دراسة تأثير بعض قواعد شف على فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مرضى سرطان العظام في الرجال

م.م مصطفى عبد المجيد حميد / جامعة ديالى . كلية التربية الرازي . قسم الكيمياء

الخلاصة

تمت دراسة فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في أمصال الدم لـ (30) عينة للرجال مصابين بسرطان العظام من مستشفى مدينة الطب /بغداد وقد لوحظ زيادة الفعالية الأنزيمية الكلية في الحالات المرضية حيث وصلت الى(41.53 K.A.U./100ml) مقارنة بالقيمة الطبيعية لفعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل دم البالغين الأصحاء التي تكون ضمن المدى (3-13 K.A.U./100ml).

تم دراسة تأثير المركبين 7-nitro isatindine nicotinoyl hydrazide ، Isatindine nicotinoyl hydrazide على فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم من خلال تحضير سلسلة من التراكيز ($2*10^{-8}$, $2* 10^{-7}$, $2* 10^{-6}$,$2* 10^{-5}$) Mلكل من المركبين من المحلول القياسي (stock solution) بتركيز (M 10^{-4}) لكل منهما وقد استخدم DMSO كمذيب ولغرض التخفيف، بعد أن تم قياس تأثير DMSO التثبيطي على أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم والذي بلغ (2.76±0.5%)ومن خلال إجراء الفحوصات وجد أن المركبين يمكن اعتبارهما مثبطات جيدة بالتراكيز المستخدمة، حيث بلغ مدى النسبة المئوية للتثبيط (50-65%) وذلك باستخدام التركيزالأعلى للمثبطات ($2*10^{-5}$ M) في مصل دم للمصابين .

Abstract

The level of Alkaline phosphatase was studied in the blood serum of (30) sample of men with bone cancer hospital in the town of Medicine / Baghdad has been observed to increase the overall effectiveness enzyme in patients with an average of (41.53 KAU/100ml) compared to the value of the effectiveness of the natural enzyme in theAlkaline phosphatase activity in sera of normal adults was in the ranges 3-13 K.A.U./100ml .

The effect of compounds 7-nitro isatindine nicotinoyl hydrazide Isatindine nicotinoyl hydrazide. the effectiveness of enzyme (ALP) of with concentration($2*10^{-8}$, $2* 10^{-7}$, $2* 10^{-6}$,$2* 10^{-5}$) of tow compounds in blood sera of stock solution concentration (M 10^{-4}) and DMSO was used as solvent and diluents , The inhibitory effect of DMSO on Alkaline phosphatase in blood sera was(2.76±0.5%) the two compounds have a good inhibitory in this concentration the Ratio was (50-65) with the high concentration of inhibitor was ($M2*10^{-5}$)in sera of patients.

