فعالية أنزيم الالنين أمينوببتايديز AAP ومتناظراته المنقاة جزئياً من إدرار المصابين بالعجز الكلوي المزمن

فراح غالي الصالحي* تغريد علوم العقبي**
*كلية التربية للبنات ــ جامعة تكريت
**كلية التربية ــ جامعة تكريت

الخلاصة

شملت الدراسة(50) عينة من إدرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن بالأضافة إلى(92)عينة من إدرار الأصحاء كمجموعة ضابطة.أظهرت نتائج الدراسة ارتفاعا معنويا ملحوظا(P<0.0001 بنشاط أنزيم الألنين أمينو ببتايديز AAP في إدرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن مقارنة بالأصحاء،إذ بلغ معدل الفعالية(7.58±1.97)وحدة عالمية/لتر في حين كان معدل الفعالية(23.33±7.27)وحدة عالمية/لتر في حالة العجز الكلوي المزمن وتم أيضاً تنقية أنزيم(AAP)في إدرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي(Sephdex G-50)ومن ثم تم فصل الأنزيم المنقى جزئياً باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني(DEAE-SephdexA-50) إلى متناظرين تختلفان في درجة تنقيتهما.

المقدمة

العجز الكلوي المزمن (CRF- Chronic Renal Failure) وبمسبباته الباثولوجية المختلفة يؤدي الى العجز البولي بتقدم المرض(Edward،1991)،وبالتالي فأن ذلك يؤدي الى فقدان القدرة التركيزية للكلية و تكرار البول (polyuria) (Verrelli،2005).وعادةً يتم متابعة تطور وخطورة العجز الكلوي المزمن من خلال متابعة تراكيز اليوريا والكرياتنين ببلازما الدم بشكل دوري . ومع هذا فأن هذه الاختبارات تعطي مقياس غير دقيق عن فعالية الكلية(Whitby،1988).لذا فقد أصبح للانزيمات الموجودة في إدرار الانسان أهمية كبيرة في تشخيص الكثير من أمراض الجهاز البولي وبالأخص العجز الكلوي،إذ تعد الظروف المرضية الجزء المهم والمسؤول عن الارتفاع الحاصل في نشاط بعض أنزيمات الإدرار (Kumar،1987).وهنالك مصادر عدة لأنزيمات الإدرار منها الكلى،القنوات الموجودة في

الجهاز البولي– التناسلي والمغطاة بالخلايا الظهارية(Kumar،1987 ; Yossef،1999)،مصل الدم ،كريات الدم، الأحياء المجهرية(Maruhn،1986).ومن هذه الأنزيمات :

Aspartate aminotransferase(AST),Alanine aminotransferase(ALT),Lactate dehydrogenase(LDH),Acid phosphatase(ACP),Alkaline phosphatase (ALP),Alanine aminopeptidase(AAP).(Al-Alkabie،2000و Al-Madani،2006)

ويعود أنزيم الالنين أمينو ببتايديز AAP إلى مجموعة أنزيمات الامينوببتايديز التي تشطر حامض أميني منفرد من النهاية الأمينية للسلسلة الببتيدية.ويوجد نوعان من الأمينو ببتايديز الأول سايتوبلازمي(EC 3.4.11.1)وأفضل مادة أساس له هيL-Leucineamide لذا سمي Leucineamino peptidase(LAP)،أما الأخر فهو مايكروسومي (EC 3.4.11.2)الذي يعمل على الألنين وكذلك تستعمل مشتقاتNitroanilide-4و β-Naphthylamide للألنين كمواد أساس له لذا سمي(AAP)Alanine aminopeptidase(1988,Mattenheimer)،إذ يقوم AAPبتحفيز تحررNitroaniline-4والحامض الأميني في الطرف النايتروجيني مفضلاً الألنين من مدى واسع من الببتيدات والأميدات(Zlatkovic،1988).ويعد AAP مؤشراً حياتياً لتحديد الأذى الذي يصيب الكلية،إذ يتحسس هذا الأنزيم للتغير المفاجئ الذي يحصل عند الشخص الذي تمت له عملية الغرس الكلوي وهو بذلك يمكن أن يعطينا فكرة عن عدم استجابة الشخص المريض للغرس الكلوي وبذلك يعد تحديد نشاطه مهماً بعد إجراء عملية الغرس الكلوي

