دراسات حركية لمتناظر انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى من لعاب مرضى داء السكر

فراح غالي الصالحي[1] ، نزار احمد ناجي[2] ، اسراء اسماعيل ياسين[1]

[1] قسم الكيمياء ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت، تكريت ، العراق

[2] قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص:

شمل هذا البحث الدراسات الحركية لمتناظر انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى من لعاب مرضى داء السكر حيث كان التركيز الامثل للمادة الاساس (10mM) وبلغت قيم ثابت ميكاليس– منتن (K_m) (4.762) ملي مولار ، اما درجة الحرارة المثلى لعمل الانزيم ومتناظره (37)°م . وقد تم تحديد قيم طاقة التنشيط Ea و معامل درجة الحرارة Q_{10} لمتناظر ALP المنقى إذ بلغت ($17.785\ KJ.mol^{-1}$ و 1.11) على التوالي. بينما كانت درجة pH المثلى 10 وقيمة pK_a له (10.1).

كذلك شملت الدراسة تأثير بعض الايونات المعدنية والاحماض الامينية على متناظر ALP المنقى إذ اظهرت النتائج ان الايونات Co^{+2} و Mg^{+2} و Ni^{+2} تأثير تنشيطي على فعالية المتناظر اما الايونات (Zn^{+2} و Cu^{+2}) و EDTA والاحماض الامينية سستائين .Cys و ليوسين .Leu و فينايل الانين .Phe و تربتوفان .Trp فقد اظهرت تأثيرا تثبيطيا . وبينت النتائج ان .Cys و.Trp يعملان كمثبطات غير تنافسية non-competitive inhibition حيث بلغت قيم K_i (6.3 و 3.7) ملي مولار لكل من .Cys و.Trp على التوالي.

كلمات المفتاح: تنقية انزيم الفوسفاتيز القاعدي، اللعاب ، داء السكر ، الدراسات الحركية .

المقدمة

ينتمي انزيم الفوسفاتيز القاعدي orthophosphate monoester phosphohydrolase[1] ، EC 3.1.3.1 لصنف الانزيمات المحللة (hydrolases) التي تعمل على تحلل الفوسفات احادية الاستر phosphor monoester من الجزيئات العضوية مثل الرايبونيوكليوتيدات ribonucleotides والديوكسي رايبونيوكليوتيدات deoxy-ribonucleotides والبروتينات والقلويدات واسترات الفوسفات وانهيدريدات حامض الفوسفوريك[2] لانتاج الفوسفات اللاعضوي والكحول او الفينول او السكر[1] عند اس هيدروجيني قلوي (11 - 7.5 pH)[3] . يوجد الفوسفاتيز القاعدي في كافة انسجة جسم الانسان والتي تتضمن الكبدliver والعظام bone والامعاء intestine والمشيمة placenta[4]. و يحتوي الكبد والعظام على تركيز عالٍ من الانزيم بينما تركيزه أقل في الكلية والامعاء والمشيمة والكريات البيض Leukocytes ، وسبب الكمية العالية للانزيم في العظام هو احتواء اغشية الخلية العظمية osteoblasts عليه التي تكون وحدة البناء للتشكيل العظمي[5].

وصف الباحث Sawadaki وجماعته (1985) تركيب ALP بواسطة بلوريات الاشعة السينية X-ray crystallography حيث يحتوي موقعه النشط active site على الاحماض الامينية بمواقعها التالية: Asp.101 , Ser.102 , Ala.103[6] واُعتبر من الانزيمات المعدنية metalloenzymes[7] بسبب احتواء موقعه النشط على ايون المغنيسيوم Mg^{+2} وايونين للخارصين Zn^{+2} [8].

هناك ثلاثة متناظرات للفوسفاتيز القاعدي ALP في الثديات وتتضمن المتناظر المعوي Intestinal isoenzyme (IALP) والموجود في الغشاء المخاطي للامعاء والمتناظر المشيمي Placental isoenzyme (PALP) والذي يظهر في دم النساء عند الثلث الاخير من فترة الحمل او يظهر هذا المتناظر في الخلية التناسليةGerm-cell ALP و المتناظر غير المتخصص للانسجة (TNSALP) Tissue – nonspecific isoenzyme ويظهر في العظام والكبد والكلية والرئتين وكريات الدم البيض[4]. وقد استعملت عدة طرق لتنقية انزيم الفوسفاتيز القاعدي حيث تمت تنقيته لاول مرة بالاعتماد على طريقة التجزئة والترسيب بواسطة الاسيتون من امعاء العجل بدرجة تنقية عالية[9]. واجريت تنقية الانزيم من بكتريا *Rhizobium* باضافة تراكيز من كبريتات الامونيوم بنسبة (65 – 40)%[10] وبعدة خطوات للفصل تمت تنقية ALP من الاورام المنوية Human seminomas بدرجة نقاوة جيدة[11]. وتمكن الباحث Guimaraes وجماعته (2007) من تنقية ALP من *Aspergillus caespitosus* بواسطة تقنيات الفصل الكروماتوغرافي[12]. وفي دراسة سابقة تم فصل متناظرات ALP من لعاب مرضى داء السكر ودُقي المتناظر الغير متخصص للانسجة من هؤلاء المرضى[13] .

ولانزيم ALP تطبيقات مهمة في المجالات الطبية فقد لوحظ الارتفاع العالي لمستواه في سرطان القولون المستقيم الانبثاثي مما جعله مؤشرا رئيسيا سهل وفعال لتشخيص المرض[14] . وبينت الدراسات الارتفاع المعنوي لـ BALP (Bone alkaline phosphatase) في امصال مرضى سرطان الثدي والبروستات اذ له دور مكمل في التشخيص المبكر[15،16] . يرتبط ارتفاع مستوى الفوسفاتيز القاعدي بتناول بعض العقاقير، مثلا العلاج المضاد للصرع Anti-epilepsy اذ له بعض المضاعفات على العظام وايض فيتامين D وبذلك يسبب هذا العقار ارتفاع مستوى الفوسفاتيز القاعدي بمرتين عن الطبيعي وحدوث نقص في فيتامين D[17]. ووجد ارتفاع مستواه في دم[18] ولعاب[13] المصابين بداء السكر. ولايجاد الظروف المثلى لعمل ALP و متناظره المنقى فقد شملت الدراسة الحالية بعض الخواص الحركية للانزيم و المتناظر

المنقى من لعاب مرضى داء السكر وذلك لاهمية هذا الانزيم في الحفاظ على بنية العظم .

المواد وطرائق العمل

جمع اللعاب *Saliva collection*

جمعت عينات اللعاب في الصباح بعد (30 – 60) دقيقة على الاقل من الافطار، اذ تم جمعها دون تحفيز عن طريق البصاق وتم وضعه في اوعية بلاستيكية مغطاة ومدرجة ، حفظت العينات في 5°م .

تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في اللعاب

استعملت طريقة Kind & King (1954)[19] في تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في اللعاب المتضمنة اضافة فوسفات الفنيل وهي المادة الاساس لعمل الانزيم ليتحرر الفينول نتيجة تأثير الانزيم على المادة الاساس وبالتالي يتكون معقد الكوينون الاحمر اللون اذ تتناسب شدة اللون طرديا مع فعالية الانزيم.

قياس تركيز البروتين لأنزيم ALP

اتبعت طريقة لوري Lowry method [20] لقياس تركيز البروتين في اللعاب او الجزء الناضح وبإستعمال البومين مصل البقر Bovin serum albumin (BSA) كبروتين قياسي.

الدراسات الحركية لمتناظر انزيم الفوسفاتيز القاعدي

بعد فصل متناظرات انزيم ALP من لعاب مرضى داء السكر بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام الراتنج DEAE – Cellulose A50 وتنقية المتناظر الاول (الغير متخصص للانسجة TNSALP) بطريقة الترشيح الهلامي[13] ، تم دراسة الصفات الحركية للمتناظر المذكور ، وشملت هذه الدراسات:

1. تأثير تركيز المادة الاساس Disodium phenyl phosphate (DPP) وايجاد الثابت Km

تم دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمادة الاساس DPP على فعالية انزيم ALP ، اذ استعملت التراكيز (4 , 6 , 8 , 10 , 12 , 14) ملي مولار لايجاد تركيز المادة الاساس الامثل لعمل انزيم ALP حيث تم قياس سرعة تفاعل ALP ،ومن رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الاساس تم معرفة التركيز الامثل الذي تصل عنده سرعة التفاعل قيمتها العظمى V_{max}.

و تم الحصول على قيم Km باستعمال طريقة لينوفر – بيرك البيانية والتي تربط بين القيم العكسية لكل من السرعة وتركيز DPP (1/[S] vs. 1/v)

2. تعيين درجة الاس الهيدروجيني الامثل

دُرس تأثير الاس الهيدروجيني للمحلول المنظم (Sodium carbonate – Bicarbonate) على سرعة تفاعل متناظر الفوسفاتيز القاعدي ، اذ استعملت محاليل ذات pH مختلفة (8.5 , 9 , 9.5 , 10 , 10.5 , 11) بوجود المادة الاساس DPP بتركيز 10mM ودرجة حرارة 37 °م ، و تم تعيين pH الامثل من خلال رسم العلاقة بين سرعة التفاعل والاس الهيدروجيني.

ودُرس تأثير الاس الهيدروجيني على قيمة الثابت K_m وذلك بإستعمال قيم مختلفة للاس الهيدروجيني (9 , 9.5 , 10 , 10.5) وبدرجة حرارة 37 °م بوجود تراكيز مختلفة منDPP المادة الاساس لانزيم الفوسفاتيز القاعدي (6 , 8 , 10) ملي مولار ، اذ استعمل رسم لينوفير – بيرك لحساب قيمة ثابت K_m ، بعد ذلك رسمت العلاقة بين قيم pk_m التي تم الحصول عليها والاس الهيدروجيني لايجاد قيمة pK_a.

3. تأثير درجة الحرارة Effect of temperature

تم اجراء التفاعل في درجات حرارية مختلفة (7 , 17 , 27 , 37 , 47 , 57)°م بوجود المحلول المنظم (Sodium carbonate – Bicarbonate) ذو pH 10 وتركيز المادة الاساس(DPP) 10mM، ومن ثم رسمت العلاقة بين سرعة التفاعل ودرجة الحرارة.

وتمت دراسة تأثير درجة الحرارة على قيمة الثابت k_m باستعمال درجات حرارية مختلفة (17, 27, 37, 47)°م خلال فترة حضن (15) دقيقة لمعقد الانزيم ومادته الاساس بوجود المحلول المنظم (Sodium carbonate – Bicarbonate) ذي الاس الهيدروجيني pH 10 وباستعمال تراكيز مختلفة من المادة الاساس DPP (6 , 8 , 10) ملي مولار، ومن خلال رسم لينوفير – بيرك تم التعرف على قيم V_{max} وK_m عند كل درجة حرارية . وبالاعتماد على المعادلات ذات العلاقة تم الحصول على قيمة طاقة التنشيط Ea ومعامل درجة الحرارة Q_{10}.

4. تأثير الزمن على فعالية انزيم ALP

تم دراسة تأثير الفترة الزمنية لحضن مزيج التفاعل على فعالية انزيم ALP باستعمال تركيز 10mM من المادة الاساس DPP وبفترات زمنية (0 , 5 , 10 , 15 , 25 , 30) دقيقة وبدرجة حرارة 37 °م وبوجود المحلول المنظم (Sodium carbonate – Bicarbonate) ذي pH 10 وبرسم العلاقة بين فعالية الانزيم والزمن تم التعرف على تأثير الزمن على سرعة تفاعل الانزيم.

5. تأثير الايونات المعدنية وEDTA على متناظر ALP

تمت دراسة تأثير بعض الايونات على فعالية متناظر ALP وخصوصا التي لها تأثير تحفيزي او تثبيطي كالكوبلت Co^{+2} والمغنيسيومMg^{+2} والنيكلNi^{+2} والخارصينZn^{+2} والنحاسCu^{+2} و EDTA ، اذ استعملت التراكيز (1 , 3 , 5 , 10) ملي مولار وتم التفاعل بوجود محلول الكاربونات – البيكاربونات المنظم ذي الاس الهيدروجيني 10 ، وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط او التحفيز لهذه الايونات وEDTA .

6. تأثير بعض الاحماض الامينية على متناظر ALP

دُرس الاثر الذي احدثته التراكيز المختلفة لبعض الاحماض الامينية (Leu., Phe. ,Cys. , Trp.) على فعالية متناظر ALP ، اذ استعملت التراكيز (1 , 3 , 5) ملي مولار، وحسبت نسبة تثبيط الاحماض الامينية المذكورة على فعالية ALP . كذلك تم دراسة تأثير التثبيط لكل من .Cys و .Trp باستعمال التراكيز (1 , 3 , 5) ملي مولار مع استعمال تراكيز مختلفة من DPP (4 , 6 , 8 , 10 , 12)

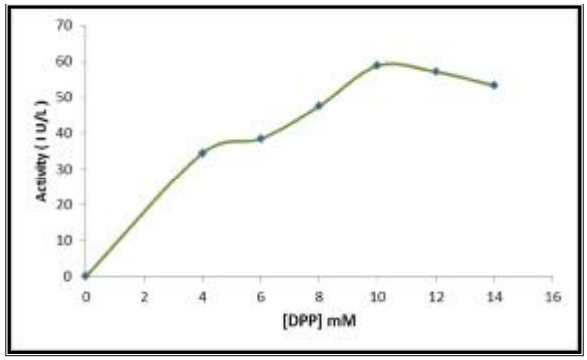
ملي مولار ، وتم التفاعل بوجود المحلول المنظم كاربونات – بيكاربونات الصوديوم ذي pH 10.

