قياس فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي من لعاب مرضى داء السكر وتنقية متناظراته جزئيا

أ.د.فراح غالي الصالحي* م.م.اسراء اسماعيل ياسين* أ.د.نزار احمد ناجي**

*جامعة تكريت / كلية التربية للبنات / قسم الكيمياء

**جامعة تكريت / كلية العلوم / قسم الكيمياء

الخلاصة :

تضمنت الدراسة الحالية قياس مستوى انزيم الفوسفاتيز القاعدي في لعاب مرضى داء السكر وكذلك فصل وتنقية جزئية لمتناظرات هذا الانزيم، حيث شملت 181 عينة لعاب من مرضى داء السكر بكلا نوعيه (59 عينة من النوع الاول المعتمد على الانسولين و 122 عينة من النوع الثاني غير المعتمد على الانسولين) اضافة الى 149 عينة من الاشخاص الاصحاء ومن كلا الجنسين . وقد اظهرت نتائج هذه الدراسة ارتفاعا معنويا ملحوظا عند مستوى احتمالية (p=0.000) بفعالية الفوسفاتيز القاعدي في لعاب مرضى داء السكر بكلا نوعيه.

وتم ايضا فصل وتنقية متناظرات الفوسفاتيز القاعدي من لعاب المصابين بداء السكر من خلال الترسيب بكبريتات الامونيوم والديلزة وبأستخدام تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني(DEAE-Cellulose A-50) تم فصل ثلاث متناظرات انزيمية تختلف في درجة تنقيتها . وبأستخدام تقنية الترشيح الهلامي (Sephadix G-100) تم تنقية المتناظرI جزئيا وعند استخدام طريقة الفصل بالترحيل الكهربائي على هلام SDS-PAGE بتركيز 10% وبإستعمال صبغة Coomassie blue R250 أظهر هذا المتناظر حزمة منفردة.

Estimation of alkaline phosphatase from salivaof diabetic patients and partial purification of it's isoenzymes

Ferah Ghali Al-Salihi* **Asra'a Ismaeel Yaseen*** **Nazar Ahmed Najy****

*Chemistry Department / College of Education for Women / Tikrit University
**Chemistry Departmen / College of Science / Tikrit University

Abstract

This study was performed on 181 saliva specimens of diabetic patients (59 of type 1 & 122 of type 2), in addition 149 healthy saliva specimens were investigated as control group. The result of this study showed a significant increase (p=0.000) in activity of salivary alkaline phosphatase from diabetic patients (both types) compared to healthy subjects.

Three isoenzymes were isolated from saiva of diabetic patients by addition of ammonium sulphate ,dialysis and ion-exchange (DEAE-Cellulose A-50) ,Isoenzyme I was partially purified by gel – filteration using Sephadex G-100 and showed a single band through electrophoresis by using SDS-PAGE and Coomassie blue R250 dye.

المقدمة

يمثل داء السكر diabetes mellitus مجموعة من الاضطرابات المتباينة سريريا ووراثيا تتميز بارتفاع مستوى الكلوكوز في الدم hyperglycemia نتيجة نقص في افراز الانسولين او مقاومة خلايا الجسم لعمل الانسولين او كلاهما [1] والاعراض الملحوظة لارتفاع السكر تشمل كثرة التبول polyuria وشدة العطشpolydipsa ونقصان الوزن وفي بعض الاحيان كثرة الاكل polyphagia والرؤيا المشوشة[2] . ويصنف داء السكر سريريا الى نوعيين اساسية:

1. داء السكر المعتمد على الانسولين (النوع الاول) Type1 :Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)

هو من اكثر الامراض المزمنة شيوعا في مرحلة الطفولة والاعمار دون سن الاربعين ، ويكثر حدوثه في اليافعين عنه في البالغين ، يسمى ايضا سكري الاحداث Juvenile diabetes لتشخيصه دون سن الثلاثين[3] حيث يفقد فيه الانسولين تماما[4] نتيجة تأثير المناعة الذاتية على خلايا β البنكرياسية وتحطيمها مما يسبب ايقاف انتاج الانسولين[5] .