(Jung et al. ; 1980، Jung & Scholz،1986) وكذلك له فائدة خاصة في التعرف على التسمم الكلوي من جراء تعاطي بعض العقاقير (Gibey،1982).ووفقاً لما ذكر في هذه المقدمة من معلومات عن أنزيم AAP فأنه لم تتطرق الدراسات السابقة لمتابعة فعالية هذا الأنزيم في حالة الإصابة بالعجز الكلوي المزمن ، لذا تم دراسة هذا الموضوع بالتفصيل.

المواد وطرائق العمل:

العينات:تم جمع 92 عينة إدرار من الأشخاص الأصحاء من منتسبي وطلبة كلية التربية–جامعة تكريت ومن كلا الجنسين،إذ كان عدد الذكور(40) وعدد الأناث(52)،وكانت أعمارهم تتراوح بين(20-70)سنة،وذلك بعد التأكد من عدم إصابتهم بأي مرض من أمراض الجهاز البولي.أما الأنموذجات المرضية للمصابين بالعجز الكلوي المزمن CRF،فقد تم جمع(50)عينة مرضية

أخذت من(٢١)ذكراً و(٢٩)أنثى تتراوح أعمارهم بين(١٨–٧٢)سنة،وتم التشخيص من قبل الأطباء الأخصائيين في مستشفى تكريت التعليمي.إذ جمع الإدرار المطروح من قبل المريض خلال مدة ٢٤ ساعة في قنينة جافة ونظيفة،وتم قياس نشاط الإنزيم بعد أخذ العينة مباشرة.

طرائق العمل:

١– قياس نشاط أنزيم الألنين أمينوببتايديز AAPفي الإدرار:

تم قياس نشاط الأنزيم بالأدرار بالاعتماد على طريقة الباحثيين(Jung & Scholz،1980) والتي تعتمد على قياس كميةNitroaniline-4 المتحررة بتأثير الأنزيم على المادة الأساس المستعملةAlanine-4- nitroanlide hydrochlorideوذلك بعد مقارنة الامتصاصية للنموذج مع الخط البياني القياسي لتراكيز مختلفة من4-Nitroanilid(Jung،1980).

٢– قياس تركيز البروتين :

أتبعت طريقة الباحث(Lowry،1951) لقياس تركيز البروتين في الأدرار وبإستعمال ألبومين مصل الدم البقري كبروتين قياسي.

٣–قياس تركيزالكيرياتنين ومعدل تصفية الكرياتنين (Larsen،1972):

استخدمت طريقة الطقم الجاهز لتعيين تركيز الكرياتنين من خلال تكوين المعقد الملون بوساطة تفاعل الكرياتنين مع المحلول القاعدي لحامض البكريك بطول موجي 492 نانوميتر.اما معدل تصفية الكرياتنين فقد تم تحديده من خلال قياس كمية الادرار المطروح خلال 24ساعة وتركيز الكرياتنين بكل من مصل الدم والادرار ومن خلال تطبيق القانون التالي :

$$\text{معدل تصفية الكرياتنين(ml/min)} = \frac{\text{تركيز الكرياتنين بالادرار(mg./dl)}}{\text{تركيز الكرياتنين بمصل الدم(mg/dl)}} \times \frac{\text{حجم الادرار (مل)}}{1440(\text{min})}$$

٤– فصل أنزيم AAPمن إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن :

تم فصلAAPمن الأدراروفقاً لطريقة الباحثيين(Jung and Scholz،1980)وذلك لغرض تخليصه من المثبطات التي تحد من نشاطه ومن خلال أستعمال خطوتين هما(Kumar،1987):

أ–الترشيح الهلامي Gel-filtration :

تم تنقية الأنزيم من الإدرار بأستعمال عمود ترشيح هلامSephadex G-50

(20×1.5 cm.)وبإضافة 5مل من الادرار فوق سطح هلام الترشيح ،ثم تم الفصل باستخدام 25مل من محلول Trisالدارئ.إذ تم جمع(6)أنابيب من الأجزاء الناضحة وبحجم(5)مل لكل جزء وبدرجة حرارة (4) ^{o}م،وبسرعة جريان 2.5 مل بالدقيقة الواحدة.

