مستويات انزيم الفنيل النين هيدروكسيلز وهرمونات الكاتيكول امين في امصال دم مرضى الفشل الكلوي المزمن

فراح غالي الصالحي ، اسماء هاشم شاكر ، عبدالرحمن خضير

قسم الكيمياء ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: 2013/3/11 ----تاريخ القبول: 2013/4/10)

الملخص

شملت الدراسة 50 عينة دم لمرضى الفشل الكلوي المزمن بألاضافة الى 100 عينة دم للاصحاء كمجموعة ضابطة . حيث اظهرت نتائج هذه الدراسة انخفاضاً معنوياً ملحوظاً ($P < 0.005$) بفعالية انزيم PAH في دم مرضى العجز الكلوي مقارنة بالاصحاء ، إذ بلغ معدل الفعالية ± 53.1 6.07 وحدة عالمية / مل في حالة الفشل الكلوي المزمن مقارنة بالاصحاء 142.3±23.1 وحدة عالمية / مل كذلك شملت الدراسة تقدير هرمونات الكاتيكول امين (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) ، حيث اظهرت انخفاضاً معنوياً ملحوظاً في مستوى هذه الهرمونات في حالة الفشل الكلوي المزمن مقارنة بالاصحاء ، حيث كان تركيز تركيز هرمون الادرينالين في لدى الاصحاء (1.385 ng / ml ± 3.03) مقارنة بـ CRF (± 0.579 0.294 ng /ml) وللنور ادرينالين(0.635 ng / ml ± 2.509) اصحاء مقارنة بـ CRF (0.898 ng /ml ± 1.052) ، وللدوبامين ± 142.075 (2.175 ng / ml) اصحاء مقارنة بمرضى CRF كانت (18.262 ng / ml ± 44.7) حيث اعطت فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P <$ 0.005 . وتم ايضاً ايجاد علاقة الارتباط بين فعالية انزيم PAH وتراكيز هرمونات الكاتيكول امين (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) في دم اصحاء ومرضى الفشل الكلوي المزمن ، اذ اظهرت النتائج انخفاض تراكيز هرمونات الكاتيكول امين مع انخفاض فعالية انزيم PAH في دم مرضى الفشل الكلوي المزمن مقارنة بالاصحاء ،وكان معامل الارتباط الخطي Correlation coefficient لها (0.471 و0.556 و0.466) اصحاء و(0.139- و0.151- و0.086-) مرضى على التوالي .

المقدمة

يمثل الفشل الكلوي المزمن(Chronic Renal Failure (CRF نقصاً في وظيفة الكلية نتيجة لمرضٍ مزمن ، يتم تشخيص المراحل الاولى للمرض عن طريق وجود البروتين بالادرار، فقر الدم ، ارتفاع ضغط الدم فضلاً عن ارتفاع مستوى الكرياتنين واليوريا في بلازما الدم [1] ويعد قياس نشاط الانزيمات ذات المنشأ الكلوي طريقة حساسة ومؤشر لحصول اي اذى او تلف في انسجة الكلية ، وبالاخص الفشل الكلوي المزمن [2] ومن هذه الانزيمات Aspartate aminotrancfarse (AST)، Alanine aminotrancfarse (ALT) ، lanine amino peptidase (AAP) ، Lactate dehydrogenase (LDH) [3] [4] [5] .

كما تنتج الكلية انزيمات اخرى مثل انزيم فنيل الالنين هيدروكسيلز Phenylalanine hydroxlase (PAH) الذي يعتبر الانزيم المنظم والمحدد لسرعة المسار الايضي لتحول الفنيل الالنين الى التايروسين Tyrosine (Tyr.) [6] [7] والذي يعتبر المصدر الاساس لبناء مركبات الكتيكول امين ومنها هرمونات (الادرينالين Adrenaline والنورادرينالين Noradrenaline والدوبامين Dopamine) والتي يتم افرازها من الغدة الكظرية [8] . ولهذه الهرمونات اهمية في الدورة الدموية ومعدلات الافراز العصبي حيث تزداد مستويات الكاتيكول امين مع الجهد والشد النفسي والجهد البيئي (مستويات الصوت المرتفعة وشدة الاضاءة) وانخفاض مستوى كلوكوز الدم ، وقد يسبب وجود مستويات عالية منها في الدم الى بعض الامراض ابرزها مرض القواتم (Pheochromocytoma) واورام الغدد الصم ومتلازمة سرطانية مثل احمرار الوجه [9] [10]، كما انها تعد مسؤولة عن التغيرات الفسيولوجية العامة للجسم كالنشاط البدني مثل زيادة ضربات القلب ، ضغط الدم ، وكلوكوز الدم[11] .