النتائج والمناقشة

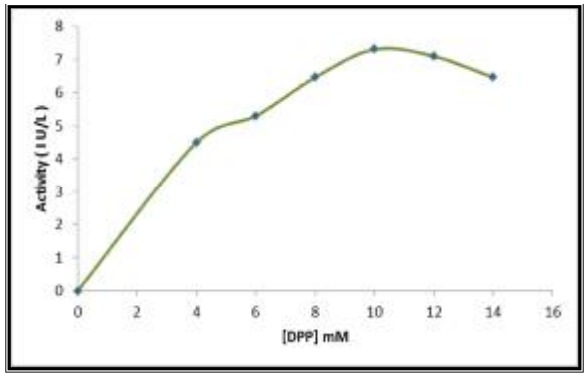
الخواص الحركية لمتناظر انزيم ALP المنقى من لعاب مرضى داء السكر

1. التركيز الامثل للمادة الاساس DPP وايجاد K_m

تم دراسة تأثير تركيز المادة الاساس Disodium phenyl phosphate على سرعة التفاعل الانزيمي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي اللعابي والانزيم المنقى جزئيا المفصول من عمود sephadex G100 وايجاد التركيز الامثل للمادة الاساس DPP حيث توضح الشكلين (1) و (2) للانزيم ومتناظره ارتفاعا في سرعة التفاعل مع ارتفاع تركيز DPP لحين الوصول الى السرعة القصوى عند التركيز (10mM) وبعدها تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض عند التراكيز العالية (التراكيز الاعلى من التركيز الامثل للمادة الاساس) لحدوث التثبيط . ويتضح من الاشكال المشار لها اعلاه ان الانزيم اللعابي ومتناظره يخضعان لمعادلة ميكاليس – منتن حيث الشكل الناتج هو زائدي المقطع ، وهذا يتفق مع ماتوصلت له الشريفي (2000)[18] كذلك يشابه ماتوصل له Mahesh وجماعته (2010)[21] اللذي استخدم المادة الاساس paranitro phenol phosphate.

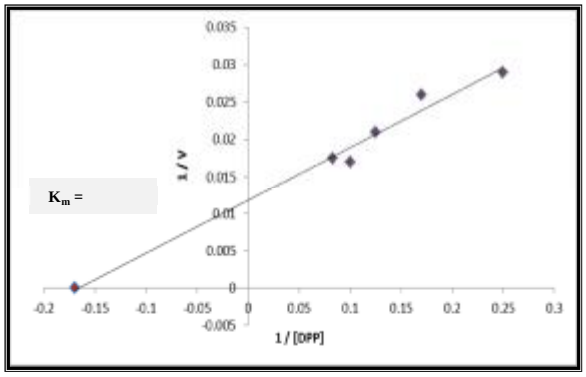


الشكل (1): تأثير تركيز المادة الاساس على فعالية الانزيم اللعابي عند مرضى داء السكر

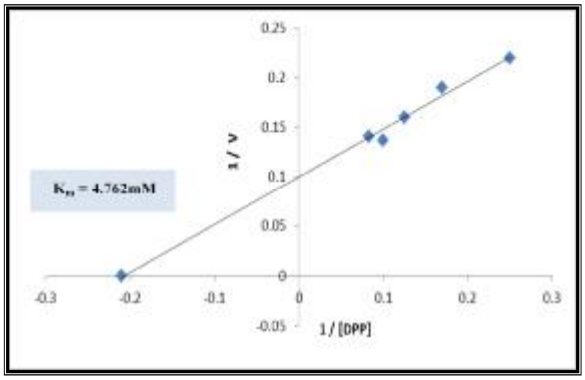


الشكل (2): تأثير تركيز المادة الاساس على فعالية متناظر ALP اللعابي المنقى عند مرضى داء السكر

وقد تم اتباع الطريقة الخطية لينوفير – بيرك في حساب قيمة K_m للانزيم في اللعاب ومتناظره المنقى بطريقة الترشيح الهلامي ، فالاشكال (3) و(4) توضح قيم K_m حسب الطريقة المذكورة (1/v vs 1/[s]) والتي كانت مساوية لـ 5.88 ملي مولار للانزيم في لعاب مرضى داء السكر و4.762 ملي مولار لمتناظره المنقى. بينما كانت قيمة K_m مساوية لـ3.84×10^{-3} مول/لتر في امصال مرضى داء السكر[18] ولم تشر الادبيات الى دراسات حركية سابقة للانزيم اللعابي بينما هنالك العديد من المصادر مثلا كانت قيمة K_m لانزيم ALP في العصيات الدقيقة KIBGE-HAS مساوية لـ 2.74 ملي مولار[22].



الشكل(3): رسم لينوفير – بيرك لحساب K_m انزيم ALPفي لعاب مرضى داء السكر

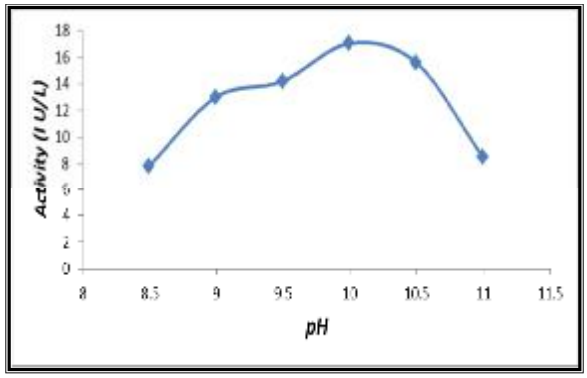


الشكل(4): رسم لينوفير – بيرك لحساب K_m لمتناظرانزيم ALP المنقى

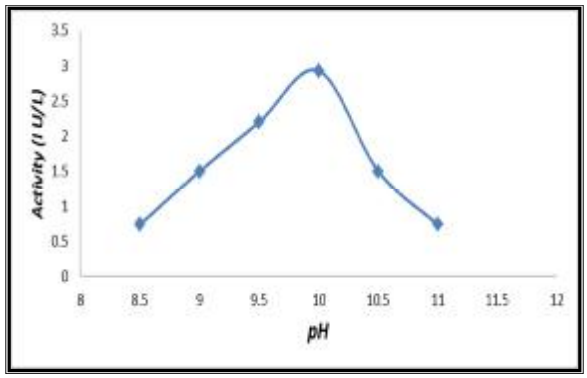
2. تأثير الاس الهيدروجيني على سرعة تفاعل انزيم ALP ومتناظره وعلى الثابت K_m

تؤثر درجة الاس الهيدروجيني على الفعالية الانزيمية نتيجة لإختلاف طبيعة الانزيم وتركيبه الكيميائي اضافة الى وجود المجاميع الايونية المتعددة التي يحملها الانزيم[23] حيث تعمل الانزيمات في درجة pH مثلى لانها حساسة جدا الى التغير بتركيز ايون الهيدروجين H^+[24]. اذ تبين عند استخدام درجات مختلفة من الاس الهيدروجيني للمحلول المنظم (كاربونات – بيكاربونات) المستعمل في تفاعل انزيم ALP ومتناظره ارتفاعاً في سرعة التفاعل مع ارتفاع درجات الاس الهيدروجيني لحين الوصول الى السرعة القصوى عند pH الامثل والذي كان عند pH 10 بعدها انخفضت فعالية الانزيم ومتناظره عند درجات pH اعلى من 10 حيث الزيادة في pH تؤدي الى التنافر الكهربائي الداخلي او فقدان الشحنة الكهربائية الداخلية على جانب

سلاسل الاحماض الامينية الناتجة من فتح جزيئة البروتين المكون للانزيم وبذلك يصبح الانزيم غير قادر على تكوين معقد انزيم – مادة اساس (ES)[22]. وتوضح الشكلين (5) و (6) العلاقة بين سرعة التفاعل والدرجات المختلفة للاس الهيدروجيني لكل من الانزيم في اللعاب ومتناظره عند مرضى داء السكر على التوالي ، وان ماتم التوصل اليه يتطابق مع ماتوصل له الشريفي (2000)[18] و Raimi وجماعته (2011)[25].



