاسيوم في مصل الدم بتقنية طيف الانبعاث باللهب *Spectrophotometry Flame Emission* : اعتمادا على (Bishop *et al*., 2000).

التحليل الإحصائي: تم تحليل النتائج إحصائيا، إذ استخدم اختبار (Anova) و (T-test)، وتم إيجـاد معامـل الارتباط الخطي ("Correlation coefficient"r) لإيجاد العلاقة بين إنزيم ميتالوإندوببتايـديز والمتغيـرات السريرية لمجموعتي السيطرة والمرضى.

النتائج والمناقشة

الجزء الأول: عزل وتنقية إنزيم ميتالوإندوببتايديز من بلازما الدم

استخدمت تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لعزل إنزيم ميتالوإندوببتايديز من بلازما الدم، إذ تم فصل المركبات البروتينية لمحلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (75%) وبينت النتائج الموضحة في الشكل (1) ظهور حزمتان بروتينيتان .



الشكل (1) المظهر الجانبي لروغان أنزيم ميتالوإندوببتايديز المنقى جزئياً من محلول راسب كبريتات الأمونيوم بتشبع (75%) لبلازما الدم بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (100x1.6cm) والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (95cm)، حيث ان (A و B) الحزم البروتينية

وجد أن الحزمة البروتينية الأولى (A) لديها أعلى فعالية نوعية مقارنة بالحزمة (B) وعدت الحزمة البروتينية الأولى (A) الحزمة البروتينية الفعالة الرئيسة والممثلة لإنزيم ميتالوإندوببتايديز وخلاصة نتائج مراحل تقنية إنزيم ميتالوإندوببتايديز من محلول راسب كبريتات الأمونيوم مدرجة في الجدول (1). الذي يبين أن عدد مرات تنقية إنزيم ميتالوإندوببتايديز من بلازما الدم بلغت (33.13) مرة وأن الفعالية النوعية لإنزيم (الحزمة A) بعد عملية الترشيح الهلامي ازدادت وبلغت (5.07 U/mg) عن بلازما الدم. وهذا يتفق مع

ماوجده الباحثان (Kerr and Kenny, 1974) بأن الفعالية النوعية لإنزيم ميتالوإندوببتايديز المفصول والمنقى من كلية الأرنب هي (5.0 U/mg).

الجدول :1 خلاصة نتائج مراحل تنقية إنزيم ميتالوإندوببتايديز 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		1632.3	250	0.153	100	1
الترسيب بكبريتات الامونيوم بتشبع (75%)		1212	220	0.181	88	1.18
الفرز الغشائي		1020	210	0.205	84	1.34
الترشيح الهلامي	**الحزمة الأولى (A)**	25.7	130.3	5.07	52.12	33.13

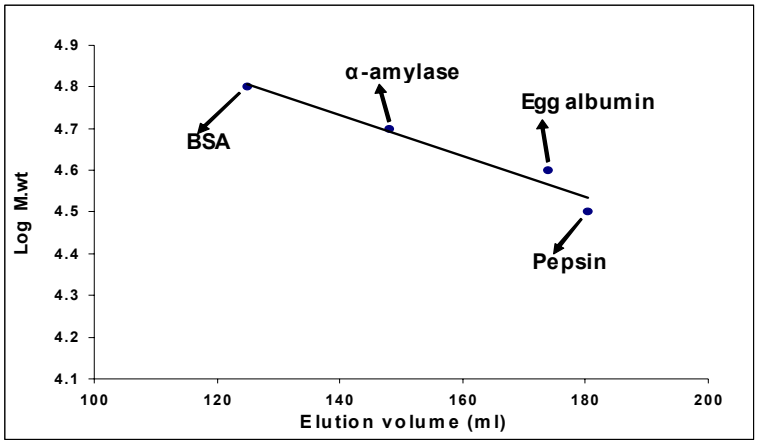
محتوى إنزيم ميتالوإندوببتايديز للأيونات المعدنية: أظهرت نتائج تقنية طيف الامتصاص الذري أن الحزمة البروتينية (A) المفصولة من محلول راسب كبريتات الأمونيوم لبلازما الدم تحتوي على عنصري الخارصين والكالسيوم إذ تبلغ نسبة (Zn/Ca) (12.75%)، كما موضح في الجدول (2) وهذا يشير إلى أن إنزيم ميتالوإندوببتايديز هو من الإنزيمات المعدنية، إذ يحتوي على عنصري الخارصين والكالسيوم بوصفها عوامل مرافقة وهذا يتفق مع ماذكره الباحثون (Sansoe *et al.*, 2006) ، وتم إثبات ذلك بتقنية طيف الإمتصاص الذري.