ب– الفصل الغشائي Dialysis :

التي تعد من أهم وأقدم الطرق المستعملة في تنقية الأنزيمات،إذ تم استخدام كيس الفصل الغشائي الموضوع في محلول Tris الدارئ لفصل وتنقية أنزيم الألنين أمينو ببتايديز المفصول من عمود الترشيح الهلامي في الخطوة السابقة.

ه–فصل وتنقية جزئية لمتناظراتAAPمن إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن(Al-Akabie،2006):

إذ أستعمل عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني السالب بأستخدام الراتنج (DEAE-SephadexA-50) لفصل متناظرات أنزيمAAPالمعزول من كيس الديلزة بالخطوة السابقة وتم الفصل بأستعمال(22)مل من محلول Trisالدارئ،إذ جمعت(11)أنبوبة من الأجزاء الناضحة وبمعدل(2)مل لكل جزء ليتم بعدها الفصل بأستعمال محلول Trisالدارئ الحاوي على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم(0.1-0.4)مول/لتر.

النتائج والمناقشة :

أوضحت نتائج هذه الدراسة وجود فروقات معنوية في مستوى نشاط أنزيم الألنين أمينو ببتايديزAAPفي(50)عينة مرضية من المصابين بالعجز الكلوي المزمنCRFمقارنة مع (92)عينة من الأشخاص الأصحاء ومن كلا الجنسين،وكما مبين في الشكل(1).ويوضح الجدول رقم(1)مقارنة لمستوى نشاطAAPفي إدرار المرضى المصابين بCRFإذبلغ (23.33±7.27)وحدة عالمية/لتر وإدرار الأصحاء إذ بلغ(7.58±1.97)وحدة عالمية/لتر،إذ هنالك ارتفاع معنوي بمستوىp<0.0001 وربما يعزى هذا الأرتفاع بالفعالية الى التلف الحاصل في أنسجة الكلية والجهاز البولي(Kumar،1987)وبالأخص خلايا النبيبات الدانية للنفرونات التي يطرح منها هذا الأنزيم(Mattenheimer،1988).ويشيرالجدول رقم(1)إلى إن طرح أنزيمAAPلكل لتر من الأدرار يكون بالذكور أكثر من الأناث سواءاًبالأصحاء أو المرضى،لذا يمكن إزالة هكذا أختلافات و تصحيح التغير في حجم الأدرار خلال وحدة الزمن من خلال قسمة