2. داء السكر غيرالمعتمد على الانسولين (النوع الثاني)

Type2:Non-Insulin-dependent diabetes mellitus(NIDDM)

وهو من الامراض الايضية Metabolic disease[6,5] الذي يصيب كبار السن والذين تتجاوز اعمارهم الاربعين عاما تقريبا[7] ويعد اكثر الانواع انتشارا حيث تقدر نسبة انتشاره اكثر من 90% من بين كل الانواع[8] وللعوامل البيئية والوراثية التأثير الكبير في تكوينه[5 , 8] . ويكون مستوى الانسولين في هذا النوع طبيعيا او يحصل نقص نسبي لمستوى الانسولين الا ان خلايا الجسم تقاوم تأثير الانسولين ، فتقود هذه المقاومة الكبد الى زيادة عملية بناء الكلوكوز gluconeogenesis والذي يؤدي الى زيادة تركيز السكر[5].

وقد تزايدت خلال العقدين الماضيين الأبحاث التي بينت العديد من الطرق لاستخدام عينات من اللعاب لتشخيص وتوضيح المسببات المرضية لداء السكر والعديد من الامراض الجهازية الاخرى كسرطان الدم ، متلازمة نقص المناعة المكتسبة AIDS ،متلازمة شغرين Sjogren's syndrome والذآب الاحمراري systemic lupus erythematosus[9] ، حيث يحتوي اللعاب الكلي على دلائل ذات نتاج مركزي بالاضافة الى دلائل مشتقة من المصل تفيد في تشخيص الاضطرابات الجهازية بالاضافة الى امكانية جمع اللعاب بطريقة بسيطة من قبل المرضى وهذا يسهل الاختبارات التي يمكن انجازها من قبل المريض نفسه كما يمكن ان يكون بديلا عند المرضى الذين يكون سحب الدم منهم صعبا بسبب مشكلة معينة .لذلك يقدم تحليل اللعاب كسائل حيوي بديلا عن المصل للاغراض التشخيصية[10]. والمعروف سابقا ان اختبارات اللعاب كانت تستعمل لاكتشاف التهاب الكبد Hepatitis والتدرن Tuberculosis و تم حديثا إستخدام تقنيات حديثة ذات حساسية عالية لتحليل اللعاب جعلته اداة لتشخيص العديد من الحالات المرضية[11] مثل الامراض الفايروسية viral disease[12] و اصبح للعاب دور مهم في تشخيص خطر نخر الاسنان وامراض اللثة ، وكعلامة للكشف عن سرطان الشفة Oral cancer[13 , 14] و يستعمل تحليل اللعاب في تشخيص الاضطرابات الوراثية وامراض المناعة الذاتية autoimmune disease والامراض الخبيثة حيث تحصل الكثير من التغيرات في تركيب سائل اللعاب[15] ولقد تم اقتراح اللعاب كوسيلة لمراقبة مستويات الادوية كما هو الحال في سوائل الجسم الاخرى (المصل ، البول ، العرق) حيث وجد علامة واضحة بين تركيز الدواء العلاجي في المصل وبين تركيزه في اللعاب[16] علاوة على ذلك فقد استعمل اللعاب في مراقبة ومتابعة مستويات التعرض لدخان التبغ (السكائر) والتحري عن النيكوتين كمؤشر للتعرض لدخان التبغ [18 , 17] .

نظرا لقلة الدراسات المتعلقة بفصل وتنقية الانزيمات من لعاب مرضى السكري ،لذا فأن الدراسة الحالية شملت فصل وتنقية متناظرات انزيم الفوسفاتيز القاعدي من لعاب مرضى السكري غير المعتمد على الانسولين.