ولكون انزيم PAH موجود في انسجة الجسم المختلفة وله علاقه وثيقة بمرض Phenylketonuria (PKU) ، لذا فأن اغلب الادبيات تشير الى استخدامه كمؤشر للاصابة بـ PKU [12] [13] ، ولقلة البحوث المنشورة التي تربطه بأمراض الجهاز البولي وبالاخص الفشل الكلوي المزمن وكذلك هرمونات الكاتيكول امين ، لذا هدفت دراستنا الحالية لقياس مستويات انزيم PAH وهرمونات الكاتيكول امين (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) في امصال دم مرضى الفشل الكلوي المزمن وايجاد علاقة الارتباط بينها في هذا المرض .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

تم الحصول على النماذج المرضية للمصابين بالفشل الكلوي المزمن من مستشفى تكريت التعليمي بعد تشخيصها من قبل الاطباء الاخصائيين ، حيث جمعت 50 عينة دم قبل عملية الديلزة تتراوح اعمارهم بين (20– 75) سنة ولكلا الجنسين (الذكور والاناث) و100 عينة دم لاصحاء تراوحت اعمارهم بين(5–80) سنة ومن كلا الحنسين ايضاً .

تقدير فعالية انزيم الفنيل الالنين هيدروكسيليز في مصل الدم

تم قياس فعالية انزيم PAH اعتماداً على طريقة الباحث Bublitze (1969)[14] بعد تطوير الطريقة اللونية للوصول لفعالية جيدة للانزيم ،

والمتضمنة اضافة المرافق الانزيمي-6,7 dimethyl - ($DMBH_4$) 5,6,7,8-tetrahydropterine والمادة الاساس الفنيل الالنين التي تتحول الى التايروسين بوجود انزيم PAH حيث يقدر التايروسين الناتج باستخدام كاشف 1-Nitroso -2- naphthol حيث يتم اجراء التفاعل ضمن دالة حامضية pH 7.2 ، درجة حرارة $25C^0$ حيث يتكون معقد ذات لون اصفر– برتقالي تقاس امتصاصيته في طول موجي 450 نانومتر وتتناسب هذه الامتصاصية مع فعالية الانزيم طردياً .

تقدير هرمونات الادرينالين والنور ادرينالين والدبامين في مصل الدم

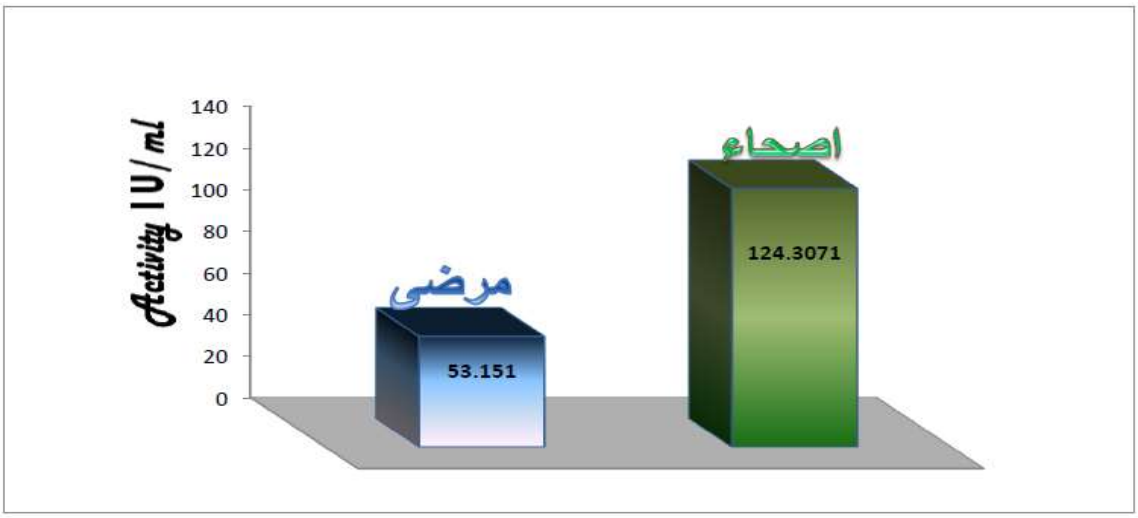
تم قياس تراكيز هرمونات (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) باستخدام تقنية (Enzyme – linked Immunosorbent ELISA Assay) باتباع الخطوات المرفقة مع عدة الفحص الخاصه المجهزة من شركة (Labor Diagnostika Nord GmBH & Co . KG) .حيث يعتمد المبدأ على الارتباط التنافسي، إذ يتم التفاعل بين الاجسام المضادة للهرمونات الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين الموضوعة في الطور الصلب وبين العينات التي توضع في حفر التعيير (التقدير) الدقيقة وعلى هذا الاساس يتم التنافس بين مستضدات العينات مع الاجسام المقترنة مع Anti – ribbit IgG – peroxidase وبعد حضن لمدة ساعتين تتم اضافة المادة الاساس (Tetramethyl benidine)(TMB) ، حيث ان كمية الانزيم المقترن والمرتبط بالمستضدات تناسب عكسياً مع تركيز الهرمون في النموذج ، وبعدها يتم تقدير تراكيز الهرمونات في نماذج الادرار وبلازما الدم من خلال المنحني القياسي الذي يتناسب من خلاله تركيز الهرمون للمحاليل القياسية مع الامتصاصية حيث يتم القياس عند 450 نانوميتر.