المطروح منAAPخلال24ساعة على الكرياتنين المطروح خلال نفس المدة (Rybek،1987).اما الجدول رقم(2)فيوضح تراكيز(AAP)المطروحة في إدرار المرضى المصابين بـCRF،إذ وجد تغير معنوي ملحوظ($p< 0.0001$)من خلال إختبار الطالب،في تراكيزAAP للذكور والأناث المرضى بـCRFمع الذكور والأناث الأصحاء.ويعزى ذلك الى أن الطرح اليومي للإدرار في الذكور يكون أكثر من الأناث.وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود علاقة مابين نشاطAAPوالكرياتنين المطروح بالأدرار،إذ وجد إن نسبة نشاط الأنزيم الى الكرياتنين المطروح بالأدرار تكون ذات دلالة واضحة ومؤشرا للضررالذي يصيب الأنسجة الكلوية،وهذه النتائج تتطابق مع ماتوصل اليه الباحث(Gok،2003)،وبذلك يكون أنزيمAAP حساساً للتلف الكلوي(Rybek،1987).ومن أجل متابعة التغيرات الحاصلة في أنزيم AAPعند الأصابة بالعجز الكلوي المزمنCRF،فقد تم تنقية هذا الأنزيم جزئياً وفصلت متناظراته من إدرار الأصحاء والمرضى.إذ تم تنقية الأنزيم(6.6)مرة من إدرار الأصحاء وذلك بأجراء تقنية الترشيح الهلامي وبأستخدام هلام Sephadex G-50،إذ ظهرت قمة واحدة للأنزيم المنقى وكما موضح في الشكل رقم(2)وهذا يتطابق مع ما توصل إليه (Mattenheimerوجماعته1986)،في حين إزدادت درجة التنقية الى(14)مرة بعد أستعمال الفصل الغشائي بأستخدام كيس الديلزة.أما في حالة أدرار المرضى المصابين بـCRF فقد تم تنقية الأنزيم(62)مرة بأجراء تقنية الترشيح الهلامي وإزدادت الى(119)مرة بعد استخدام الفصل الغشائي وكما موضح في الشكل رقم(3). ومن ثم تم فصل الأنزيم المنقى جزئياً بأستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الى متناظرين أنزيمية تختلف في درجة تنقيتها وكما موضح في الشكل رقم(4)بالنسبة للأصحا والشكل رقم(5)بالنسبة للمرضى،وهذا يتطابق مع النتائج المتعلقة بمتناظراتAAP المفصولة من ادرار المصابين بسرطانات الجهاز البولي(Al-Akabie،2006).إذ لوحظ عند الفصل بأستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بأن المتناظر المفصول من إدرار الأصحاء يحمل شحنة موجبة وبمعدل نشاط(6.5)وحدة عالمية/لتر وينزل خلال عملية الروغان بمحلول Tris الدارىءذي الأس الهيدروجيني(7.8) أما المفصول من ادرار المصابين بالعجز الكلوي المزمن فقد ازداد نشاطه ليصل(14.5)وحدة عالمية/لتر وكان المتناظرII يحمل شحنة موجبة أيضاً وبمعدل نشاط (9.7)وحدة عالمية/لتر للأصحاء ويرتفع عند المرضى ليصل(12)وحدة عالمية/لتر.في حين لم تظهر أية متناظرات عند أستعمال محاليل متدرجة التراكيز من كلوريد الصوديوم وكما موضح في الأشكال(4)و(9).وتوضح الجداول رقم(3)،(4)خلاصة لخطوات التنقية أعلاه،إذ لاحظ أن

نشاط أنزيمAAPفي إدرار الأصحاء والمرضى قد زاد بعد إجراء عمليات الترشيح الهلامي والفصل الغشائي،وذلك يعود إلى التخلص من المثبطات(كاليوريا والأحماض الأمينية والأمونيا الموجودة في الأدرار)والتي تقلل من نشاط الأنزيم بالأدرار(Kumar،1987; Al-Akabie ،2000)وبالتالي يلاحظ أرتفاع نشاط منتاظراتAAPالمفصولة من إدرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن،وهذا يدل على تأثر المتناظرين I،II الواضح بالحالة المرضية.ومن خلال هذه النتائج يمكن التأكد بأن مصدر هذه المتناظرات هو أنسجة الكلية متمثلة بخلايا النبيب الداني للنفرونات وكما توصل إليه(Mattenheimer،1988)ولهذا فأنها تتأثر بالضرر الذي يصيب الجهاز البولي وخلايا الكلية خصوصاً.

جدول(١):نشاط AAP في إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن

Normal				CRF			
Specimen	No.of cases	Age (years)	AAP activity (I.U/L) (mean ±S.D)	No.of cases	Age (years)	AAP activity (I.U/L) (mean±S.D)	<p
male	40	25-70	8.65±1.85	21	18-75	24.52±6.66	0.0001
Femal	52	20-65	7.23±2.01	29	22-70	22.5±5.71	0.0001
Total	92	20-70	7.58±1.97	50	18-75	23.33±7.27	0.0001

جدول(٢):تراكيزِAAP المطروحة في إدرار المرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن (CRF)والأصحاء.