حيث ينتمي انزيم الفوسفاتيز القاعدي orthophosphate monoester phosphohydrolase[19] ، EC. 3.1.3.1 لصنف الانزيمات المحللة (hydrolases) التي تعمل على تحلل الفوسفات احادية الاستر phosphor monoester من الجزيئات العضوية مثل الرايبونيوكليوتيدات ribonucleotides والديوكسيرايبونيوكليوتيدات deoxy-ribonucleotides والبروتينات والقلويدات واسترات الفوسفات وانهيدريدات حامض الفوسفوريك [20] لانتاج الفوسفات اللاعضوي والكحول او الفينول او السكر[19] عند اس هيدروجيني قلوي ($pH = 7.5 - 11$)[23 , 22 , 21]

لذا يمكن قياس فعالية هذا الانزيم من خلال متابعة تراكيز الفوسفات اللاعضوي المتحررة ، وحديثا تم استخدام تقنية ELISA في قياس فعالية هذا الانزيم [25 , 24] ويعتبر هذا الانزيم اداة مهمة في التقنيات البايولوجية ومنها تقنيات الاستنساخ الجزيئي وتسلسل الـDNA[26].

العينات وطرائق العمل:

مجموعة السيطرة *Control group*

تم جمع (149) عينة لعاب من الاشخاص الاصحاء لكلا الجنسين منهم(80) اناثا و (69) من الذكور ، تراوحت اعمارهم من (8 –77) سنة .

المرضى *Patients*

الحالات المرضية لمرضى داء السكر جمعت من مستشفى تكريت التعليمي ، اذ جمع خلال الدراسة (181) عينة لعاب، (59) عينة من مرضى مصابين بداء السكر المعتمد على الانسولين Type1 و (122) عينة لعاب من المرضى المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين Type 2 ، وقد تراوحت اعمار الاشخاص لكلا النوعين من (12 – 80) سنة ولكلا الجنسين . وهؤلاء المرضى مشخصين سريريا من قبل الاطباء الاخصائيين ويراجعون المستشفى دوريا.

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 ، وتم حفظ العينات في 5°م .

تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي *ALP* في اللعاب *Estimation of alkaline phosphatase activity in saliva*

استعملت طريقة Kind & King[27] 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 . وتم حساب الفعالية للانزيم بوحدة I.U/L حسب المعادلة الاتية:

$$\mathbf{ALP\ (I.U/L)} = \frac{A_{test} - A_{control}}{A_{standard} - A_{blank}} \times 10 \times 7.1$$

اتبعت طريقة لوري Lowry method [28] لقياس تركيز البروتين في اللعاب او الجزء الناضح وبإستعمال البومين مصل البقر Bovin serum albumin (BSA) كبروتين قياسي .

فصل وتنقية انزيم ALP من لعاب مرضى داء السكر

تم تنقية انزيم ALP من لعاب مرضى داء السكر باستخدام الخطوات التالية:

1. الترسيب بكبريتات الامونيوم:

تم ترسيب بروتينات اللعاب باستخدام كبريتات الامونيوم بنسبة 30% ، حيث تم اضافة 2.4gm من كبريتات الامونيوم الى 8ml من اللعاب خلال فترة 45-60 دقيقة بوضع اللعاب في الثلج مع التحريك المستمر ،وبعد ذلك ذوب الراسب بـ6ml من المحلول المنظم 0.1M Tris – HCl pH 7.2 .

2. الفصل الغشائي (الديلزة) *Dialysis*

تعتبر اقدم واهم الطرق المستخدمة في تنقية الانزيمات ، وغايتها ازالة المتبقي من كبريتات الامونيوم المضافة لترسيب البروتينات بوضع البروتين المذاب في الخطوة اعلاه في كيس الفصل الغشائي dialysis bag بعد قياس فعالية انزيم ALP وتركيز البروتين، ويغمس الكيس في المحلول المنظم 0.1M Tris – HCl pH 7.2 ويغير المحلول المنظم من حين لاخر لمدة ليلة كاملة وتجرى هذه الخطوة في درجة حرارة 4°م للمحافظة على نشاط ALP .بعد انتهاء عملية الفصل الغشائي تم قياس فعالية ALP وتركيز البروتين.

3.تركيز البروتين المذاب

تم تركيز البروتين المذاب والمعزول بالخطوة السابقة بوضعه في كيس الفصل الغشائي وغُمس في بلورات السكروز لمدة تتراوح بين 30 – 45 دقيقة.

5.كروماتوغرافيا التبادل الايوني *Ion exchange chromatography*

استعملت تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام عمود الراتنج DEAE – Cellulose A50 لتنقية ALP من الجزء البروتيني المركز وفصل متناظراته . واجريت عملية الفصل بدرجات حرارية منخفضة (10- 15)°م.