النتائج والمناقشة

يعتبر الفشل الكلوي المزمن من اهم الامراض المؤدية الى كثرة الوفيات بالعالم ولكونه يمتاز بمرحله طويلة وهادئة تستمر لعدة اشهر ولا تظهر اي علامات او اعراض على المريض الى ان يبلغ معدل الترشيح الكبيبي 15 سم^3 لكل دقيقة او اقل [15]. لذا من المهم ايجاد متغيرات بايوكيميائية بديلة تستخدم كمؤشر للاصابة بهذا المرض بالاضافة للاختبارات البايوكيمائية التقليدية . بأعتبار انزيم PAH احد الانزيمات التي تفرز من الكلية ، لذا فأن دراستنا الحالية شملت قياس مستويات انزيم PAH وهرمونات الكاتيكول امين (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) في مصل دم مرضى الفشل الكلوي المزمن لمتابعة النقص الحاصل في وظيفة الكلية لدى هؤلاءالمرضى . أظهرت نتائج الدراسة انخفاض معنوي ملحوظ ($P < 0.005$) في مستوى نشاط انزيم PAH في امصال دم المرضى المصابين بـ CRF اذ بلغ معدل نشاط الانزيم 5.1 ± 53.15 وحدة عالمية / مل مقارنة بمستوى الانزيم في امصال دم الاصحاء (23.13 ± 124.3) وكما في الجدول (1) والموضح في الشكل(1) ، وهذا يتوافق مع ماجاء في دراسة PF Gluyassy وجماعته (1970)[16] و Chazot C وجماعته (1997)[17] و Ikizler TA وجماعته (1994)[18] و Kapple JD جماعته (1982)[19] و Giordano وجماعته(1980)[20] .

جدول (1): متوسط مستوى فعالية انزيم PAH ± الانحراف المعياري في امصال دم الاصحاء ومرضى الفشل الكلوي المزمن

State	No.	Activity PAH I.U / ml (mean ± SD)
Normal	100	124.3 ± 23.13
CRF	50	53.15 ± 5.1
P value		≤ 0.005

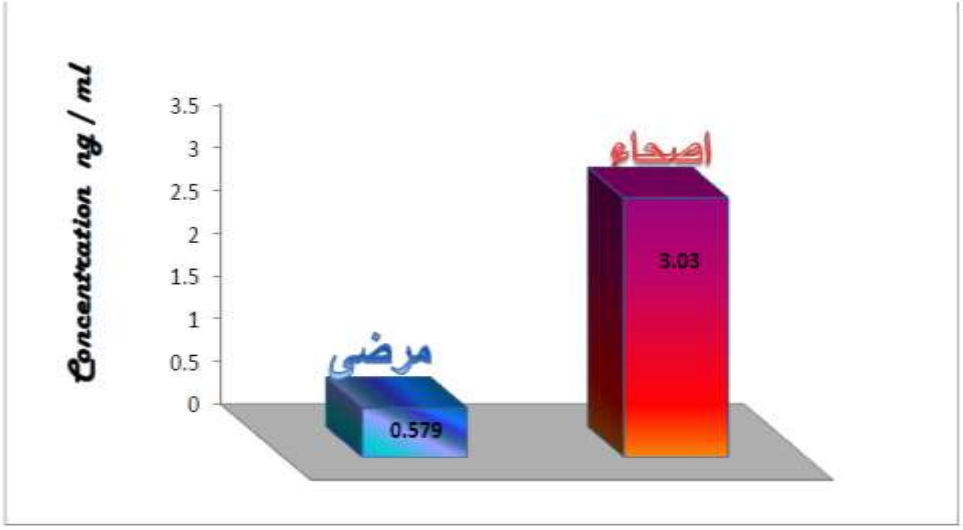


شكل (1) : متوسط فعالية انزيم PAH عند امصال دم مرضى المصابين بالفشل الكلوي المزمن مقارنة بالأصحاء