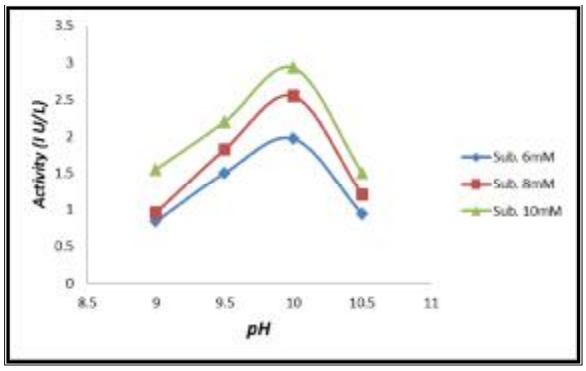
الشكل (5): تأثير الاس الهيدروجيني على فعالية الانزيم اللعابي عند مرضى داء السكر



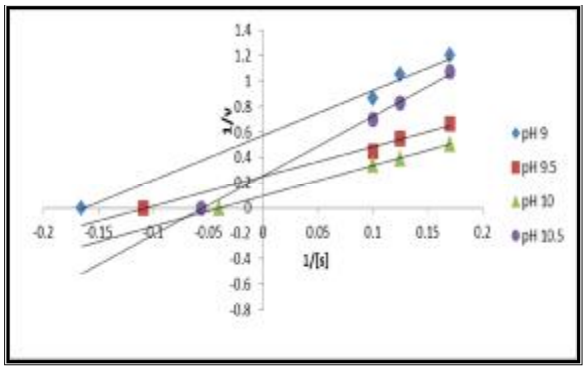
الشكل (6): تأثير الاس الهيدروجيني على فعالية متناظرالانزيم اللعابي المنقى عند مرضى داء السكر

بينما اظهرت نتائج الباحثانMarhova و Kostadinova (2010) ان pH الامثل لانزيم ALP المنقى من *Bacillus cereus* هي 9.5 باستعمال المحلول المنظم Tris-HCl و – glycine NaOH[26] ، اما pH الامثل للانزيم في *Bacillus spp.* فقد كانت (8.8) في دراسة Mahesh وجماعته (2010)[21] .

يوضح الشكل (7) تأثير التغير في الاس الهيدروجيني على فعالية متناظر انزيم ALP اللعابي عند مرضى داء السكر عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس (DPP) ومن خلال معادلة لينيوفير – بيرك برسم العلاقة بين (1/v vs. 1/[s]) كما يوضحها الشكل (8) تم حساب قيم K_m عند درجات مختلفة من الاس الهيدروجيني حيث ان ثابت ميكاليس – منتن يتأثر بتغير الاس الهيدروجيني.

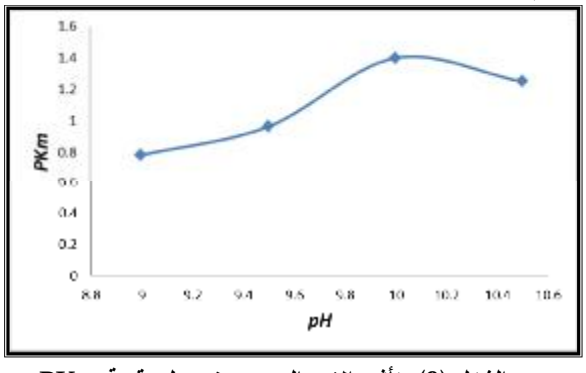


الشكل(7): تأثير الاس الهيدروجيني على فعالية متناظرالانزيم المنقى من مرضى داء السكر عند تراكيز مختلفة للمادة الاساس



الشكل (8): تأثير الاس الهيدروجيني على قيمة الثابت ميكاليس – منتن لمتناظر الانزيم المنقى

وبرسم العلاقة بين قيم log K_m مقابل الاس الهيدروجيني تم ايجاد قيمة pK_a التي تمثل قيمة الاس الهيدروجيني للحوامض الامينية الموجودة في المواقع النشطة لمتناظر الانزيم المفصول حيث بلغت قيمته (10.1) والشكل (9) يوضح ذلك . وتدل قيمة ثابت التفكك التي تم الحصول عليها تعود لمجموعة الامين الموجودة في الحامضين الامينيين Aspartic acid و Serine التي تتراوح قيم pK_a لهما بين (10.3-9.2) وهذا يعني وجود .Asp و .Ser في المركز النشط للانزيم.

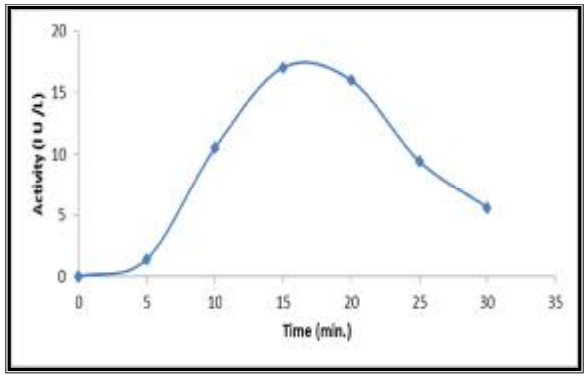


الشكل (9): تأثير الاس الهيدروجيني على قيمة PKm لمتناظر ALP المنقى

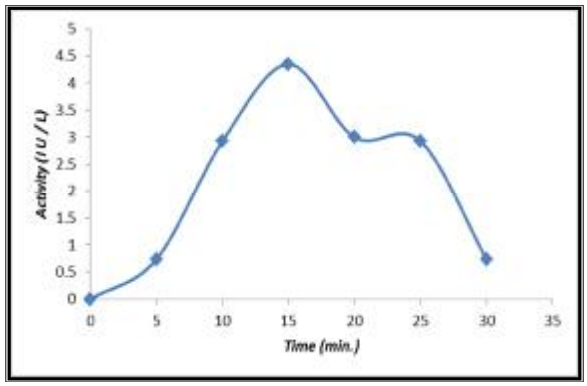
3. تأثير زمن التفاعل على فعالية الانزيم

تمت دراسة تأثير زمن التفاعل على فعالية الانزيم ومتناظره المنقى من خلال حضن الانزيم مع مادته الاساس في درجة حرارة 37°C