ارتباط الإنزيم بمجاميع سكرية: اظهرت النتائج باستخدام كشف مولش أن إنزيم ميتالوإندوببتايديز (الحزمةA) عبارة عن بروتين سكري وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثان (Almenoff and Orlowski, 2006)

الجدول 2: نسبة عنصري الخارصين والكالسيوم بوصفها عوامل مرافقة لإنزيم ميتالوإندوببتايديز المنقى جزئياً من محلول راسب كبريتات الامونيوم بتشبع (75%) لبلازما الدم (الحزمةA).

تركيز عنصري الخارصين والكالسيوم (mg/ml)		% احتواء الإنزيم على العنصري الخارصين والكالسيوم كعوامل مرافقة	النسبة/البروتين الكلي mg	النسبة/الفعالية الكلية U	النسبة/الفعالية النوعية U/mg
0.00369	Zn	%12.75	0.4961	0.0978	2.514
0.02892	Ca				

تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم ميتالوإندوببتايديز بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي: تم إمرار عدد من المركبات المعلومة الوزن الجزيئي التي تتراوح أوزانها بين (204-2000000) دالتون لغرض تعيين خواص العمود وعند رسم حجم الروغان (Elution volume) لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي، تبين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم ميتالوإندوببتايديز المنقى جزئياً من بلازما الدم (الحزمةA) (1000 ± 86000) دالتون، وهذا يتفق مع ما وجده الباحثان (Almenoff and Orlowski, 2006) بأن الوزن الجزيئي المحدد بواسطة تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي و الهجرة الكهربائية لإنزيم هو (87000- 96000) دالتون.



الشكل 2 : المنحنى القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي.

العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز: وجد أن الظروف المثلى لفعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز(الحزمةA) هي المدرجة في الجدول (3) ، وباستخدام رسم لاينويفر_برك وجد أن قيمة السرعةالقصوى (Vmax) وقيمة ثابت ميكياس_منتن (Km) هي (0.4 U/ml) و(0.04mM) على التوالي.

الجدول 3: الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز المنقى جزئياً.

إنزيم ميتالوإندوببتايديز	تركيز الإنزيم (µg/ml)	زمن التفاعل (min)	pH المحلول المنظم (0.1M) Citrate buffer	درجة الحرارة (°C)	تركيز المادة الأساس (mM)
الحزمةA	12	1	6	40	0.25

تأثير المثبطات والمنشطات: يظهر الجدول (4) وجود انخفاض لفعالية الإنزيم بوجودEDTA وقد يعزى السبب إلى دوره عاملا مخلبياً أو كليتياً فهو يؤدي فعله التثبيطي على العوامل المرافقة للإنزيم وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثون (Jeohn *et al*., 1999)، كما أظهرت خلات المنغنيز تأثيراً تثبيطياً على فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثون (Bockelmann *et al*., 1996) من أن الايونات الثنائية التكافؤ تعمل على تثبيط فعالية الإنزيم في حين أظهر حامض الستياريك بتركيز (3 mM) تأثيراً تنشيطياً على فعالية الإنزيم وهذا يتفق مع ماوجده الباحثون (Pornprom *et al*., 2003).