المقدمة

سرطان العظم هو عبارة عن ورم سرطاني يتطور من الخلايا العظمية يبدأ هذا الورم في الغالب في النهاية للعظام الطويلة [1]. مثل عظام الذراعين والساقين، ومن الممكن رؤيته في عظام أخرى كذلك.أكثر منطقة شيوعاً لهذا الورم هي في أقصى عظام الفخذ (فوق الركبة مباشرة)، القصبة (أسفل الركبة مباشرة)، والذراع أسفل الكتف مباشرة [2]. سرطان العظام هو سرطان نادر الحدوث. يحدث بشكل متكرر أكثر في الأطفال والبالغين بين عمر 10-20 سنة. يشاهد في الغالب خلال فترات النمو الكبير خلال المراهقة وخلال فترة نمو العظام بشكل كبير [3] . الفوسفاتيز القاعدي هو Ortho-phsophaoric monoester phosphydrolase وهو أنزيم غير متخصص ينتمي إلى مجموعة الأنزيمات المحللة للعديد من استرات الاورثوفوسفات والذي يعمل تحت الظروف القاعدية pH=9-10.5 [4]. وطبقاً إلى منظمة الكيمياء الصرفة (IUPAC) يعد الفوسفاتيز القاعدي من أنزيمات الدرجة الثالثة حيث أن الرقم التصنيفي له [E.C. 3.1.3.1] هذا الرقم يعطى اعتماداً على مجموعة الفوسفات المتحللة المشتركة في التفاعل، حيث يقوم هذا الأنزيم بنقل مجموعة الفوسفات من مجموعة إلى أخرى مخلفاً الكحول ومركبات الفوسفات الثانوية،إن الفعالية المثلى للأنزيم تظهر عند pH=9-10 حسب المادة الأساس Substrate المستخدم، ومن اجل أن يصل الفوسفاتيز القاعدي إلى مستوى الاستقرار والفعالية العظمى فانه يحتاج إلى أيون المغنيسيوم الموجب Mg^{+2} كمنشط [5] . إن فعالية الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم تعتمد على العمر حيث أن لنمو العظام تأثير على مكونات العظم وبالتالي على أنزيم الفوسفاتيز القاعدي لذا فان نسبة ALP في أمصال الأطفال والبالغين معروفة ومحددة، كما أن هناك بعض الزيادة في أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في العظام بتقدم السن (أي لدى المسنين اكبر من 60 سنة) كما أن هناك اختلافات بسيطة بالنسبة لنسب الفوسفاتيز القاعدي في الأمصال بين الذكور والإناث بنفس العمر وبصورة عامة إن الاختلافات في نسب وجود ALP التي تتعلق بالجنس تعد اقل أهمية في تفسير النتائج نسبة لتأثير العمر، حيث يؤثر اكثر من نوع الجنس في تحديد مدى فعالية الفوسفاتيز القاعدي في الأمصال[6]. وسريرياً أنزيم الفوسفاتيز القاعدي يقاس عن طريق التحلل الأنزيمي المائي لأملاح الفوسفات العضوية في الوسط القاعدي [7]. كما يجب توخي الحذر والاحتراس عند تقييم أو تشخيص الحالة المرضية التي تسبب الزيادة في تراكيز الفوسفاتيز القاعدي في أمصال دم الأطفال

لان عامل النمو يعد مهماً في مرحلة التشخيص الطبي والذي بالتالي يسبب هذه الزيادة. إن فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في الخلايا العظمية يزداد عند الإصابة بأمراض الأورام العظمية الابتدائية أو الثانوية مثل مرض السرقوم Osteoblastic Sarcoma.[8] . يمكن تلخيص أسباب زيادة فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في البلازما حيث تم الكشف والتحري عنها عن طريق الأسباب التالية [9]: -

1. أمراض باجت التي تصيب العظام Paget Disease of Bone.
2. الإعاقة الكبدية الفائقة Obstructive liver Disease
3. أمراض الالتهاب الكبدي Hepatitis.
4. التسمم الكبدي الذي تسببه العقاقير Hepatotoxicity.
5. لين العظام Osteomalacia.
6. الكساح Rickets.
7. سرطانات الكبد والعظام Bone's and Liver's Concers
8. الارتفاع في إفراز الغدة الجنب درقية Hyperparathyroidsim

وقواعد شيف هي مركبات صلبة وثابتة عندما تحضر من تفاعل الأمينات الأروماتية مع الالديهايدات والكيتونات، وسائلة عندما تحضر من المشتقات الاليفاتية [10].وفي السنوات الأخيرة نالت قواعد شيف اهتماماً كبيراً كمواد دوائية نتيجة للفعالية البايولوجية التي أظهرتها البعض منها [11]، حيث استخدمت قواعد شيف كمضادات للسرطان (anticancer) [12] ومضادات للكآبة (antidepressant) وكمسكن (analgesic) [13].

عينات الدمBlood samples

أجريت الدراسة على مجموعة من الرجال مصابين بسرطان العظام وقد تم الحصول على عينات الدم من مستشفى الجراحات التخصصية في مدينة الطب /بغداد لرجال تتراوح أعمارهم (35-75) سنة وبلغ عددهم(30) وذلك بعد إجراء الفحوصات المختبرية والتشخيص السريري من قبل الأطباء الاختصاص. وحضرت أمصال الدم كالآتي:

تم سحب (5ml) من دم الوريد من الذراع وتركت العينة لمدة (15) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ليتم التخثر، توضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي بسرعة (3000) دورة في الدقيقة

لمدة (15) دقيقة، ومن ثم تم عزل مصل الدم وأجريت عليه التجارب المختلفة في يوم السحب نفسه.