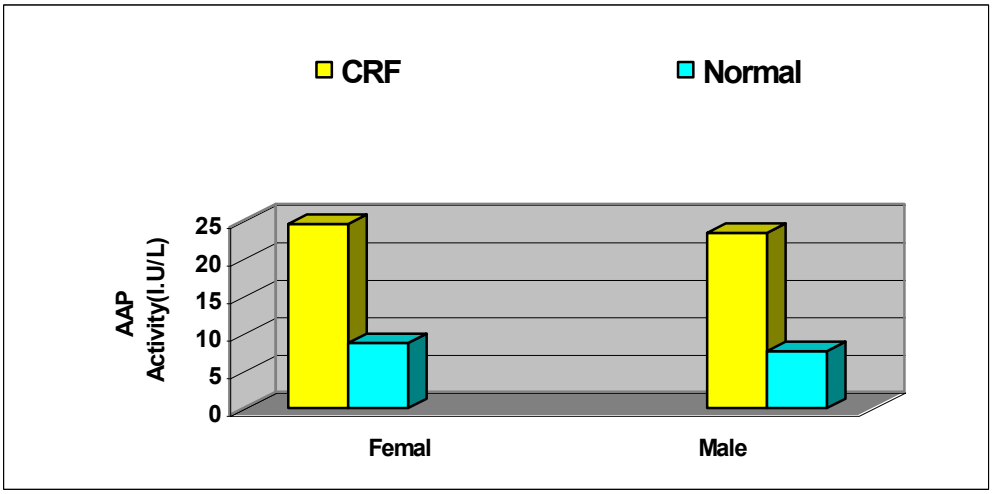
Normal					
Specimen	No.of cases	Age (years)	AAP activity (I.U/24hr)	Creatinine/24hr	I.U/gm creatinine
Male	40	25-70	10.83±2.15	1.36±0.15	7.58±1.52
Femal	52	20-65	8.96±1.92	1.52±0.19	6.01±0.95
Total	92	20-70	8.75±2.07	1.45±0.13	6.95±1.02
CRF					
Male	21	18-75	51.49±8.25	2.87±0.19	17.9±2.52
Femal	29	22-70	47.25±6.72	3.19±0.25	14.81±2.05
Total	50	18-75	48.99±7.95	3.129±0.21	15.66±1.95
<p			0.0001	0.0001	0.0001

جدول(٤):فصل وتنقية متناظرات AAPمن ادرار الاصحاء

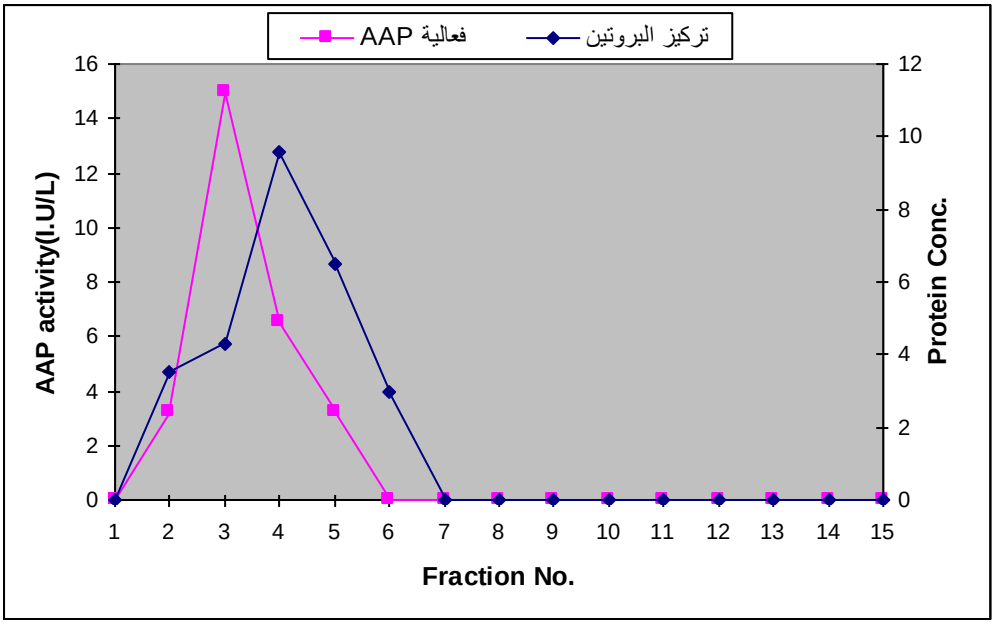
Step	Eluent (ml)	Protein conc. (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity (I.U/L)	Specific activity (I.U/mg)	Dgree of purification (fold)
Crude urine	10	64	640	3.25	0.005	1
Sephadex G-50	5	9.6	48	15.0	0.312	62.4
Dialysed urine	5	7.0	35	20.8	0.594	118.8
DEAE sephadex A-50						
soenzyme I	2.0	6.9	13.8	6.5	0.471	94.2
Isoenzyme II	2.0	6.0	12.0	9.75	0.812	162.4