الجدول 4 : تأثير بعض المثبطات والمنشطات على فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز المنقى جزئياً.

اسم المادة	التركيز (mM)	% الزيادة او النقصان في الفعالية*
EDTA	5	-41.8
خلات المنغنيز	100	-33.4
فيتامينC	5	-6.9
بيتا_ميركابتوإيثانول	10	-5.1
حامض الستياريك	3	+11.6

*اعتبر أن الفعالية بدون وجود المواد المثبطة والمنشطة تمثل نسبة (100%) .

تأثير استبدال مادة الأساس الكازئين ببعض المواد البتيدية والبروتينية : تشير النتائج الموضحة في الجدول (5) إلى أن استخدام المواد البتيدية مواداً أساساً للإنزيم أعطت أعلى فعالية مقارنة بالبروتينات، وربما يعود السبب الى طول السلسلة او الإعاقة الفراغية، وكذلك نوع الأحماض الأمينية المكونة له ويظهر من الجدول أيضاً أن أقل فعالية كانت باستخدام مادة أساس BSA (Almenoff and Orlowski, 2006).

الجدول 5: تأثير استبدال مادة الأساس الكازئين ببعض المواد البتيدية والبروتينية على فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز المنقى جزئياً .

اسم المادة	النسبة المئوية للمادة نسبة الى الكازئين*	% الزيادة أو النقصان مقارنة بالكازئين
كرامسدين إس	195.1	+95.1
الإنسولين	183.2	+83.2
الأوكسي توسين	165.4	+65.4
التربسين	147.2	+47.2
ألبومين البيض	122.4	+22.4
الببسين	107.4	+7.4
ألبومين BSA مصل البقر	68.7	-31.2

*اعتبر أن الفعالية باستخدام الكازئين تمثل نسبة (100%).

استنتج من خلال عزل وتنقية إنزيم ميتالوإندوببتايديز من مصل الدم لشخص سليم ظاهرياً أن تقنية الترشيح الهلامي اعطت نتائج جيدة ويفضل استخدام تقنيات اخرى للحصول على فعالية نوعية أعلى وعدد مرات تنقية أكثر. ويمكن استخدام أكثر من مادة ببتيدية وبروتينية بوصفها مواداً أساساً للإنزيم بدلاً من الكازئين ويفضل استخدام البتيدات مثل الكرامسدين إس والإنسولين.

الجزء الثاني : فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز في مصل دم مجموعة السيطرة:

وجد أن المعدل الطبيعي لفعالية الإنزيم U/ml (0.36 ±14.19) ، كما موضح في الجدول (6) وهو أعلى من المعدل الذي وجده (Selmeci *et al*., 1996) في مصل الدم، والذي يعزى إلى اختلاف طريقة قياس فعالية الإنزيم، بالإضافة إلى اختلاف البيئة والتغذية بين الأفراد والشعوب والذي له تأثير على فعالية الإنزيم، كما وجد عدم تأثر فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز في مجموعة السيطرة بالعمر والجنس و التدخين وهذا يتفق مع ما ذكره (Selmeci *et al*., 1996) .

فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز في مصل دم مجموعة المرضى: وجد أن فعالية الإنـزيم فـي مـصل دم مجموعة المرضى المصابين بمرض العجز الكلوي المزمن U/ml (0.53 ± 17.53) كما مبين في الجـدول (7) ، ووجد ارتفاع تدريجي غير معنوي في فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز مع زيادة الفئة العمرية وعدم تأثر فعالية الإنزيم بالجنس والتدخين.

الجدول 6 : فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز في مصل دم مجموعة السيطرة .