لفترات زمنية مختلفة (0 , 5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30) دقيقة عند pH 10 حيث اظهرت النتائج ارتفاعاً في فعالية الانزيم مع زيادة فترة الحضن ولوحظ اقصى فعالية للانزيم عند 37°C بعد فترة حضن لمزيج التفاعل الانزيمي لمدة (15) دقيقة وبعد انقضاء فترة 15 دقيقة بدأت فعالية الانزيم بالانخفاض كما توضحها الشكلين (10) و (11) للانزيم ومتناظره المنقى على التوالي ، وقد يكون ذلك بسبب الطبيعة الحرارية المنسوبة للانزيم



الشكل (10): تأثير الزمن على سرعة تفاعل انزيم ALP في لعاب مرضى داء السكر



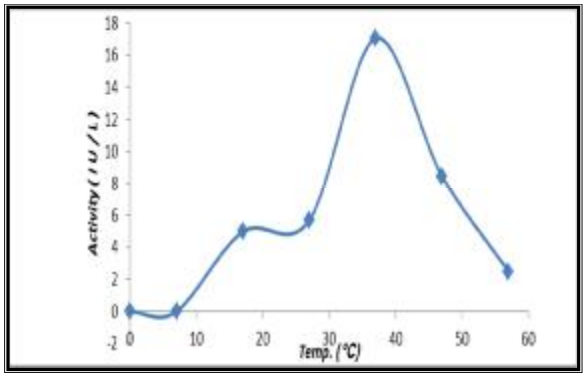
الشكل (11): تأثير الزمن على سرعة تفاعل متناظرانزيم ALP المنقى من لعاب مرضى داء السكر

حيث كلما زاد الوقت تبدأ درجة الحرارة بكسر الاواصر بين اثنين من الاحماض الامينية . وقد اتفقت نتائجنا لزمن استقرار الانزيم مع الباحث Raimi وجماعته (2011)[25] ، اما Ul Qader وجماعته (2009) فقد اظهرت نتائجهم ان اقصى نشاط يصل له الانزيم عندما تكون فترة حضن المعقد ES لمدة (20) دقيقة[22] بينما اعطت نتائج Mahesh وجماعته (2010) ان فترة الحضن المثلى لمعقد التفاعل هي (30) دقيقة[21].

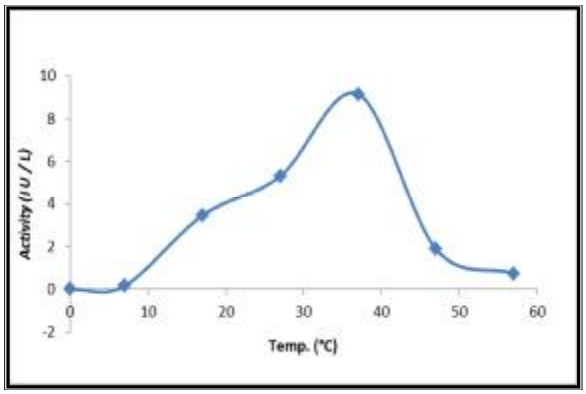
4. تأثير درجة الحرارة على فعالية الانزيم

تمتلك الانزيمات درجة حرارة مثلى (تساوي او اعلى او اقل بقليل) من درجة حرارة الخلية التي تحويها ، اذ تزداد سرعة التفاعل الانزيمي بارتفاع درجات الحرارة حتى تصل الدرجة المثلى للتفاعل بعدها تبدأ بالانخفاض تدريجيا ويعزى ذلك لحصول عملية مسخ او اتلاف جزيئة الانزيم حيث يعمل ذلك على خفضاو فقدان فعالية الانزيم ويُفسر هذا الانخفاض من خلال تأثير درجات الحرارة العالية الى حالة التأين للمجاميع الموجودة على سطح الانزيم ومادته الاساس ولكون الانزيمات جزيئات بروتينية معقدة يتأثر نشاطها التحفيزي في التركيب البنائي الثلاثي المنتظم لذا فارتفاع درجات الحرارة يعمل على تغير الشكل الهندسي والطبيعي للانزيم مما يسبب فقدان الانزيم لنشاطه[18].

وقد اوضحت النتائج ارتفاع سرعة التفاعل لانزيم ALP ومتناظره مع زيادة درجة الحرارة وكانت اقصاها عند الدرجة الحرارية 37 °م والشكلين (12) و (13) يوضحان تأثير درجات الحرارة على الانزيم ومتناظره على التوالي. وهذه النتائج تتفق مع ماتوصلت له الشريفي (2000) بالنسبة للدرجة المثلى لعمل الانزيم في مصل الدم[18] و Ul Qader وجماعته (2009)[22] ووجد Kumar وجماعته (2008) ان درجة الحرارة المثلى لعمل ALP في بكتريا *Rhizobium* تقترب من 37 °م[10] اما الدرجة المثلى لعمل ALP في *Rhizopodiformis* هي 65 °م[7] ، وبينت نتائج Njoku وجماعته (2011) ان درجة الحرارة المثلى لعمل انزيم الفوسفاتيز القاعدي في كبد الارنب هي 45 °م[27].

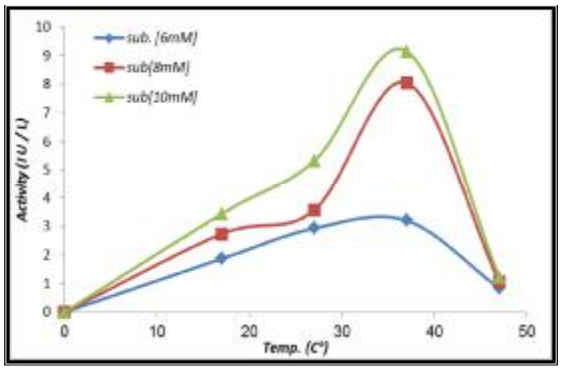


الشكل (12): تأثير درجة الحرارة على سرعة تفاعل انزيم ALP في لعاب مرضى داء السكر



الشكل (13): تأثير درجة الحرارة على سرعة تفاعل متناظرانزيم ALP المنقى

وتم تعيين الثوابت الثرموداينيميكية كطاقة التنشيط Energy of (Ea) activation ومعامل درجة الحرارة Q_{10} لمتناظر ALP اللعابي المنقى من خلال دراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة وبوجود تراكيز مختلفة من المادة الاساس DPP إذ تبين ان سرعة التفاعل الانزيمي V_{max} تبلغ اقصاها عند الدرجة الحرارية 37 °م وتركيز (10mM) التركيز الامثل للمادة الاساس ويوضح ذلك الشكل (14).