6.الترشيح الهلامي *Gel filtration*

اساس عمل هذه التقنية الاختلاف في الوزن الجزيئي حيث استعملت لتنقية المتناظر المفصول بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستعمال عمود ترشيح هلام Sephadex G100 .

7. الترحيل الكهربائي على هلام الاكريل امايد بوجود SDS

***Sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)**

اتبعت طريقة Laemmli [29] في تحضير هلام الفصل والترحيل الكهربائي ،وذلك باستعمال(10%) من هلام اكريل امايد–بس اكريل امايد والصبغة Coomassie brilliant blue R250 .

النتائج والمناقشة

شملت الدراسة على (181) حالة مرضية لاشخاص مصابين بداء السكر بنوعيه وتراوحت اعمارهم بين (12 – 80) سنة، كما شملت الدراسة على (149)عينة من الاشخاص الطبيعيين اي انهم (سليمين ظاهريا) بوصفهم مجموعة مقارنة وتراوحت اعمارهم بين (8 – 77) سنة.

قياس فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في اللعاب *Assay of Alkaline phosphatase in saliva*

تم قياس ومقارنة فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في لعاب مرضى الاشخاص المصابين بداء السكر والاصحاء باستخدام طريقة(1954) Kind & king[27] . حيث يبين الجدول (1)

معدل فعالية ALP في لعاب المصابين بداء السكر لكلا النوعين Type 1 و Type 2 والاصحاء . وعند المقارنة احصائيا تبين وجود فروق معنوية بين فعالية الانزيم عند المرضى والاصحاء بمستوى احتمالية P = 0.000 وعدم وجود اختلاف بين نوعي المرض .

الجدول (1) فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي عند مرضى داء السكرلكلا النوعين والاصحاء

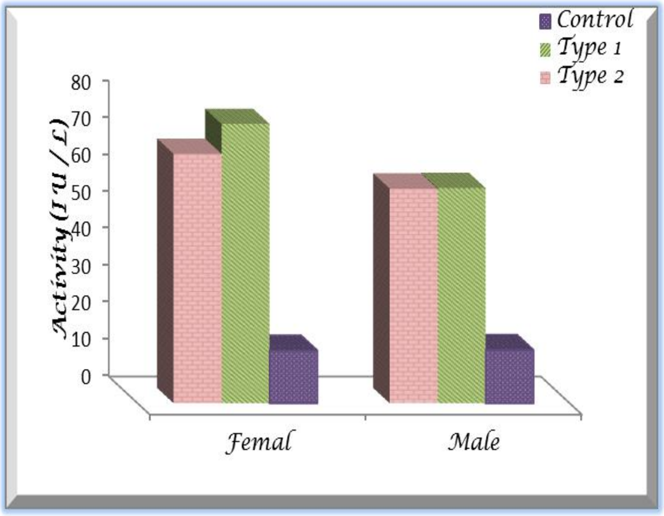
State	No.	Mean ± SE (I U / L)	P value
Control	149	14.29 ± 0.401	
Type 1	59	67.32 ± 4.36	0.000
Type 2	122	64.45 ± 2.26	0.000

و تشير النتائج بصورة عامة الى زيادة فعالية ALP في مصل دم المصابين بداء السكر كما في دراسة Maxwell وجماعته (1986)[30] والشريفي 2000[31] و Shaheen (2009)[32] وقد وجدت الصوفي 2004 ان فعالية ALP تزداد مع زيادة سكر الدم[33]. ان هذا الارتفاع في فعالية ALP يعود عادة الى العديد من الحالات المرضية كأمراض الكبد او القناة الصفراوية او وجود حصى في المرارة وقد يدل ارتفاع ALP الى امراض العظام Bone disease مثل Osteopenia او Osteoporous كذلك تسبب اضطرابات الدم ايضا زيادة في ALP بالاضافة لبعض الحالات السرطانية[34, 35, 36].