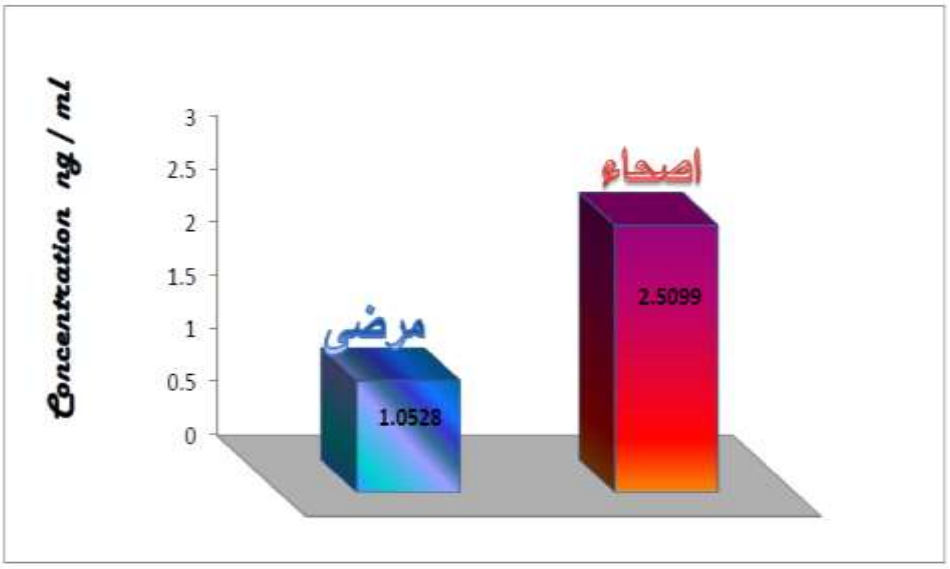
تعد هرمونات الكاتيكول امين من الهرمونات العصبية المهمه في الجسم والتي تلعب دورا محورياً واساسياً في توازن الدورة الدموية عن طريق القلب ولها تأثير مهم على وظيفة الكلية ، إذ تؤثر على النبيبات الكلوية الدانية والكلوية القاصية [21-23] وتسيطر على توازن تدفق الدم الكلوي [24] . اظهرت النتائج ان تركيز هرمون الادرينالين في مصل دم الاصحاء 3.03 ± 1.385 ng / ml مقارنة بمصل مرضى (CRF) 0.579 ± 0.294 ng /ml ، اما لهرمون النورادرينالين كانت 2.509 ± 0.635 ng /ml لدى الاصحاء اما CRF كانت 1.052 ± 0.898 ng / ml ، بينما كان تركيز هرمون الدوبامين اكثر تحسساً 142.075 ± 2.175 ng /ml لدى الاصحاء مقارنة بـ CRF كانت بحدود 44.7 ± 18.262 ng /ml والموضح في الجدول(2) حيث اعطت الهرمونات (AD, NA, DO) فروق معنوية واضحة بين الاصحاء ومرضى CRF في امصال الدم بمستوى احتمالية $P < 0.005$ كما مبين بالاشكال (2) (3) (4) ، هذا مايطابق Himmelfarb ,J وجماعته (2001)[25] .

جدول(2): متوسط تركيز هرمونات .AD و.NA و.DO ± الانحراف المعياري في مصل الدم

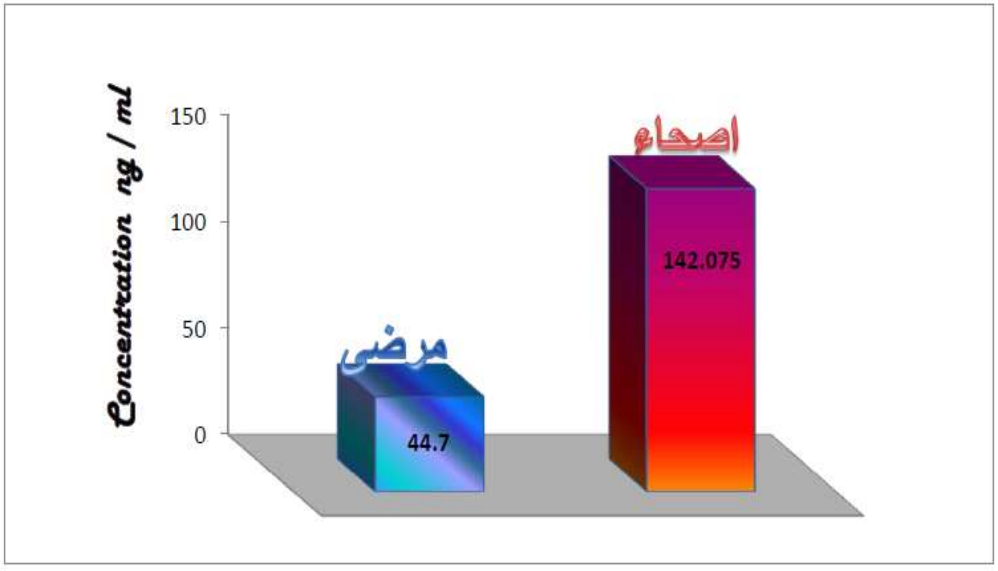
Hormone	conc. ng/ml (mean ± SD)		
	Normal	CRF	*P value*
Adrenaline	3.03 ± 1.385	0.579 ± 0.294	≤ 0.005
Noradrenaline	2.509 ± 0.635	1.0528 ± 0.898	≤ 0.005
Dopamine	142.075 ± 2.175	44.7 ± 18.262	≤ 0.005