مجموعة السيطرة	فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز U/ml* Mean ± S.E
الفئة العمرية الاولى (20-39 year)	13.9 ± 0.3
الفئة العمرية الثانية (40-59 year)	14.45 ± 0.38
الفئة العمرية الثالثة (≥ 60 year)	14.24 ± 0.41
المعدل الكلي	14.19 ± 0.36
ذكور	13.52 ± 0.27
إناث	14.86 ± 0.33
المدخنون	13.44±0.45
غير المدخنين	14.94±0.24

*الوحدة الانزيمية (U): كمية الإنزيم التي تعمل على تحويل مايكرومول واحد من مادة الأساس إلى المادة الناتجة في الدقيقة الواحدة لكل ملليتر من مصل الدم.

الجدول 7: فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز في مصل دم مجموعة المرضى.

مجموعة المرضى	فعالية إنزيم ميتالوإندوببتايديز U/ml Mean ± S.E
الفئة العمرية الأولى (20-39 year)	16.98 ± 0.51
الفئة العمرية الثانية (40-59 year)	17.2 ± 0.61
الفئة العمرية الثالثة (≥ 60 year)	18.42 ± 0.49
المعدل الكلي	17.53 ± 0.53
ذكور	17.15 ±0.38
اناث	17.91 ±0.49
المدخنون	17.31 ± 0.51
غير المدخنين	17.75 ± 0.32

فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز في مصل دم مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة :

تبين وجود ارتفاع معنوي عند مستوى الاحتمالية ($P\leq0.05$) في فعالية الإنزيم لدى مجموعة المرضى حسب المعدل الكلي والعمر والجنس والتدخين عند مقارنته لدى مجموعة السيطرة ، وهذا يتفق مع ما وجده (Sansoe *et al*., 2006) وقد يعود السبب إلى تلف أغشية الكلى مما يؤدي إلى تحرر الإنزيم إلى الدم .

تأثير مدة المرض : تم دراسة تأثير مدة المرض على فعاليـة إنـزيم ميتالوإندوبيتايـديز، وبينـت النتـائج الموضحة في الجدول (8) ارتفاعاً تدريجياً معنوياً عند مستوى الاحتمالية ($P\leq0.05$) في فعالية الإنـزيم مـع زيادة مدة المرض، مما يشير الى زيادة تحطم أنسجة الكلى مع زيادة مدة المرض والتي تعمل على ارتفـاع فعالية الإنزيم في مصل الدم، وهذا يتفق مع ما بينه الباحثون (Sansoe *et al*., 2006).

الجدول 8 : فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز في مصل دم مجموعة المرضى حسب مدة المرض.

مجموعة المرضى	فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز U/ml Mean ± S.E
مدة المرض (< 1 year)	*16.12 ± 0.38
مدة المرض (1-4 year)	*17.23 ± 0.55
مدة المرض (> 4 year)	*19.21 ± 0.66

* Significant at ($P\leq0.05$).

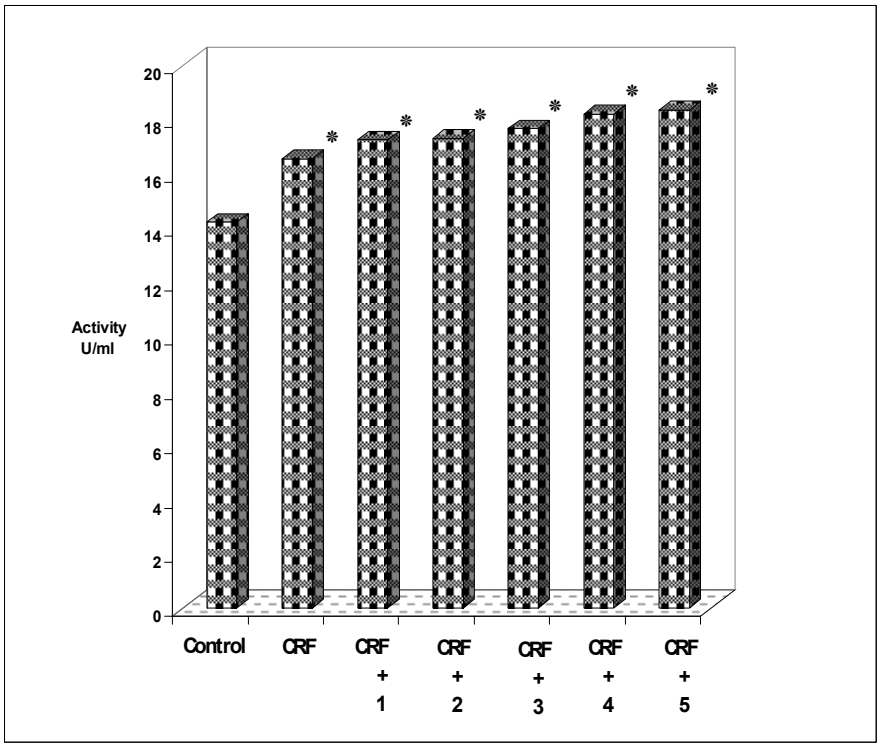
تأثير بعض الأمراض الأخرى:

لوحظ من الشكل (3) وجود ارتفاع معنوي عند مستوى الاحتمالية ($P\leq0.05$) في فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز للمرضى المصابين بجميع الأمراض المذكورة في أدناه مقارنة بمجموعة السيطرة ولوحظ أعلى ارتفاع في الفعالية للمصابين بداء السكر و للمصابين بارتفاع ضغط الدم وداء السكر أو أمراض القلب، فضلا عن العجز الكلوي المزمن، وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي بينت أن للإنزيم أهمية سريرية في حالات مرضية كداء السكر (Oefner *et al*., 2007) وأمراض القلب والكلية (Sansoe *et al*., 2006) والروماتيزم (Swiss institute of bioinformatics, 2009).

المتغيرات السريرية لدى مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة:

يظهر من الجدول (9) وجود ارتفاعاً معنوياً في مستوى اليوريا لدى مجموعة المرضى، وهذا يتفق مع ما بينَه الباحثون (Schrier and Gottschalk, 1997) وقد يعزى سبب ذلك إلى وجود خلل في الوظيفة الترشيحية للكلية وانخفاض في معدل الترشيح الكبيبي للكلية في حين لوحظ انخفاض معنوي في مستوى

البروتين الكلي والألبومين، وهذا يتفق مع ما وجده الباحث (Krenitsky, 2004) ، وقد يعزى ذلك إلى التلف الحاصل في النسيج الكلوي، مما يؤدي إلى فقدان وتسرب البروتينات بكميات كبيرة من خلال النسيج التالف للكلية، أو بسبب قلة تناول الأغذية البروتينية نتيجة الحمية المفروضة من قبل الطبيب. ولوحظ ارتفاع معنوي في مستوى المغنيسيوم، وهذا يتفق مع ما وجده الباحثان (Bogden and Klevay, 2000) وقد يعزى ذلك إلى اخـ ـ ـتزال الترشيح الكبيبي في الكلية، أو بسبب استخدام بعض الأدوية الحاوية على المغنيسوم أو لكلا السببين .



*Significantat (P≤0.05).

الشكل 3: فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز لدى مرضى لـ (CRF) المصابين بأمراض اخرى مقارنة بمجموعة السيطرة

1. أمراض القلب 2. ارتفاع ضغط الدم 3. أمراض أخرى (الكساح، الشلل النصفي والروماتيزم)
4. داء السكر 5. ارتفاع ضغط الدم وداء السكري أو أمراض القلب

كما تبين النتائج وجود ارتفاع معنوي في مستوى البوتاسيوم وهـذا يتفـق مـع مـا وجـده الباحثـان (Ahmed and Weisberg , 2001) وقد يعزى ذلك إلى دور الكلية في طرح ما يقـارب (90-95%) مـن البوتاسيوم الداخل إلى الجسم ، ولوحظ وجود انخفاض في مستوى الكالسيوم وهذا يتفق مع ما بينَه الباحـث