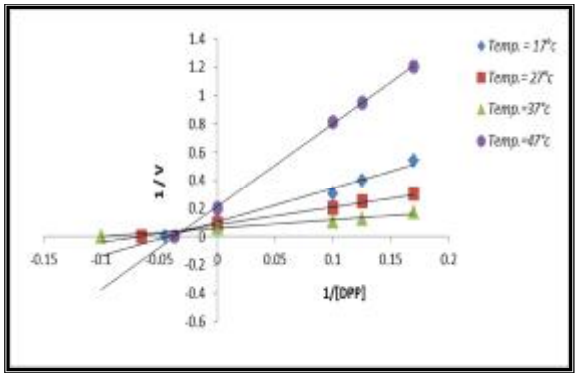


الشكل (14): تأثير درجة الحرارة على سرعة تفاعل متناظرانزيم ALP المنقى عند تراكيز مختلفة من المادة الاساس

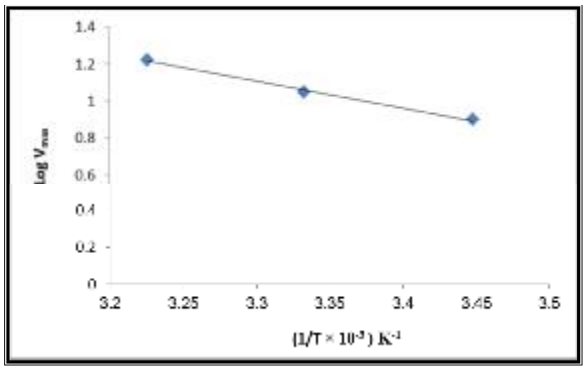
وتم الحصول على قيم الثابت K_m عند درجات حرارية مختلفة المبينة في الجدول (1) علاوة الى السرعة القصوى للتفاعل V_{max} من خلال رسم لينوفير – بيرك كما يوضحها الشكل (15). ومن رسم العلاقة بين لوغاريتم السرعة القصوى V_{max} لمتناظر ALP اللعابي المنقى ضد معكوس درجة الحرارة المطلقة وجد ان الانزيم المنقى يخضع لعلاقة ارينوس حتى درجة 37 مْ حيث اعطى خطاً مستقيماً كما موضح في الشكل (16) . وهذه النتائج جاءت مطابقة لما حصل عليه الشريفي (2000)[18] و Njoka (2011)[27] لمصل دم المصابين بداء السكر وكبد الارنب على التوالي.

الجدول (1): قيم K_m لمتناظر انزيمALP المنقى عند درجات حرارية مختلفة

Temp. °c	K_m mM (1/v vs. 1/[s])
17	22.22
27	15.385
37	10
47	27.03



الشكل (15): رسم لينويفير – بيرك لمتناظرانزيمALPالمنقى عند درجات حرارية مختلفة



الشكل (16): رسم ارينوس لمتناظرانزيم ALP اللعابي المنقى

ومن خلال رسم العلاقة اعلاه فقد تم حساب طاقة التنشيط Ea للتفاعل وذلك من ميل الخط البياني في الشكل (16) [$\log V_{max}$ vs. $1/T \times 10^{-3}$] والمتمثل بالمعادلة[28]:

$$\text{Log } K = -Ea / 2.3R \cdot 1/T + \log A$$
$$\text{Slope} = -Ea / 2.3R$$

إذ بلغت طاقة التنشيط (Ea) = 17.785 KJ.mol^{-1} ، اما عند الشريفي(2000) فقد كانت طاقة تنشيط متناظرات ALP المفصولة من مصل مرضى داء السكر تتراوح بين .cal/mol(- 4326 2770.5)[18] ، ووصلت طاقة تنشيط الانزيم في حليب الابقار KJ/mol(222 – 214.09) [29] بينما الصالح (2003) وجد ان طاقة تنشيط ALP في سم ثعبان الصل الاسود تبلغ 6263cal/mol[30] في حين بلغت 15.23KJ/mol لانزيم كبد الارنب[27].

اما معامل درجة الحرارة (Q_{10}) Temperature coefficient والذي يمثل العامل الذي يزيد من معدل سرعة التفاعل الانزيمي بارتفاع درجة الحرارة 10 °م ، فقد تم حسابه من خلال المعادلة ادناه:

$$Ea = 2.3R(T_1 \times T_2) \times \log Q10 / 10$$

وقد بلغت قيمة Q_{10} لمتناظر الانزيم المنقى (1.11). ان قيم معامل درجة الحرارة Q10 للتفاعلات الانزيمية تقع بين (1-2)[28] لذلك فان القيمة التي تم ايجادها تقع ضمن مدى التفاعلات الانزيمية ، وقد كانت قيمته عند الشريفي (2000) مساوية لـ 1.55[18] وعند الصالح (2003)عن دراسته لانزيم ALP في سم الصل الاسود (كوبرا الصحراء) مساوية لـ1.44[30].

5. تأثير الايونات المعدنية والاحماض الامينية على متناظر ALP المنقى

1.5. تأثير الايونات المعدنية وEDTA

تعد الدراسات التثبيطية والتنشيطية بواسطة الايونات انموذجاً من الوسائل المستعملة في علم الانزيمات لمعرفة المراكز النشطة على سطح الانزيم . حيث توضح ميكانيكيات تأثير هذه الايونات المعدنية على فعالية الانزيم من خلال تكوينها جسور بين الانزيم ومادته الاساس او احداث تغيرات في تركيب الانزيم مما يساعد في عملية التنشيط او التثبيط لذلك الانزيم[31].

لذلك تمت دراسة تأثير بعض الايونات (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2}) وكذلك العامل الكلابي EDTA على فعالية متناظر انزيم ALP المفصول والمنقى من لعاب مرضى داء السكر ، فقد تم استخدام عدة تراكيز لهذه الايونات (1 , 3 , 5 , 10) ملي مولار مضافة لمزيج التفاعل الانزيمي الحاوي على 10mM من المادة الاساس DPP والمحلول المنظم Carbonate-Bicarbonate ذو الاس الهيدروجيني 10 ، اذ اظهرت الايونات Co^{+2} و Mg^{+2} و Ni^{+2} تأثيرا تنشيطيا للانزيم عند التراكيز المذكورة وكانت اعلى نسبة تنشيط عند التركيز 10mM (67.797% , 52.55% , 69.95%) للايونات Co^{+2} و Mg^{+2} و Ni^{+2} على التوالي كما يوضحها الجدول (2)، ان ماتم التوصل اليه يتفق مع Ying وجماعته (2009)[32]. وتم اقتراح حدوث تفاعل قوي بين الايون المعدني والانزيم لإمتلاك ALP بعض المعادن المرتبطة بالموقع النشط عند دراسة تأثير الايونات المعدنية على فعالية ALP في *Rhizobium sp.*[10] .

الجدول (2): النسبة المئوية لتنشيط متناظر ALP المنقى بواسطة الايونات المعدنية عند تراكيز مختلفة

Metal ion	*Activation %*			
	1mM	*3mM*	*5Mm*	*10mM*
Co^{+2}	46.96	47.38	54.92	67.797
Mg^{+2}	0.901	10.28	49.91	52.55
Ni^{+2}	33.212	33.232	64.630	69.95

اما الايونين Zn^{+2} و Cu^{+2} فقد اظهرا تأثيراً تثبيطياً للانزيم حيث كانت اعلى نسبة تثبيط عند التركيز 10mM لـ Zn^{+2} بنسبة تثبيط (55.64%) و Cu^{+2} بنسبة تثبيط (77.82%) كما موضحة بالجدول (3). واتفقت نتائج Zn^{+2} مع Yan وجماعته (2003) حيث عزى حدوث التثبيط لتكوين معقد بين Zn^{+2} والمادة الاساس[33] ، اما في دراسة Kostadinova و Marhova (2010) فقد اتفقت نتائجهما في تثبيط الانزيم بواسطة Cu^{+2} اما Zn^{+2} فلم يظهر تأثيراً على الانزيم[26] .