تعيين فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم

تعيين فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم اعتماداً على طريقة Belfied & Kind [14]:

مبدأ العمل: - تعين فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي بوساطة التحليل الطيفي اعتماداً على التفاعل التالي: -

$$\text{phenyl phosphate} \xrightarrow[\text{pH = 10}]{\text{ALP}} \text{phenol + phosphate}$$

حيث تم قياس فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي من خلال حساب كمية الفينول المتكون بوجود كل من 4-امينو انتي بايرين (4-amino antipyrine) وفيريسيانيد البوتاسيوم (potassium ferricyanide)، أما دور صوديوم ارسينيت (sodium arsenate) في الكاشف فأنه يعمل على إيقاف التفاعل.

تعيين النسبة المئوية للتثبيط والاسترجاعية

تم حساب النسبة المئوية للتثبيط من خلال مقارنة الفعالية الأنزيمية في مصل الدم بوجود المثبط وبعدم وجوده تحت الظروف نفسها، وكذلك تم تعيين النسبة المئوية للتثبيط في مصل دم الرجال المصابين بسرطان العظام، لكل مركب على حدة باستخدام القانون التالي:

$$\text{نسبة التثبيط \%} = [\,100 - \frac{\text{الفعالية الأنزيمية بوجود المثبط}}{\text{الفعالية الأنزيمية بعدم وجود المثبط}}\,] \times 100$$

أما تعيين النسبة المئوية للاسترجاعية (recovery) لكل مثبط في مصل الدم فتم وفق القانون التالي:

الاسترجاعية % = 100 – نسبة التثبيط %

النتائج والناقشة

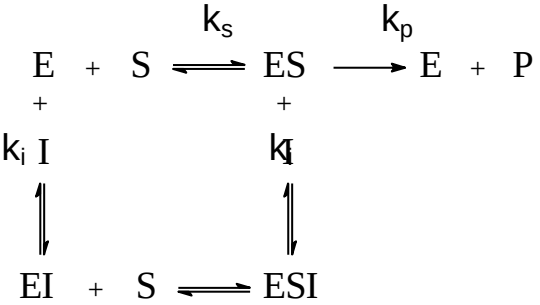
1 -التاثير التثبيطي للمركبين A,B على فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي

تم قياس الفعالية الانزيمية للفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم حسب طريقة كنك وبلفيلد (King and Belfield) [14]، حيث أن القيمة الطبيعية لفعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل دم البالغين الأصحاء تكون ضمن المدى (3-13 K.A.U./100ml). لقد تم اخذ (30) عينة مأخوذة من رجال مصابين بسرطان العظام تراوحت مدى اعمارهم (35-75)، وبلغت القيم المقاسة لفعالية الفوسفاتيز القاعدي للمصابين بمعدل (41.53 K.A.U./100ml).وتم دراسة تأثير المركبين A ,B على فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم الموضحين في جدول رقم (1)، من خلال تحضير سلسلة من التراكيز ($2X10^{-8}$, $2 X 10^{-7}$, $2 X 10^{-6}$,$2 X 10^{-5}$) Mلكل من المركبين من المحلول القياسي (stock solution) بتركيز (10^{-4} M) لكل منهما وقد استخدم DMSO كمذيب ولغرض التخفيف، بعد أن تم قياس تأثير DMSO التثبيطي على أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم والذي بلغ (2.76±0.5%).ومن خلال إجراء الفحوصات وجد أن المركبين يمكن اعتبارهما مثبطات جيدة بالتراكيز المستخدمة، حيث بلغ مدى النسبة المئوية للتثبيط (50-65%) وذلك باستخدام التراكيز الأعلى للمثبطات ($2 X 10^{-5}$ M) في مصل دم للمصابين كما موضح في جدول رقم (2) حيث أن اختلاف التأثير التثبيطي المتغير للمركبين قيد الدراسة على فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي يمكن أن يعزى إلى أن الأنزيم يتكون من عدد من الأنزيمات المماثلة (Isoenzymes) التي تختلف في معدل تأثرها بالمثبطات، كذلك فإن هذا التغير قد يعزى أيضاً إلى فعالية المجاميع المؤثرة في هذه المثبطات على المركز الفعال للأنزيم، وكما أن الأنزيم قد يتعرض إلى تغير في تركيبه الفراغي (Stereostructure) خلال مراحل تطور المرض [15]، مما يؤدي إلى سهولة ارتباط المثبطات بالأنزيم وبالتالي تعطي تثبيط أعلى. . إن المركب (A) يحتوي على مجموعة ساحبة (مجموعة النترو) والتي لها القابلية على سحب المزدوجات الإلكترونية على ذرة