(Pillitteri, 1999) وقد يعزى سبب ذلك إلى زيادة مستوى الفسفور في الدم ، فهناك تناسب عكسي بين الفسفور والكالسيوم . ووجد انخفاض في مستوى الخارصين وهذا يتفق مع ما بينَه الباحثون (Tonelli *et al*., 2009) ، وقد يعزى ذلك الى قلة تواجده في الوجبات الغذائية المتناولة كما أن انخفاض عملية امتصاصه من قبل الأمعاء بسبب تناول بعض المركبات الدوائية (الحاوية على الفوسفات)، إذ تقوم هذه المركبات بتكوين معقدات مخلبية مع العناصر، كما وجد انخفاض في مستوى الصوديوم وهذا يتفق مع ما بينه الباحثون (Reynolds *et al*., 2006) وقد يعزى سبب ذلك إلى عدم امتصاص الصوديوم مرة ثانية بعد ترشيحه نتيجة التهاب الأنابيب الكلوية.في حين لم يظهر فرق معنوي في مستوى الكلوبيولين والنحاس لدى مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة.

الجدول 9: المتغيرات السريرية المقاسة لدى مجموعتي السيطرة والمرضى.

المتغيرات السريرية المقاسة	مجموعة السيطرة Mean ± S.E	مجموعة المرضى Mean ± S.E
اليوريا	5.177 ± 0.9 mmol/l	*24 ± 2.13 mmol/l
البروتين الكلي	6.9 ± 0.1 g/100ml	*5.4 ± 0.11 g/100ml
الالبومين	4.33 ± 0.05 g/100ml	*3.0 ± 0.07 g/100ml
الكلوبيولين	2.57 ± 0.07 g/100ml	2.4 ± 0.09 g/100ml
الكالسيوم	10.2 ± 0.43 mg/100ml	*8.6 ± 0.45 mg/100ml
الزنك	18.63 ± 0.31 µmol/l	*10.64 ± 0.3 µmol/l
النحاس	14.9 ± 0.59 µmol/l	14.7 ± 0.56 µmol/l
المغنسيوم	1.34 ± 0.05 mmol/l	*2.17 ± 0.07 mmol/l
الصوديوم	143.5 ± 0.7 mmol/l	*125.7 ± 1.1 mmol/l
البوتاسيوم	4.6 ± 0.06 mmol/l	*6.16 ± 0.15 mmol/l

*Significant at ($P \leq 0.05$)

العلاقة الخطية بين فعالية الإنزيم وعدد من المتغيرات لدى مجموعتي السيطرة والمرضى

لإيجاد العلاقة بين فعالية إنزيم ميتالوإندوبيبتايديز وعدد من المتغيرات السريرية المقاسة لدى مجموعتي السيطرة والمرضى، تم إيجاد معامل الارتباط الخطي، إذ لوحظ وجود علاقة طردية معنوية عند مستوى الاحتمالية ($P \leq 0.01$) بين فعالية الإنزيم مع كل من مستوى البروتين الكلي والألبومين والكلوبيولين في

مجموعة السيطرة، ومستوى البروتين الكلي والكلوبيولين في مجموعة المرضى، كما موضح في الجدول(10) وقد يعزى سبب ذلك إلى طبيعة عمل الإنزيم في تحلل الآواصر الببتيدية للببتيدات والبروتينات، وهي المواد الأساس للإنزيم (Sumitomo *et al*., 2005; Almenoff and Orlowski, 2006) كما لوحظ وجود علاقة طردية معنوية بين فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز ومستوى البوتاسيوم و النحاس في مجموعة السيطرة، وبين فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز ومستوى الخارصين والنحاس في مجموعة المرضى، كما موضح في الجدول (10)، وقد يعزى سبب ذلك إلى أن إنزيم ميتالوإندوبيتايديز من الإنزيمات المعدنية، وقد يتأثر بوجود الأيونات والألكتروليتات.