شكل(2): متوسط تركيز هرمون الادرينالين في امصال الدم لمرضى CRF مقارنة بالأصحاء



شكل(3): متوسط تركيز هرمون النورادرينالين في امصال الدم لمرضى CRF مقارنة بالاصحاء

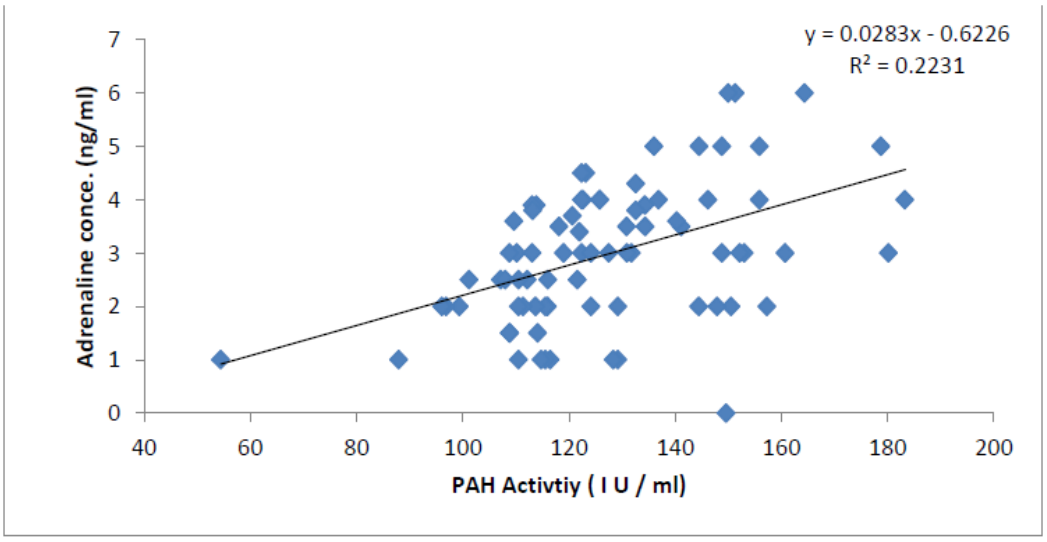


شكل(4): متوسط تركيز هرمون الدوبامين في امصال الدم لمرضى CRF مقارنة بالأصحاء

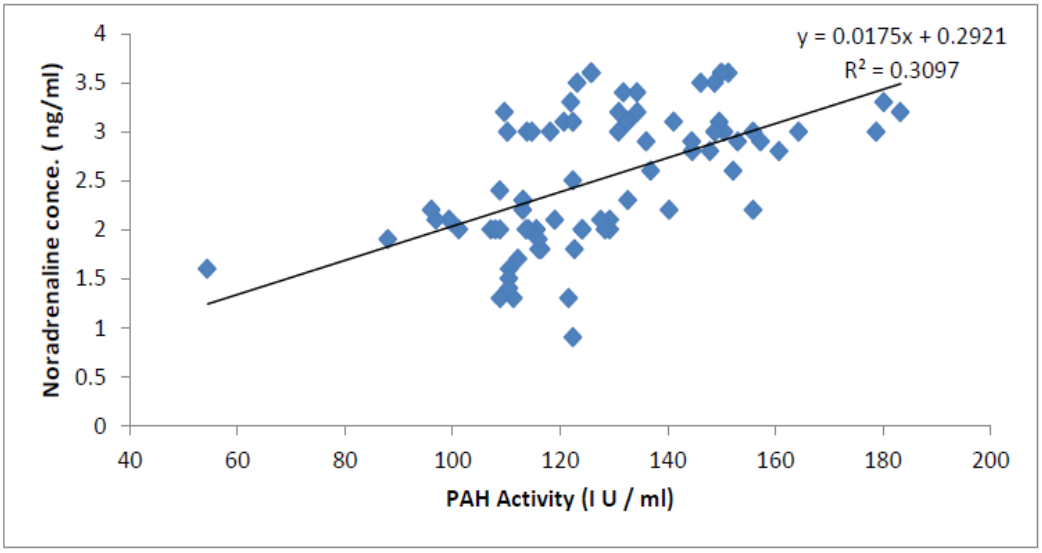
وبدراسة علاقة الارتباط بين فعالية انزيم PAH وتراكيز هرمونات الكاتيكول امين (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) في دم الاصحاء ومرضى الفشل الكلوي المزمن تم ايجاد معامل الارتباط الخطي (r) Correlation coefficient وذلك لكون انزيم PAH من الانزيمات المهمه والمسيطرة على بناء التايروسين (Tyr.) والذي يشكل المادة الاساس لبناء الهرمونات العصبية AD , NA , DO [26-28] المهمة في الجسم التي تعد مؤشرا لتراكيزها في الجسم ، كذلك تعد مؤشراً للاصابة بمرض الفشل الكلوي المزمن .حيث يظهر الجدول (3) ان معامل الارتباط الخطي (r) لانزيم PAH الدم والهرمونات (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) عند الاصحاء تكون علاقة ايجابية والمبينة في الاشكال(5) (6) (7) ، بخلاف المرضى حيث تكون العلاقة سلبية المبينة في لاشكال(8)(9)(10).