جدول(٥):فصل وتنقية متناظراتAAP من إدرار المرضى المصابين بـــCRF

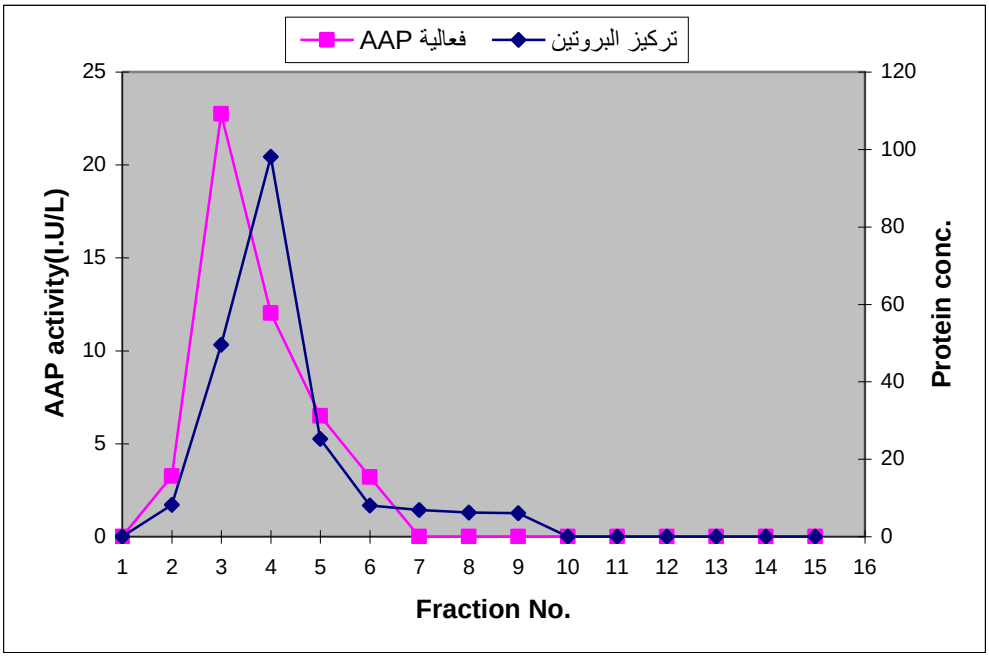
Step	Eluent (ml)	Protein conc. (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity (I.U/L)	Specific activity (I.U/mg)	Dgree of Purification (fold)
Crude urine	10	156	1560	12.02	0.007	1
Sephadex G-50	5	98.1	490.5	22.75	0.046	6.57
Dialysed urine	5	52.5	262.5	26.0	0.099	14.14
DEAE Sephadex A-50						
Isoenzyme I	2.0	7.9	15.8	14.6	0.924	132
Isoenzyme II	2.0	8.3	16.6	12.0	0.722	103.14