النتروجين (-NHN=C-) وتحويلها إلى شحنات سالبة موجودة على هذه المجاميع الساحبة، وبذلك تكون أكثر فعالية للارتباط مع الأنزيم من المزدوجات الإلكترونية الحرة لان الزوج الالكتروني عادةا يشارك في تكوين الرزونانس أي انها اقل حرية في الحركة التاثير، لذلك سيكون التاثير التثبيطي المركب (B)الذي لايحتوي على مجموعة النترو (مجموعة ساحبة) اقل وبالتالي يكون ذا فعالية اقل الارتباط مع الإنزيم من المركب(A)

2 -تعيين نوع التثبيط

باستخدام معادلة لينويفر-برك، وكما موضح في الجدول (3) والشكل (1,2).ومن النتائج تبين أن نوع التثبيط للمركبين (A,B) هو تثبيط من نوع اللاتنافسي (non-competitive) إن المثبط اللاتنافسي يرتبط مع الأنزيم بصورة حرة وعكسية وبمواقع مختلفة ومغايرة عن ارتباط المادة الأساس بالموقع الفعال للأنزيم، وعند ارتباط المثبط بالأنزيم ليكوّن المعقد الأنزيم-المثبط [EI] ثم يتم ارتباط المادة الأساس [S] ليكوّن [ESI]، أو أن ترتبط المادة الأساس [S] مع الأنزيم لتكوّن [ES] ومن ثم يرتبط المثبط بالمعقد [ES] ليكوّن [ESI]، ويمكن توضيح ميكانيكية التثبيط اللاتنافسي بالمخطط التالي [16].

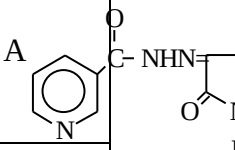
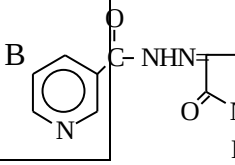


يمكن للمثبط اللاتنافسي أن يمنع الخاصية التمركزية للموقع المحفز في الأنزيم، وعليه فأن قيمة K_m تبقى ثابتة [17]. تعبر قيمة K_m عن الألفة ما بين الأنزيم والمادة الأساس، كما أنه لا يمكن التغلب على التثبيط اللاتنافسي بزيادة تركيز المادة الأساس، إذ يرتبط المثبط بصورة غير عكسية بموقع ما على سطح الأنزيم وعليه لا يمكن زحزحة المثبط من موقعه بزيادة تركيز المادة الأساس وتم حساب قيم السرعة العظمى (V_{maxi}) بوجود المثبط مباشرةً من خلال رسم لينويفر-برك، حيث تمثل نقطة التقاطع مع المحور الصادي قيم (1/V) وكما موضح في الأشكال (1 ,2). حيث نجد أن قيم (V_{maxi}) قد انخفضت بمقدار [1+I/K_i] وذلك بزيادة تركيز كل مثبط M($2*10^{-8}$-,$2*10^{-5}$) وفقاً للعلاقة التالية

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)$$

أما قيم (Ki) فهو ثابت مايكلس-منتن بوجود المثبط والتي تمثل نقطة التقاطع مع المحور السيني، فأنها تبقى ثابتة ولا تتغير مع زيادة تركيز كل مثبط، وكما موضح في الأشكال(1-2)

جدول (1) التركيب الكيميائي والاسم العلمي للمركبات المحضرة

رمز المركب	الصيغة	التسمية
A 		7-nitro isatindine nicotinoyl hydrazide
B 		Isatindine nicotinoyl hydrazide

جدول (2): يبين النسبة المئوية للتثبيط لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل دم مرضى مصابين بسرطان العظام باستخدام تراكيز المثبط M (I)
[$2*10^{-8}$, $2*10^{-7}$, $2*10^{-6}$, $2*10^{-5}$]

رمز المثبط	اسم المثبط	سرعة التفاعل الأنزيمي بغياب المثبط	[I]= $2*10^{-5}$ M			[I]= $2*10^{-6}$ M			[I]= $2*10^{-7}$ M			
			سرعة التفاعل الأنزيمي	نسبة التثبيط %	الاسترجاع %	سرعة التفاعل الأنزيمي	نسبة التثبيط %	الاسترجاع %	سرعة التفاعل الأنزيمي	نسبة التثبيط %	الاسترجاع %	سرعة التفاعل الأنزيمي