جدول (3) : معامل الارتباط الخطي (r) بين انزيم PAH وتراكيز هرمونات (الادرينالين والنورادرينالين والدوبامين) في ادرار الاصحاء ومرضى الفشل الكلوي

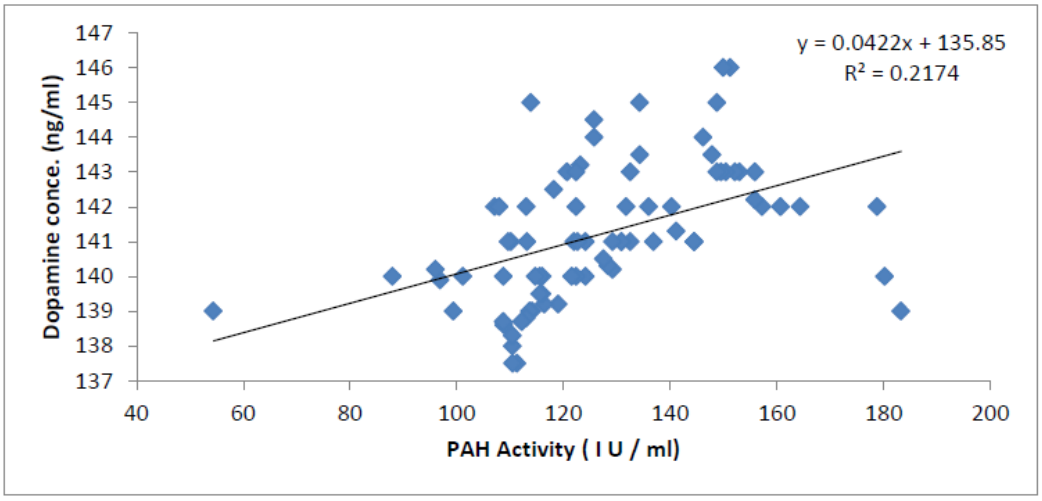
state	Correlation (r)	
	Normal	CRF
Adrenaline	0.472	-0.139
Noradrenaline	0.556	-0.151
Dopamine	0.466	-0.086



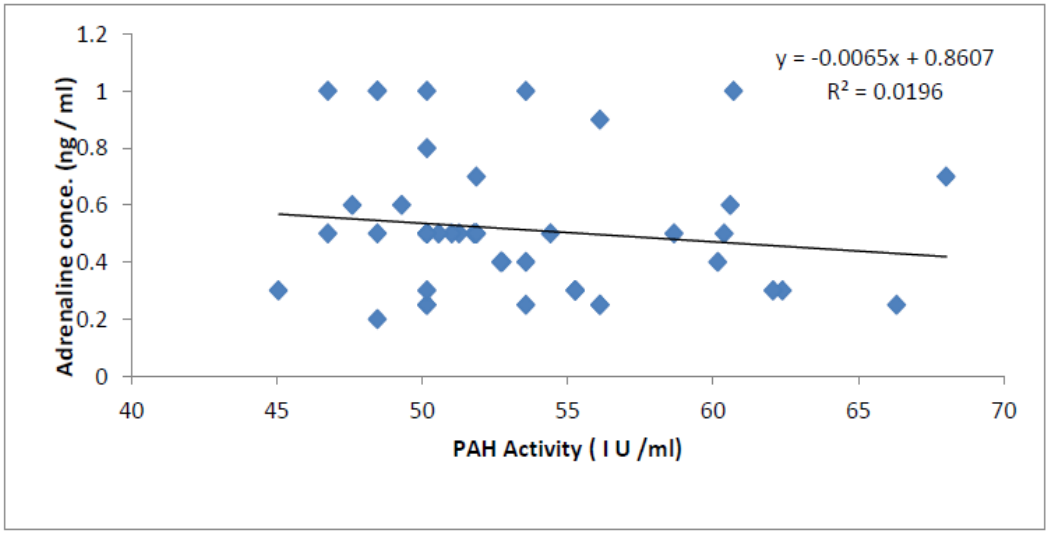
شكل(5): العلاقة الخطية بين انزيم PAH وهرمون الادرينالين في مصل دم الاصحاء