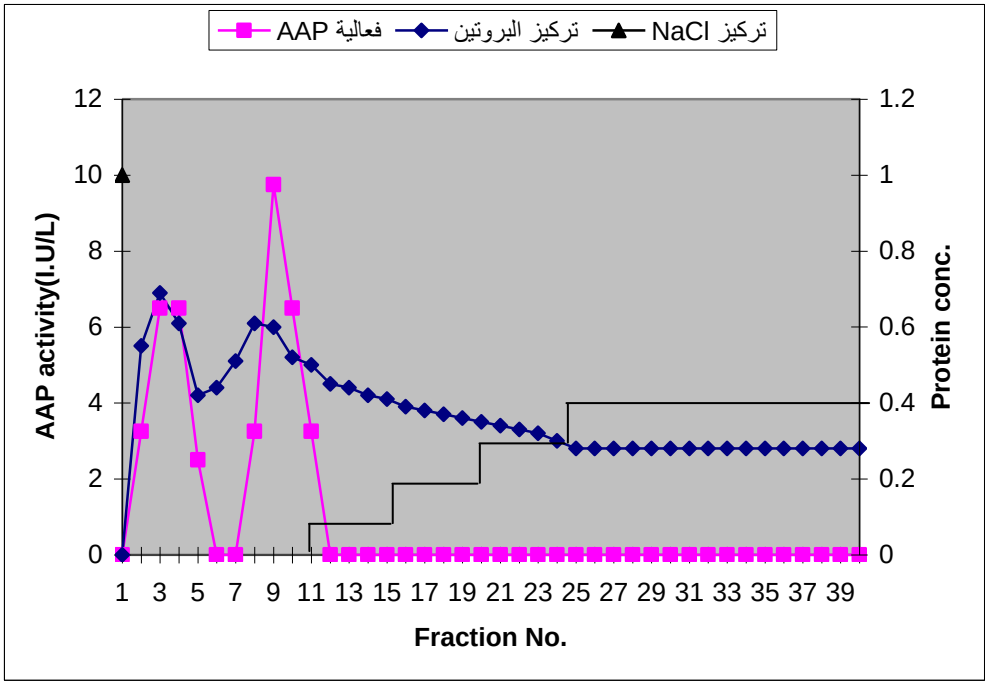
شكل(١):قيم نشاطAAPفي إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بـــCRF حسب الجنس (الذكور والإناث)البالغين.