وتؤدي المستويات العالية للكلوكوز الى تلف الكبد[37] وذكر Naveed وجماعته (2009) ان الزيادة في نشاط الفوسفاتيز القاعدي لمصل الدم في حالة داء السكر يمكن ان تكون كنتيجة لنداء متزايد للطاقة خلال نشاط ALP بدلا من التحلل السكري ومسار اكسدة Glucose-6-phosphate والذي ينسب لتحلل وتلف خلايا الكبد[38] . ويعد ALP من الدلائل المستعملة بشكل واسع لايض العظام حيث يزود انطباع جيد عن مدى التشكيل العظمي الجديد ونشاط الهلايا البانية للعظم Osteoblast[39] ، حيث تعمل المستويات المرتفعة من كلوكوز الدم على حدوث اضطرابات عديدة للعظام ولاسيما امراض تنخر العظام[40 , 41] والتي تعتبر من الامراض الايضية للعظام مسببة قلة كتلة العظام bone mass او فقدان الكثافة المعدنية للعظام Bone mineral density(BMD)[42] حيث اوضحInaba وجماعته (2002) ان الزيادة في فعالية ALP لها علاقة مع متناظرات انزيمات الفوسفاتيز الموجودة في العظام[40] ، وقد افترض ان امراض العظام عند مرضى داء السكر ربما تعود الى ضعف في افراز هرمون جنب الدرقية (PTH) والذي له دور تثبيطي في انتاج التصلب[40 , 43].

وعند مقارنة الاصحاء ومرضى النوعين لداء السكر بين الذكور والاناث وجد ارتفاع نشاط الانزيم عند المرضى الاناث اكثر من الذكور المرضى وتشير النتائج الى وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ بين الذكور والاناث لمرضى كلا النوعين ، ويوضح الشكل (1) ذلك ، ويعود سبب ذلك ان الاناث اكثر عرضة لنخر العظام Osteoporosis من الذكور والذي يؤدي الى ارتفاع في مستوى ALP ويعتبر داء السكر من العوامل الخطرة المسببة لكسور العظام[44].

الشكل (1): فعالية انزيم ALP لمرضى داء السكر والاصحاء لكلا الجنسين



تنقية جزئية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي من لعاب مرضى داء السكر

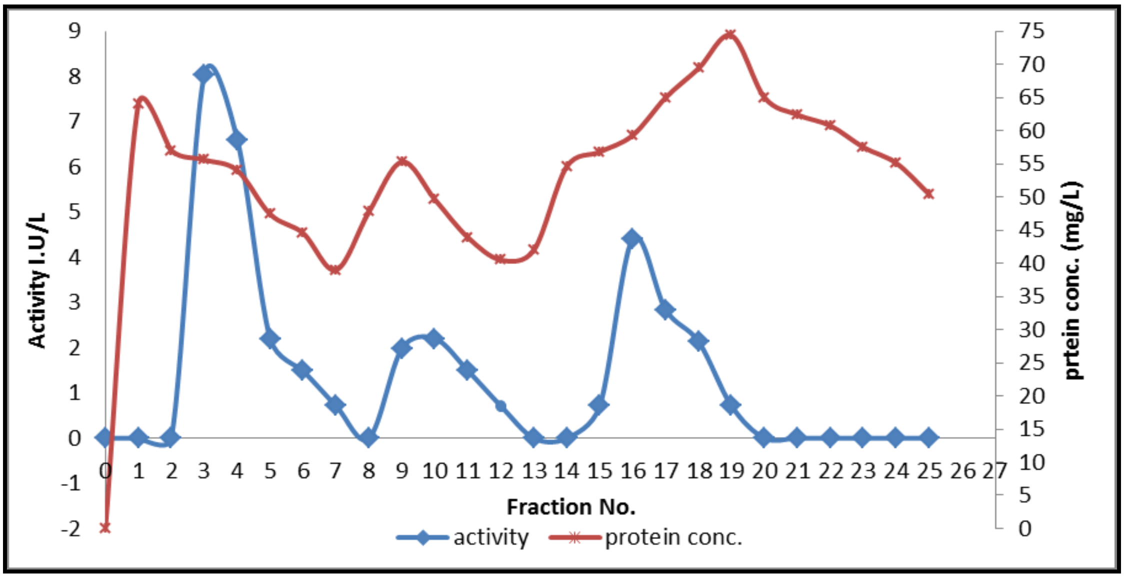
***Partial Purification of alkaline phosphatase from saliva of diabetic* Patients**