الجدول (3): النسبة المئوية لتثبيط متناظر ALP المنقى بواسطة الايونات المعدنية و EDTA عند تراكيز مختلفة

Metal ion	*Inhibition %*			
	1mM	*3mM*	*5mM*	*10mM*
Zn^{+2}	11.273	22.364	44.55	55.64
Cu^{+2}	11.273	55.61	66.67	77.82
EDTA	11.3	55.64	77.83	88.152

ان ALP من الانزيمات المعتمدة على المعادن metalo-dependent لذلك انخفض نشاطه عند اضافة EDTA الى مزيج التفاعل الانزيمي لارتباط EDTA مع الايونات المعدنية Zn^{+2} و Mg^{+2} الموجودة في الموقع النشط للانزيم وتكوين معقد كلابي Chelating complex بين EDTA وايونات Zn^{+2} و Mg^{+2} وقد كان تثبيط الانزيم عند التركيز 10mM بنسبة (88.152%) وان هذه النتائج تطابق ماجاء في الدراسات السابقة حيث ثبط العامل الكلابي EDTA انزيم الفوسفاتيز القاعدي في *Aspergillus caespitosus*[12] ، اضافة لذلك فان ماتم التوصل اليه يشابه ماتوصل له Junior وجماعته (2008)[7] و Mahesh وجماعته (2010)[21]. وقد اقترح Wang وجماعته (2001) ان تثبيط ALP المعوي يحدث بميكانيكية المعقد التنافسي حيث يتكون المعقد (انزيم – EDTA) الذي يؤدي الى تغيير هيئة الانزيم بإزاحة Zn^{+2} من الانزيم[34].

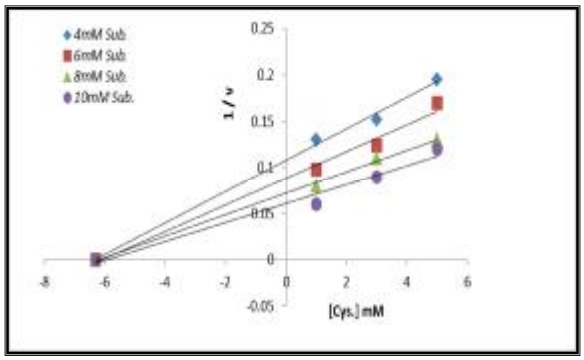
2.5. تأثير الاحماض الامينية

تم دراسة تأثير بعض الاحماض الامينية على سرعة تفاعل متناظر انزيمALP المنقى جزئيا من لعاب مرضى داء السكر حيث عملت الاحماض الامينية (Leu. , Phe. , Trp. , Cys.) بتراكيز (1 , 3 , 5) ملي مولار على تثبيط متناظر الانزيم بنسب تثبيطية متفاوتة حيث كانت اعلى درجة للتثبيط عند التركيز 5mM بنسبة تثبيطية (50.02% , 58.802% , 65.9% , 86.4%) للاحماض Phe. و Trp.و Leu. و Cys. على التوالي ، ويوضح الجدول (4) نسبة تثبيط الاحماض الامينية اعلاه في التراكيز المذكورة. ان ماتم التوصل اليه يشابه ماجاء في دراسة مقارنة 5´-nucleotidase و ALP في مشيمة الانسان اثناء التطور حيث ثبطت الاحماض الامينية Phe و Trp. و Leu. بقوة انزيم ALP[35]، اما بالنسبة لتثبيط متناظر الانزيم بواسطة الحامض الاميني Cys. فانه يتفق مع ماتوصل له Kannampuzha وجماعته (2009)[36].

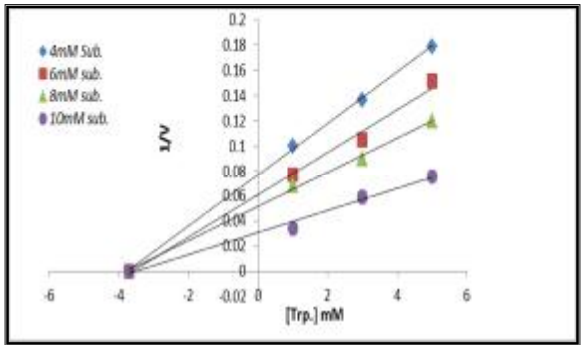
الجدول (4): النسبة المئوية لتثبيط متناظر ALP المنقى بواسطة الاحماض الامينية عند تراكيز مختلفة

Amino acid	*Inhibition %*		
	1mM	*3mM*	*5mM*
Cys.	49.3	68.178	86.4
Leu.	61.37	63.676	65.9
Phe.	36.371	45.452	50.02
Trp.	13.7	47.72	58.802

ولتحديد نوع التثبيط الذي يسببه الحامضين الامينيين Cys. و Trp. لانزيم ALP المنقى من لعاب مرضى داء السكر ، فقد تم دراسة تأثير هذين الحامضين من خلال استعمال تراكيز مختلفة من Cys. و Trp. مع تراكيز مختلفة من المادة الاساس DPP ومن خلال رسم Dixon الذي يوضح رسم العلاقة بين 1/v مقابل تركيز المثبط [I] والموضحة في الشكلين (17) و (18) فقد اتضح ان كل من الحامضين Cys. و Trp. يعملان كمثبطات غير تنافسية Non-competitive inhibition حيث K_m يبقى ثابتا بينما تنخفض السرعة القصوى V_{max} .



الشكل (17): رسم Dixon لتثبيط متناظرانزيم ALP اللعابي المنقى بواسطة.Cys



الشكل (18): رسم Dixon لتثبيط متناظرانزيم ALP اللعابي المنقى بواسطة.Trp

وقد بلغت قيمة ثابت التثبيط K_i باستعمال Cys. (6.3mM) أما قيمته مع المثبط Trp. فكانت (3.7mM) . بينما توصل Qiao وجماعته (2003) ان الـ Cys. يثبط انزيمALP تثبيطا تنافسيا competitive inhibition حيث بلغ ثابت التثبيط 0.15mM[37] ، وبتثبيط لاتنافسي uncompetitive inhibition في دراسة So وجماعته (2007)[38].