19.7	50.75	49.25	16.7	43.17	56.83	14.2	30.40	69.60	10.0	32.9	Nicotinoyl hydrazide	*A*
26.8	62.95	37.05	23.1	52.05	47.95	19.1	37.90	62.10	13.9	32.9	**p-Nitro benzididene nicotinoyl hydrazide**	**B**

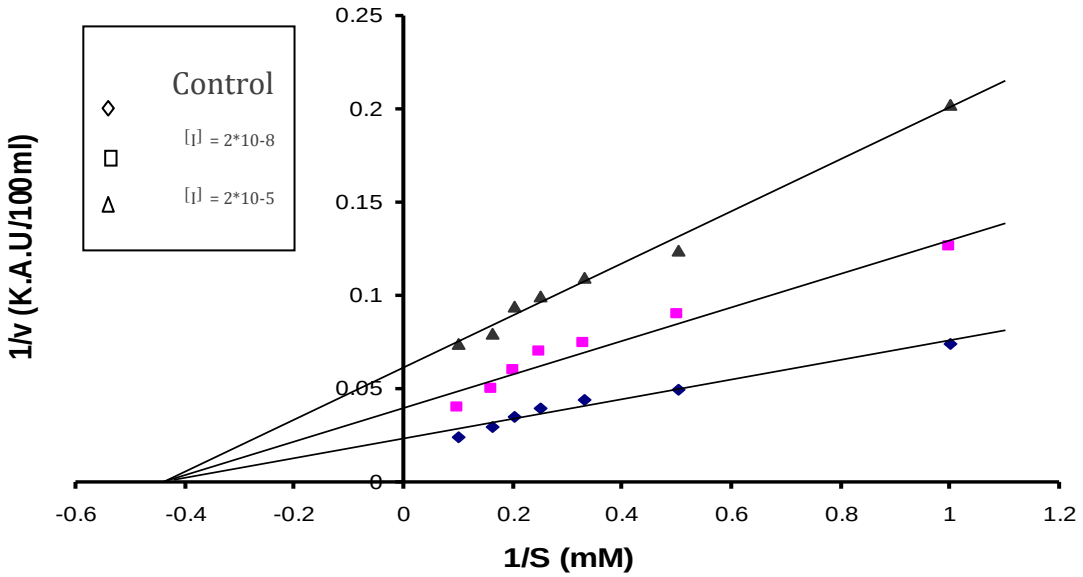
جدول (3): يبين نوع التثبيط بوجود ($2*10^{-5}$, $2*10^{-8}$) M من المركبين لأنزيم

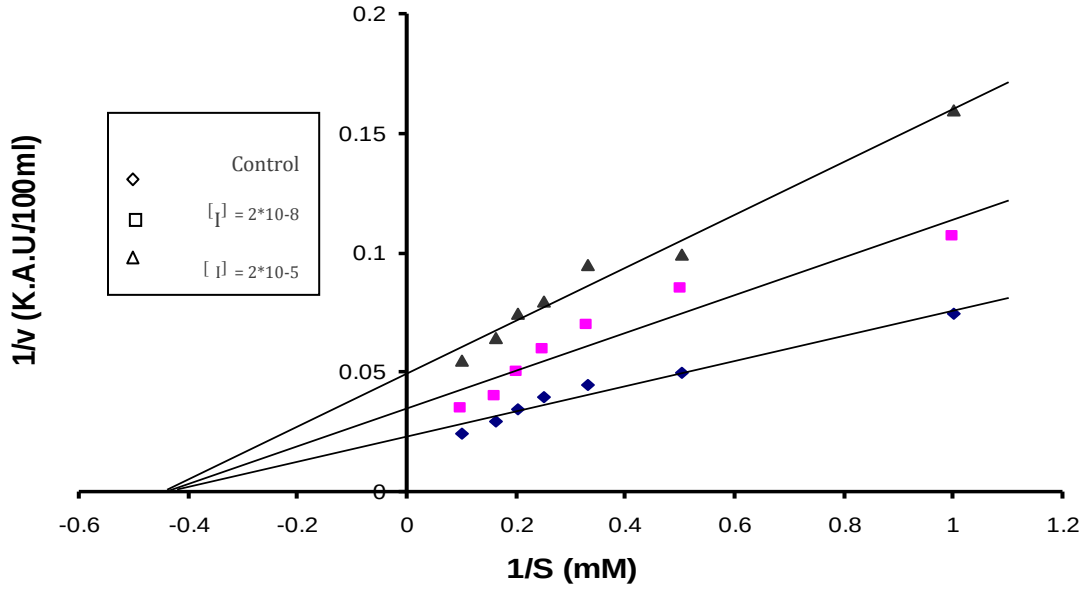
الفوسفاتيز القاعدي في مصل دم مرضى مصابين بسرطان العظام