تمت عملية فصل وتنقية جزئية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي ومتناظراته من لعاب مرضى داء السكر بمراحل عدة ، ففي خطوات التنقية الاولى رُسب الانزيم باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بتركيز 30% لتركيز الانزيم والحصول على درجة من النقاوة ، وتم التخلص من الملح الزائد خلال عملية الفصل الغشائي dialysis بواسطة Tris-HCl ذو pH 7.2 حيث بلغت درجة تنقية الانزيم بهذه المرحلة 2.68 مرة وبحصيلة انزيمية 68.91% وبعدها تم فصل متناظرات انزيم ALP بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الايوني بإستخدام الراتنج DEAE-Cellulose A50 كمادة تعبئة للعمود ومحاليل متدرجة من كلوريد الصوديوم ، حيث تعد كروماتوغرافيا التبادل الايوني احدى الطرق المتبعة لفصل وتنقية الانزيمات والتي تعتمد على مبدأ اختلاف الشحنة للمتناظرات حيث تم الحصول على ثلاثة متناظرات كما موضح في الشكل (2) وبدرجات نقاوة متفاوتة اذ بلغت درجة التنقية للمتناظر I (4.51) مرة وللمتناظر Π (3.44) مرة اما المتناظر III فبلغت تنقيته (3.844) مرة ، كما موضح في الجدول (2) .

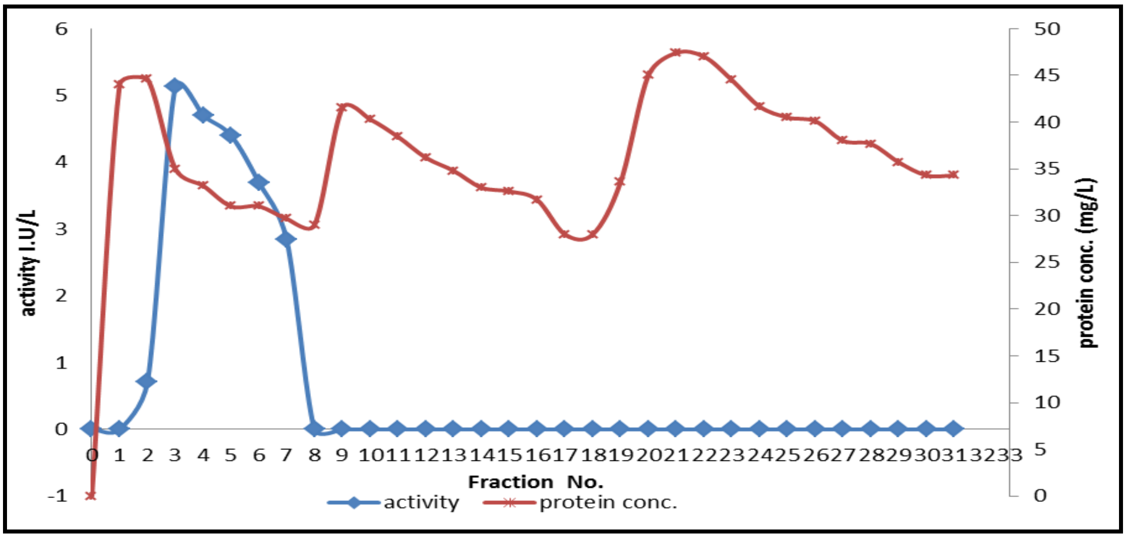
وجاءت نتائج هذه الدراسة بالحصول على ثلاثة متناظرات من لعاب مرضى السكري متطابقة مع ما توصل اليه Sarma وجماعته (2009) بفصل ثلاث متناظرات لانزيم ALP من نسيج امعاء الانسان والذي عزى المتناظر I من النوع غير المتخصص Tissue non-specific ALP والمتناظرΠ نوع المتناظر المعوي Intestine ALP اما المتناظرIII فيتواجد في المشيمة لذا وصفه من نوع المتناظرالمشيمي Placental ALP[45] ولكون المصدر الخام للانزيم بالدراسة هو اللعاب الذي يحوي على مصادر عدة للانزيم استخدم المتناظر I الغير متخصص لاكمال مراحل التنقية اللاحقة. حيث اجريت تنقية المتناظر I (الغير متخصص) باستعمال طريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sphadex G100 حيث تم الحصول على قمة منفردة للمتناظر المنقى كما موضح في الشكل (3) بدرجة تنقية وصلت الى 6.5 مرة وبحصيلة انزيمية 26.7% وكما موضح في الجدول(2).