المصادر:

1. Martins, M. J., Negrao, M. R. and Hipolito-Reis, C. *Clin. Biochem*.; 34 , 6 (2001) : 463 – 468.
2. Holander, V. P. Acid phosphatase In enzymes. P.D. Boyer Ed. Academic press, New York, Vol.4, 1971, pp. 450 – 498.
3. Dhakad, R. K., Alam, S. I., Dixit, A. and Singh, L. *Enzyme and Microbiol Technology*; 36 (2005): 855 – 861.
4. Moss, D. W. *Clin. Chem*.; 28 (1982):2007 – 2016.
5. Corathers, S. D. *Pediatrics in Rev*iew; 27 (2006):382 – 384.
6. Sowadaki, J. M., Handschumacher, M. D., Murthy, K., Foster, B. A. and Wyckoff, H.W. *J. Mol. Biol*.; 186 (1985): 417 – 433.
7. Junior, A. B., Guimaraes, L. H. S., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Leone, F. A. and Polizeli, M. L. T. M. *Folia microbial*; 53 (2008): 509 – 516.
8. Kim, E. E. and Wychoff, H. W. *J. Mol. Biol*.; 218(1991):449 – 464.
9. Morton, R. K. *Biochem*. J. ; 57 (1954): 595 – 603.
10. Kumar, M., Kour, P.P. and Ganjewala, D. *Research Journal of Microbiology* ; 3 , 3 (2008): 157 – 162.
11. Yamamoto, T. and Katsuoka, Y. *Tokai J. Exp. Clin. Led*.; 23,4 (1998): 199 – 207.
12. Guimaraes, L. H. S., Junior, A. B., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M. *Folia Microbiol*; 52 , 3 (2007) :231 – 236.
13. Al-Salihi, F. G., Yaseen, A. I., Najy, N. A. *Kerbala Journal of pharmaceupical Science*; 2 (2011): 279 – 289.
14. Maisano, R., Azzarello, D., Medico, P., Maisano, M., Bottari, M., Egitto, G. and Nardi, M. *Tumori*; 97(2011): 39 – 42.
15. Chen, S. S., Chen, K. K., Lin, A. T. L., Chang, Y. H., Wu, H. H. H., Chang, L. S. *J. Chim. Med. Assoc*.; 72, 6 (2009): 301 – 306.
16. Usoro, N. I., Omabbe, M. C., Usoro, C. A., Nsonwu, A. *Afr. Health Sci*.; 10,1 (2010): 9 – 13.
17. Doost, Z. K., Moayyeri, H., Khosroshahi, N., Molatefi, R. *TUMJ*.; 68, 10 (2011): 590 – 594.
18. غسق عبدالجبار، الشريفي "دراسة كيميائية حياتية للفوسفاتيز القاعدي الكلي والفوسفاتيز القاعدي ذي الوزن الجزيئي العالي المنقى من امصال الاشخاص المصابين بداء السكري" رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات/ جامعة تكريت(2000).
19. Kind, P.R. and King, E.G. *J. Clin. Path*.; 7(1954): 322 – 326.
20. Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L. and Randall, J. *J. Biol. Chem*.; 193(1951): 265 – 275.
21. Mahesh, M., Neha, G., Rajesh, T. S., Somashekhar, R. and Puttaiah, E. T. *JABPT*.; I,1 (2010): 21 – 33.
22. Ul Qader, S. A., Iqbal, S. and Niazi, Z. *Inter. J. of Microbiology*; 7,1 (2009).
23. Cairyfa, V. R., Gill, D., Parola, A. H. *Biophys. Chem*.; 70,1 (1998): 41 – 56.
24. George, J. and Losos, J. "The living world" 6th ed. (2010) New York , NY.:MC Graw-Hill.
25. Raimi, O. G., Fatai, A. A., Bankole, H. A., Olaitan, S. N., Fajana, O. O., Kazeem, M. I. and Akabada, K. A. *J. Cell Tissue Research*; 11,1 (2011): 2485 – 2489.
26. Kostadinova, S. and Marhova, M. *Biotechnol. & Biotechnol. EQ*.; 24,2 (2010): 602 – 606.
27. Njoku, V. O., Chikezie, P. C., Kaoje, M. A., Monago, C. C. and Uwakwe, A. A. *African Journal of Biotechnology*; 10,6 (2011): 3157 – 3162.
28. Segel, I. H. "Enzyme kinetics:Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady- state enzyme system" John wiley and sons, (1975a) New York; pp. 46 – 48.
29. Stanciue, N., Ardelean, A., Diaconu, V., Rapeanu, G., Stanciu, S., Nicolau, A. *Dairy Sci. & Technol*.; 91,6 (2011): 701 – 717.
30. Al-Saleh, S. S. M. *Saudi J. Biol. Sci*.; 10,1 (2003): 42 – 50.
31. Arise, R. O., Davies, F. F. and Malomo, S. O. *Scientific Research and Essay*; 3,10 (2008): 488 – 494.

36. Kannampuzha, J. V. A., Tupy, J. H. and Pritzker, K P. H. *J. Rheumatol*; 36, 12 (2009): 2758 – 2765.
37. Qiao, C., Qing-Xi, C., Jian-Cheng, L., Jin-Hua, L. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*; 04(2003).
38. So, P. P., Tsui, F. W., Vieth, R., Tupy, J. H., Pritzker, K. P. *J. Rheumatol*; 34(2007): 1313 – 22.
32. Ying, Z. H., Tong, Y. U., Xing-ping, Z. H., Ju, G. A. O. *Sichuan Journal of zoology*; 28, 6 (2009): 835 – 842.
33. Yan, S., Liu, Y., Tian, X., Zhang, Y. and Zhou, H. *Journal of Protein Chemistry*; 22, 4 (2003): 371 – 375.
34. Wang, J. Y., Peng, X. J., Yang, D., An, L. J., Hu, J. H. and Zheng, X. F. *Guany pu xue yu guany pu fen xi Guang pu*; 21,5 (2001): 701 – 3.
35. Chakraborti, A. S., Roychowdhury, p., Das, A. and Mukherjea, M. *J. Biosci*.; 2 ,3 (1980): 171 – 179.

Kinetic studies of Alkaline phosphatase isoenzyme purified from saliva of diabetic patients

Ferah Ghali Al-Salihi [1], Nazar Ahmed Najy [2], Asra'a Ismaeel Yaseen [1]

[1] *Chemistry department , College of Education for women , Tikrit University*
[2] *Chemistry department , College of Science , Tikrit University*

Abstract:

Kinetic studies of the purified Tissue – nonspecific isoenzyme of alkaline phosphatase (TNSALP) from saliva of diabetic patients diabetic patients was carried out in this research, and it was found that the optimum concentration for the substrate disodium phenyl phosphate (DPP) was (10mM) and the K_m for the purified isoenzyme was (4.762)mM. This purified isoenzyme was obeyed Arrhenius equation up to 37°c , and their Ea and Q_{10} constant were (17.78KJ.mol^{-1} and 1.11) respectively . While its pH optimum was 10 and its pK_a value was (10.1).

The study also included the effect of some metal ions and amino acids on the purified isoenzyme , The results revealed activation effect of Co^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , while Zn^{+2} , Cu^{+2} , EDTA and the amino acids Cys. , Leu. , Phe. and Trp. showed inhibition effect. Cys. and Trp. act as non-competitive inhibitors, and their K_i value were (6.3 and 3.7) respectively.

Key word: alkaline phosphatase, saliva, diabetic , Kinetic studies