رمز المركب	اسم المركب	بغياب المثبط		بوجود المثبط (I)		Km بوجود المثبط $\times10^{-3}$(M)
		Km (M) $\times10^{-3}$	V_{max}	[I]= $2*10^{-5}$ M	[I]= $2*10^{-8}$ M	
				V_{maxi}	V_{maxi}	
A	7-nitro isatindine nicotinoyl hydrazide	3.840	54	16.60	28.57	3.840
B	Isatindine nicotinoyl hydrazide	2.875	50	25.00	33.00	2.875

*علما ان وحدات Vmax هي (K.A.U/100ml)

ج


Control
[I] = 2*10-8
[I] = 2*10-5
1/v (K.A.U/100ml)
1/S (mM)
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.6
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2


Control
[I] = 2*10-8
[I] = 2*10-5
1/v (K.A.U/100ml)
1/S (mM)
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.6
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2

شكل (2): التأثير التثبيطي لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي بوجود المثبط B في مصل دم مرضى مصابين بسرطان العظام

المصادر

1. Malawer MM, Helman LJ, O'Sullivan B. *Sarcomas of bone*. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Vol. 2. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
2. American Cancer Society (2008). *Cancer Facts and Figures 2008*. Atlanta, GA: American Cancer Society. Retrieved March 13, 2008, from
3. Fischbach FT, Dunning MB. *A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004
4. Kim, H.J. et al (2006) Glucocorticoids suppress bone formation via theosteoclast. J. Clin. Invest. 116:2152–2160
5. Bhattacharya, A. et al (2006). Effect of fish oil on bone mineral densityin aging C57BL/6 female mice. J. Nutr. Biochem 18(6):372-379.
6. Wan, Y., Chong, L-W., & Evans, R.M. (2007). Nature Med. 13(12):1496-1503.

7. Michal L. Bishop, (2005), “Clinical chemistry, Principles Procedures, Correlation, 5th Edition, Philadephia, Lippincott company, P., 252
8. Nurrcy K.,& Mayes A., (1998)," Harpper’s Biochemistry", Printed in Lebanon by Typoprcss, P.187, 541, 585.
9. Belfield B.,& Arisi M., (1994), enzyme Brazilian J. Med. Biol. Res., 27:449.
10. Karia, F.D.; Parsania, P.H. Synthesis, biological and thermal properties of schiff bases ofbisphenol-C. *Asian J. Chem.* 1999, *11*, 991-995.
11. Tarafder, M.T.; Kasbollah, A.; Saravan, N.; Crouse, K.A.; Ali, A.M.; Tin, O.K. Smethyldithiocarbazateand its schiff bases: Evaluation of bondings and biological properties. J.Biochem. Mol. Biol. Biophs. 2002, 6, 85-91
12. Vicini, P.; Geronikaki, A.; Incerti, M.; Busonera, B.; Poni, G.; Kabras, C.A.; Colla, P.L. Synthesisand biological evaluation of benzo[d]isothiazole, benzothiazole and thiazole Schiff bases. Bioorg.Med. Chem. **2003**, 11, 4785-4789
13. Kahveci, B.; Bekircan, O.; Karaoglu, SA. Synthesis and antimicrobial activity of some 3-alkyl-4-(arylmethyleneamino)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones. *Indian J. Chem*. **2005**, *44B*, 2614-2617
14. Belfield B.,& Arisi M., (1994), enzyme Brazilian J. Med. Biol. Res., 27:449
15. Lubent Stryer, (1997), Biochemistry, 4th edition, freeman company New York, P.197.
16. Thomas M. Devlin, (1986), Text Book of Biochemistry with Clinical Correlations 2nd edition, John Wiley and Sons, New York, P.129

17. Zubay Geoffray, (1997), Biochemistry 3rd edition, W.M.C. Brown Publisher's Oxford, England, P.214