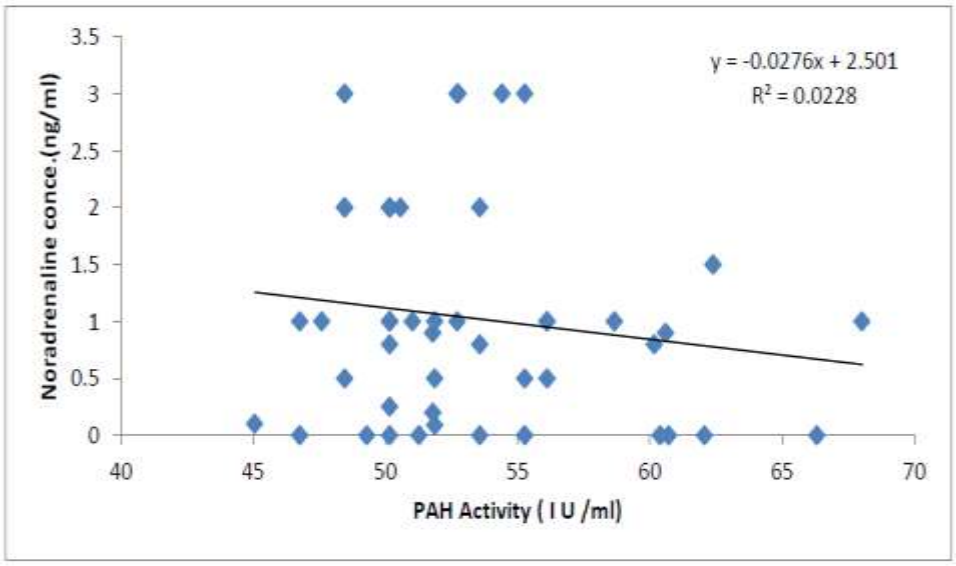
شكل(6): العلاقة الخطية بين انزيم PAH وهرمون النورادرينالين في مصل دم الاصحاء



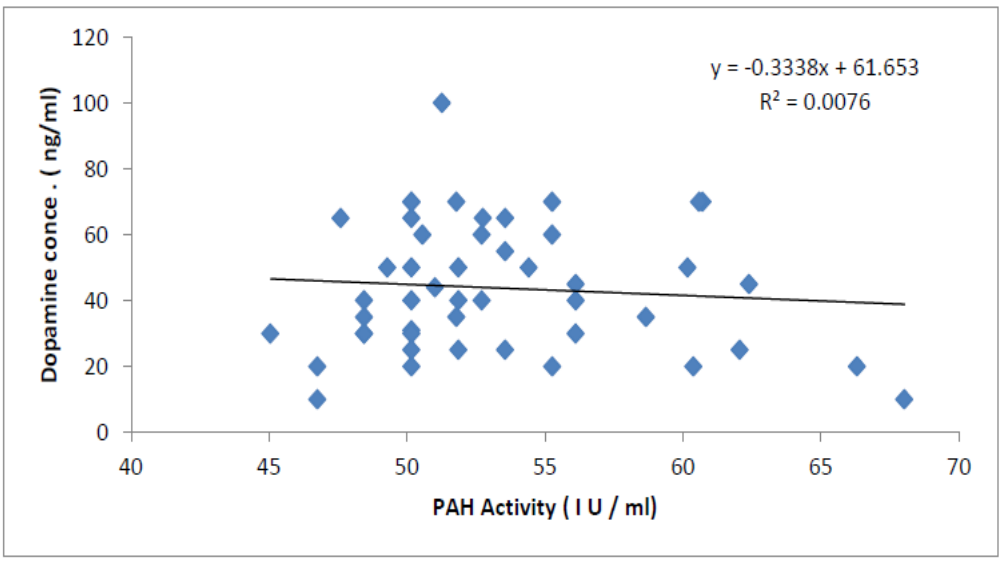
شكل(7): العلاقة الخطية بين انزيم PAH وهرمون الدوبامين في مصل دم الاصحاء



شكل(8): العلاقة الخطية بين انزيم PAH وهرمون الادرينالين في مصل دم المرضى



شكل(9) : العلاقة الخطية بين انزيم PAH وهرمون النورادرينالين في مصل دم المرضى



شكل (10) : العلاقة الخطية بين انزيم PAH وهرمون الدوبامين في مصل دم المرضى

اذ اظهرت النتائج على مدى انخفاض تراكيز هرمونات الكاتيكول امين مع انخفاض فعالية انزيم PAH في دم مرضى الفشل الكلوي المزمن مقارنة الاصحاء، من خلال النتائج تبين مدى حساسية العلاقة بين فعالية الانزيم PAH والهرمونات (AD, NA ,DO) هذا مادلت عليه الدراسات السابقة [29,8] .

المصادر

1. Anderson,J . (1989)." Muirs text book of Pathology". Longman Group Ltd , 12 th edition , pp . 183-260 .

2. Maruhn , D . ,Wehling . K. and Metz, H.J . (1986) . " Clin . Chemica Acta , 160 , 150-155.

3. Al- Salihi , F.G , Al – Mudfter , S.A . and Al-Akabie , T.U.(2010)"Kinetic studies of AST isoenzymes purtiully purified from patienits urin with chronic renal failure " Baghdad .J for sience . 7(1) , 437-443.

4. Al- Salihi , F.G , Khursheed , S.H . and Al-Madhani , N.A . (2009) , " LDH Activity in sera and urin of patients with renal failure " proceeding of ist Confrence / college og science – Tikrite *University* pp.149-153.

5. Al- Salihi , F.G and Al- Akabie , T.U . (2008) . "Activity of alanine aminopeptidase and its isoenzymes purtiully purified from the urin of chronic renal failure patienits "Kirkuk Universty .J. 3(2), 150-162.