وعند استخدام طريقة الفصل بالترحيل الكهربائي على هلام SDS-PAGE بتركيز 10% وبإستعمال صبغة Coomassie blue R250 أظهر المتناظر المفصول بطريقة التبادل الايوني وطريقة الترشيح الهلامي حزمة منفردة وفي الموقع ذاته كما موضح في الشكل (4). ان الانزيم يحمل شحنة سالبة حيث انجذب نحو القطب الموجب اذ تعتمد حركة البروتين في الهلام بالدرجة الرئيسية على الشحنة التي يحملها ويلي ذلك حجم وشكل البروتين حيث تمت هجرة بروتين الانزيم في رقم هيدروجيني 8.3 ضمن مجال كهربائي بين القطب الموجب والسالب بالاعتماد على العوامل المذكورة[46, 47, 48].

الشكل(2): :فصل متناظرات انزيم ALP اللعابي من مرضى داء السكر باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني

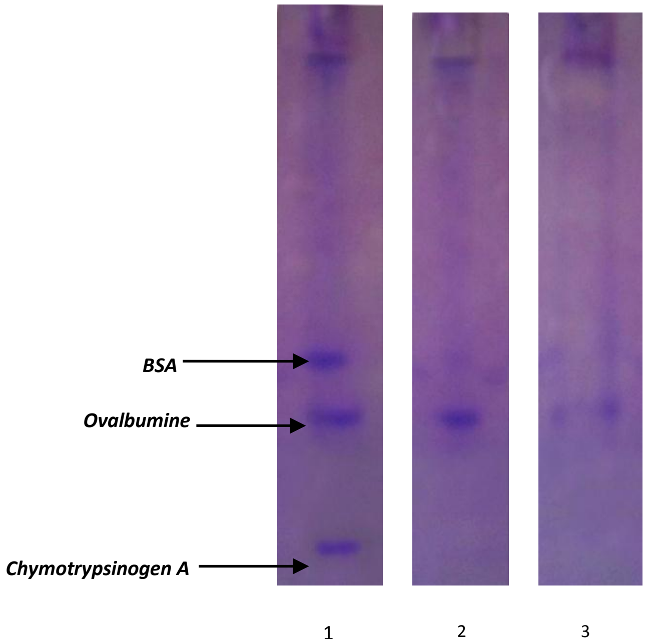


الشكل(3): :تنقية المتناظر I بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي



الجدول(2): فصل وتنقية متناظرات ALP جزئيا من لعاب مرضى داء السكر

Step	Activity (I U/L)	Total activity I U	Protein conc. mg/L	Total protein mg	Specific activity I U/mg	purification Fold	Yield %
Crud saliva	24.912	0.137	779	4.285	0.032	-	100
Ammonium sulphate	23.43	0.082	435.4	1.524	0.054	1.69	59.9
Dialysis	31.453	0.0944	367.303	1.102	0.0856	2.68	68.9
Concetrated	39.476	0.079	395.81	0.792	0.0997	3.12	57.7
DEAE-Cellulose							
Isoenzyme - I	8.023	0.0241	55.614	0.2781	0.1443	4.15	17.6
Isoenzyme - Π	5.822	0.0175	55.3	0.166	0.11	3.44	12.8
Isoenzyme - Ш	7.313	0.022	59.3	0.178	0.123	3.84	16.1
Gel filtration G100	7.313	0.0366	35	0.175	0.209	6.5	26.7



(1) البروتينات القياسية ، (2) انزيم ALP المنقى بخطوة الترشيح الهلامي ، (3) انزيم ALP المفصول بخطوة التبادل الايوني

الشكل (4) الترحيل الكهربائي لانزيم ALPالمفصول

المصادر

1. American Diabetes Associated (2006) "Diagnosis and classification of diabetes mellitus" *Diabetes care*; 29: 543 – 58.