تبين من النتائج أن للإنزيم أهمية سريرية في تشخيص مرض العجز الكلوي المزمن لذا ينصح باعتماده بوصفه أحد المتغيرات السريرية المستخدمة في تشخيص المرض وكذلك نسبة تضرر الكلية، إذ تزداد فعالية الإنزيم مع زيادة عجز الكلية ويعود سبب ذلك إلى تحرر الإنزيم من خلال غشاء الكلية نظراً لتضرر الكلية، كما تبين أن للإنزيم أهمية سريرية في أمراض أخرى كأمراض القلب والضغط والسكر.

الجدول 10: معامل الارتباط الخطي بين فعالية إنزيم ميتالوإندوبيتايديز وبعض المتغيرات السريرية في مصل دم مجموعتي السيطرة والمرضى.

المتغيرات السريرية المقاسة	مجموعة السيطرة Correlationcoefficient "r"	مجموعة المرضى Correlationcoefficient "r"
ميتالوإندوبيتايديز	1.000	1.000
يوريا	0.087	-0.105
البروتين الكلي	**0.434	**0.763
الالبومين	**0.383	0.156
الكلوبيولين	**0.347	**0.753
الكالسيوم	-0.022	0.088
الزنك	0.253	*0.253
النحاس	*0.272	*0.290
المغنسيوم	0.230	-0.084
الصوديوم	-0.208	-0.178
البوتاسيوم	**0.532	-0.019

*Significant at (P≤0.05) **Significant at (P≤0.01)

المصادر الأجنبية

Ahmed, J. ; Weisberg, L.S. (2001). Hyperkalemia in dialysis patients. *Sem. Dial*. **14**(5), 348-356.

Almenoff, J. ; Orlowski, M. (2006). Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metallo endopeptidase: Comparison with thermolysin like kidney neutral metallo endopeptidase. *J. Neurochem*. **42**(1), 151-157.

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

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

Bishop, M. L.; Duben-Engelkirk, J. L. ; Fody, E.P. (2000). "Clinical Chemistry: Principle, Correlation". 4th edn., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp.458-89.

Bockelmann, W.; Seyler, H. T ; Heller, K. J. (1996). Purification and characterization of an endopeptidase from *lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* B14 . *J. Int. dairy*. **6**(11-12), 1167-1180.

Bogden, J.D. ; Klevay, L.M. (2000). "Clinical Nutrition of the Essential Trace Elements and Minerals". Humana. Press Inc., Totowa, New Jersey, pp. 273-285.

Burtis, C.A. ; Ashwood, E.R. (1999). "Tietz Textbook of Clinical Chemistry". 3rd. edn., W.B. Saunders Company, Philadelphia, U. S.A. 156,458,578,611 ,784 p.

Doumas, B. T. ; Watson, W. A. ; Briggs, H.G. (1971). Albumin standards and the measurement of albumin with bromocresol green . *Clin. Chim. Acta*. **31**, 87-96.

Erdos, E. G.; Skidgel, R. A. (1989). Neutral endopeptidase 24.11(enkephalinase) and related regulators of peptide hormones . *J. FASEB*. **3**, 145-151.

Gobbetti, M.; Smacchi, E.; Stepaniak, L.; Crea, F. ; Fox, P. (1998). Purification and characterization of an endopeptidase from *pseudomonas fluorescens* ATCC 948 . *J. Food Biochem*. **22**(1), 17-35.

Grellier, P.; Picard, I.; Bernard, F.; Mayer, R.; Heidrich, H.G.; Monsigny, M. ; Schrevel, J. (1989). Purification and identification of a neutral endopeptidase in *plasmodium falciparum schizonts and merozoites* . *Parasitol. Res*. **75**(6), 455-460.

Henry, J. B. (2001). "Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods" . 20th edn., W.B. Saunders Company, A Harcourt Health Sciences Company, Philadelphia, pp.159-177.