6.Fitzpatrick, P.F. (1999). "Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases". *Annu. Rev. Biochem.* 68: 355–81.

7. Kaufman, S. (1958). "A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine". *J. Biol. Chem.* 230 (2): 931–9.

8. Flatmark, T. and Stevens, R.C. (1999). "Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms". *Chem. Rev.* 99 (8): 2137–2160.

9. Manor, I.; Tyano, S.; Mel, E. et al . (2002). "Family-Based and Association Studies of Monoamine Oxidase A and Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Preferential Transmission of the Long Promoter-Region Repeat and its Association with Impaired Performance on a Continuous Performance Test (TOVA)". *Molecular Psychiatry* 7 (6): 626–632..

10. Brunner, H. G. (1996). "MAOA Deficiency and Abnormal Behaviour: Perspectives on an Association". *Ciba Foundation Symposium* 194: 155–164; discussion 164–167..

11. Kuklin, A. I.;Conger, B. V. (1995). "Catecholamines in Plants". Journal of Plant Growth Regulation 14 (2): 91–97..

12.Kaufman, S. (1999). "A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (6): 3160–4 .

13.Muntau,A.C.,Gersting,S.W.(2010). "Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism" . J. Inherit. Metab Dis. 33 (6): 649–58 .

14.Bublitz ,C.(1969) ."Enzymatic Assay of phenyalanine hydroxylase " Biochim.Biophys.Acta 191, 249-256.

15. Lameire N, Van Biesen W. (2010) ."The initiation of renal-replacement therapy--just-in-time delivery". N Engl J Med. *Aug* 12;363(7):678-80.

16. Giordano, C. , De Pascale, C. , De Cristofare, D. , Capodicasa, G. , Balestrieri , C. , Baczyk, K. ,(1967) , Edinburgh: Livingstone, 23–34.

17. Gulyassy, P.F, Aviram, A., Peters, J.H. ,(1970) Arch Intern Med.;126:855–9.

18.Chazot C, Shahmir E, Matias B, Laidlaw S, Kopple JD. Dialytic nutrition, (1997),Kidney Int.,52:1663–70.

19. Ikizler, T.A, Flakoll, P.J, Parker, R.A, Hakim, R.M. , (1994), Kidney Int., 46:830–7.

20.Kopple, J. D, Blumenkrantz, M. J, Jones, M.R, Moran, J.K. , Coburn, J.W. (1982), Am J Clin Nutr., 36, 395–402.

21.Moss, N.G. (1982) ."Renal function and renal afferent and efferent nerve activity". Am J Physiol; 243:F425.

22. DiBona, G.F. (1989). "Neural control of renal function: cardiovascular implications". Hypertension; 13:539.

23.Barajas, L. , Powers, K. and Wang, P.(1984). "Innervation of the renal cortical tubules: a quantitative study". Am J Physiol; 247:F50.

24.Tucker, B.J. , Mundy, C.A. , Blantz, R.C. (1987) .Adrenergic and angiotensin II influences on renal vascular tone in chronic sodium depletion. Am J Physiol; 252:F811.

25. Himmelfarb ,J., McMenamin ,M.E, Loseto, G., Heinecke, JW, (2001), Free Radic Biol Med, 15, 31(10) , 1163-9

26. Fitzpatrick, P.F. (1999). "Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases". *Annu. Rev. Biochem.* 68: 355–81.

27. Kaufman S (February 1958). "A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine". *J. Biol. Chem.* 230 (2): 931–9.

28. Flatmark, T. , Stevens, R.C. (August 1999). "Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms". *Chem. Rev.* 99 (8): 2137–2160.

29. Igaki, N. Nakaji, M. Akiyama, H. Tamada, F., (2000), Clinical and Experimental Nephrology, 13421751, 49(2), 147-151.

Levels of Phenylalanine Hydroxylase and Catecholamine Hormones in Sera of Patient with Chronic Renal Failure

Al-Salihi, F. G. ، Shaker, A. H. ، AL-Taie, A. K.

Department of chemistry , college of education for women, University *of Tikrit, Tikrit, Iraq.*

(Received:11/3/ 2013---- Accepted:10/4/2013)

Abstract

This Study was performed on 50 blood serum specimence of chronic renal patients , in addition to 100 healthy blood serum specimens which investigate as control group . The results showed asignificant decrease ($P < 0.005$) in phenylalanine hydroxylase (PAH)activity in sera of patients with CRF as compared with healthy control. The study also included estimultion of catecholamine hormone (Adrenaline , Noradrenaline , Dopamine) , Which showed a signifant decreasd in the levels of these hormones ($P < 0.005$) in patients compared to healthy control.

In addition, correlations between (PAH) activity and levels of catecholamine hormone (Adrenaline Noradrenaline , Dopamine) were studied . The results showed a negative correlation in wiche the levels of catecholamine hormone were decreased with the decrement of PAH activity (r= 0.471 ، 0.55، 0.466) compared to healthy (r=-0.139 ، -0.15 ، -0.086) respectively.