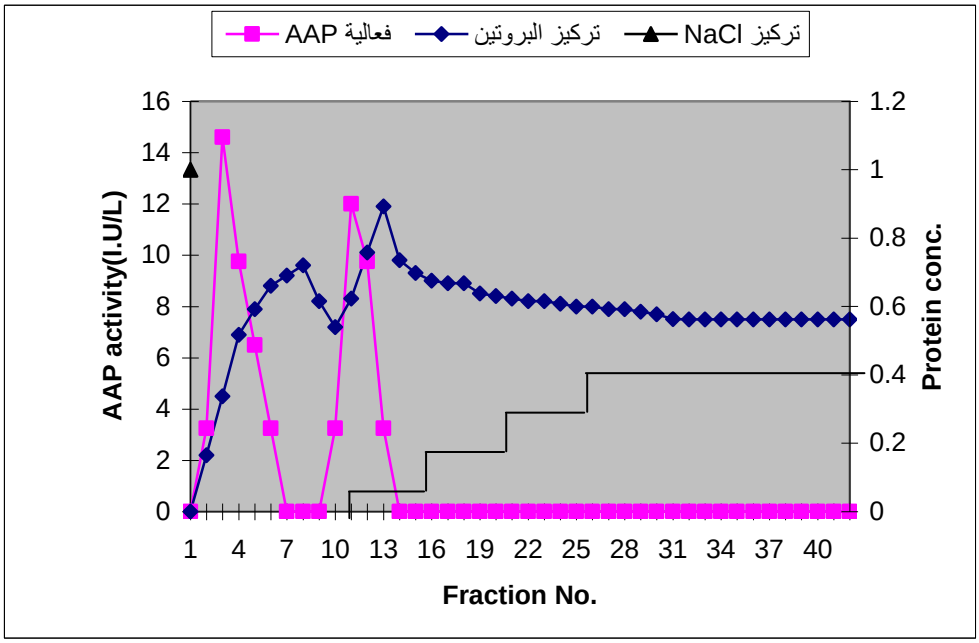
شكل(٢):فصل أنزيم (AAP) من إدرار الأصحاء



شكل(٣):فصل أنزيم(AAP) من إدرار المرضى المصابين بـــCRF



شكل(٤):فصل وتنقية جزئية لمتناظرات AAP من إدرار الأصحاء



شكل(٥):فصل وتنقية جزئية لمتناظرات AAP من إدرار المرضى المصابين بـــCRF

References

- Al-Akabie, T.U., (2000) : Biochemical studies of Aspartate aminotransferase isoenzymes ; isolation and partial purifiction from urine of patients with chronic renal failure, M.Sc. thesis, College of Education for women,Tikrit university.
- Al-Akabie,T.U.,(2006):Biochemical studies of Alnine aminopeptidas isoenzymes partially purified from patients urine having urinary tract cancer,Ph.D.thesis,College of Education,Tikrit university.
- Al-Madani,N.A.,(2006):Biochemical studiesof lactate dehydrogenase with partial purification of its isoenzymes from urine of patients with renal diseases ,M.Sc.thesis,College of Education for women,Tikrit university.
- Edward,C.R.W.,(1991):Davidsons principle and practice of medicine. Atextbook for student doctors.16th ed.pp.586-587.
- Gibey,R.,Doupond,J.L.,Alber,D.,Floris,R.L., and Henry.,(1981): Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase(NAG), alanine aminopeptidase (AAP) , and beta-2-microglobulin in evaluating nephrotoxicity of gentamicin. J. Clin. Chim .Acta.,Vol.116, pp.25-34.
- Gok,M.A.,Pelsers,M.,Glatz,J.F.C.,Bhatti,A.A.,Shenton,B.K.,Peaston, R.,Cornell,C.,Mantle,D.,and Talbot,D.,(2003):Ann.J.of Clin Bioch.,Vol.40, pp.252-258.
- Jung,K.,and Scholz,D.(1980):An optimized assay of alanine aminopeptidase activity in urine .Clin.Chem.,Vol.26,pp.1251-1254.
- Jung,K.,Diego,J.,Strobelt,V.,Scholz,D.and Schreiber,G.,(1986):Diagnostic significance of some urinary enzymes for detecting acute rejection crises in renal–transplant recipients.Clin.Chem.,Vol.32,pp.1807-1811.
- Kumar,A.Pandey,H.N.,Sharma,G.,Pandey,D.N.,and Sur B.K.,(1987): J.Physiol.Pharmac.,Vol.31,pp.13-17.
- Larsen,k.,(1972):Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. Clin.Chim.Acta.,Vol.41,pp.209-217.

- Lowry,O.H.,Rosebough.N.,J.Farr,A.L.and andell,R.J.,(1951): Protein measurement with the folin phenol reagent.J.Biol.Chem., Vol.193, pp.265-275.
- Maruhn, D., Wehling ,K., and Metz ,U .,(1986): Clin. Chim. Acta., Vol.160, pp.119-122.
- Mattenheimer,H.,(1988):Aminopeptidase in urine in animal clinical biochemistry.(Ed D.J Blok Mors)Cambridge university Prees.pp.209-218.
- Mattenheimer,H.,Frolke,W.,Grotsch,H.,andSimane,Z.,(1986):Clin.Chim.Acta.,Vol.160,pp.129-135.
- Rybek,M.J.,Frankowski,J.J.,Edwards,D.J.,and Albrecht,L.LM.(1987): Antimicrobial Agents and Chemotherapy.Vol.31,pp.1461-1464.
- Verrelli,M.,Mulloy,L.L.,Talavra,F.,Aronoff,F.,Schmidt,R.J.and BatumanV.,(2005):Medicine Encyclo.Chronic renal failure.2p.
- Whitby,L.G.,Smith,A.F.and Beckett,G.J.,(1988):lecture notes on clinical chemistry.4th ed BlackWell scientific publications,pp.168-170.
- Yossef,M.,Wanibuchi,H.,Mori.,Salim,E.I.,Hayashi,S.,and Fukushima, S., (1999):J.Carcinogensis.,Vol.20,pp.1247-1252.
- Zlatkovic,M.M.,Cukuranovic,R.,and Stefanovic,N.,(1988):J.Med and Biol.,Vol.5,pp.40-43.

Activity of Alanine aminopeptidase and its isoenzyms partially purified from the urine of chronic renal failure patients.

Ferah G.Al-Salihi and Tagreed U.AL-Akabie***
**College of Education for women - University of Tikrit*
***College of Education - University of Tikrit*

Abstract

The study was performed on 50 urine specimens of patients with chronic renal failure ,in addition to the 92 healthy specimens as a control group. The results of the study revealed that Alanine aminopeptidase (AAP) activity of chronic renal failure patients urine shows a highly significant increase ($p<0.0001$) compared to healthy subjects. Alanine aminopeptidase was purified from urine patients with chronic renal failure and healthy subjects by gel filtration using sephadex G-50, and two isoenzyms of (AAP) I, II were separated from patients urine using anion exchanger (DEAE-sephdexA-50).