Jeohn, G.H.; Matsuzaki, H. ; Takahashi, K. (1999). Purification and characterization of a detergent requiring membrane-bound metallo endopeptidase from porcine brain . *Eur. J. Biochem*. **260**(2), 318-324.

Kanazawa, M.; Johnston, C. (2007). Distribution and inhibition neutral metallo endopeptidase (NEP) (EC 3.4. 24.11), the major degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in the rat kidney . *Clin. Exp. Pharm. physiol*. **18**(6), 449-453.

Kerr, M.A. ; Kenny, A. J. (1974). The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border . *Biochem. J*. **137**, 477-488.

Krenitsky, J. (2004). "Nutrition in renal failure: myths and management". Practical Gastroenterology. pp. 40-59.

Landry, C.; Santagata, P.; Bawab, W.; Fournie-Zaluski, M.C.; Roques, B.P.; Vinay, P. ; Crine, P. (1993). Characterization of neutral endopeptidase 24.11 in dog glomeruli. *Biochem. J.* , **291**, 773-779.

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

Oefner, C.; Pierau, S.; Schulz, H. ; Dale, G.E. (2007). Structural studies of a biofunctional inhibitor of neprilysin and DPP-IV . *J. Acta. Cryst*. **63**, 975-981.

Pillitteri, A. (1999). "Maternal and Child Health Nursing: Care of the Childbearing and Childrearing Family". 3rd edn., Lippincott, Philadelphia, pp.1358-1359.

Plummer, T.D. (1978). "An Introduction of Practical Biochemistry". 2nd edn., McGraw-Hill Book; Co. V.K., 48, 52, 174, 270, 274p.

Pornprom, M.; Mickelle, S.L.; Richard, T.N. ; Nicolle, G.S. (2003). Fatty acids and glucose increase neutral endopeptidase activity in human microvascular endothelial cells . *J. Shock.* **19**(6), 508-512.

Reynolds, R.M. ; Padfield, P. L. ; Seckl, J.R. (2006). Disorders of sodium balance . *BMJ*. **332**, 702-705.

Robyt, F.J. ; White, J. B. (1987). "Biochemical Techniques Theory and Practice". Books Cole Publishing Co., U.S. A., 141, 235-236, 246, 263, 269p.

Sansoe, G.; Aragno, M.; Mastrocola, R.; Cutrin, J.C.; Silvano, S.; Mengozzi, G.; Smedile, A.; Rosina, F.; Danni, O. ; Rizzetto, M. (2006). Over expression of kidney neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and renal function in experimental cirrhosis . *Am. J. physiol. Renal Physiol.* **290**(6), 1337-1343.

Schacterle, G. R. ; Pollack, R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material . *Anal. Biochem*. **51**, 654-5.

Schrier, R.W. ; Gottschalk, C.W. (1997). "Diseases of the Kidney". 6th edn.; Little Brown and Company, USA,. 1070-1075, 1081-1082p.

Selmeci, L.; Szokodi, I. ; Horvat-Karaiz, K. (1996). A sensitive microplate-based continuous – monitoring (Kinetic) assay for serum neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) activity . *J. Clin. Chim. Acta*. **244**(1), 111-116.

Sumitomo, M.; Shen, R. ; Nanus, D. M. (2005). Involvement of neutralendopep- tidase in neoplastic progression . *J. Biochim. Biophys. Acta*. **1751**(1), 52-59.

Swiss Institute of bioinformatics. htttp: //www. expasy. ch /enzyme / 3.4.24.11. (2009).

Tonelli, M.; Wiebe, N.; Hemmelgarn, B.; Klarenbach, S.; Field, C.; Manns, B.; Thadhani, R. ; Gill, J. (2009). Trace elements in hemodialysis patents: a systematic review and meta-analysis . *J. BMC. Med*. **7**, 25.

Wills, M.R. ; Savory, J. (1981). Biochemistry of renal failure . *Ann.Clin.Lab.Sci*.**11**, 292-299.