2. World Health Organization Expert Committee (1999) "Definition Diagnosis and classification of diabetes mellitus and it's complication " Report of a WHO consultation. Part 1 :Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva.

3. سمين ، ليث حمزة. (2001) ماذا تعرف عن مرض السكري. مجلة الصيدلي،العدد(11) ، الصفحة 23 – 25.

4. Ali, Y.S. and David, J.M. (2006) "Screening for coronary disease in diabetes: when and how" *Clinical diabetes*; 24:169 – 173.

5. Fowler, M.J. (2007) "Classification of diabetes :not all hyperglycemia is the same" *Clinical diabetes*; 25: 74 – 76.

6. Kimmel, B. and Silvio, E.I. (2005) "Oral agents for typ 2 diabetes an update" *Clinical diabetes* ; 23(2): 64 – 76.

7. Bell, R.H. and Hye, R.J. (1983) "Current research review animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology" *J. Surg. Res.*; 35:433 – 460.

8. Zimmet, P. (2000) "Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be aveted?" *J. Intern Med.*; 247: 301 – 310.

9. Malamud D. (1992) "Saliva as a diagnostic fluid". *Br Med J*; 305:207-18.

10. Bailey, B., Klein, J., Koren, g. (1997) "Noninvasive methods for drug measurement in pediatrics" *Pediatr Clin. North Am.* ; 44(1):15 – 26.

11. Ghalautp, P., Ghalaut, V., Yadav, S., Lekhvani, S. (2010) "Diagnostic application of saliva" *Journol of clinical and diagnostic research*; 4:2330 – 2336.

12. Parry, J.V., Parry, K.R., Panday, S., Mortimer, p.p. (1989) "Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva" *J. Med. Virol*; 28:255 – 60.

13. Hu, S., Arellano, M., Boontheung, P., Wang, J., Zhou, H., Jiang, J., Elashoff, D., Wei, R., Loo, J.A. and Wong, D.T. (2008) "Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery" *Clin. Cancer Res*. ;14(19): 6246 – 6252.

14. Li, Y., John, M., Zhou, X., Kim, Y., Sinha, U., Jordan, R., Eisele, D., Abemayor, E., Elashoff, D., Park, N.H. and Wong, D. (2004) "Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection" *Clin. Cancer Res*. ;10(24): 8442 – 50.

15. Fox, PC. (1989) "Saliva composition and importance in dental health" *compend suppl*; 13:457 – 460.

16. Drobitch, R.K. and Svensson, C.K. (1992) "Therapeulic drug monitoring in saliva" An update. *clin pharmacokinet*; 23: 365 – 379.

17. Benowitz, N.L. (1983) "The use of biologic fluid samples in assessing tobacco smoke consumption *NIDA Res. Monogr*; 48:6 – 26.

18. Repace, J.L., Jmot, J., Bayard, S., Emmons, K. and Hamond, S.K. (1998) "Air nicotine and saliva cotinine as indicators of work place passive smoking exposure and risk" *Risk Anal*; 18: 71 – 83.

19. Martins, M.J., Negrao, M.R. and Hipolito-Reis, C. (2001) "Alkaline phosphatase from rat liverand kidney is differentially modulated" *Clin. Biochem*.; 34(6): 463 – 468.

20. Holander, V.P.(1971) "Acid phosphatase" In enzymes P.D. Boyer (Ed), Academic press, New York, Vol.4, pp. 450 – 498.

21. Robert, R.B. and Evan, R.K. (2003) "Characterization of monomeric *E-coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution" *J. Biol.Chem*., 278:23497 – 23501.

22. Dhakad, R.K., Alam, S.I., Dixit, A. and Singh, L. (2005) "Purification and characterization of thermo-labile alkaline phosphatase from an antractic pyschrotolerant *Bacillus sp*. P9" *Enzyme and Microbiol Technology*; 36:855 – 861.

23. Gong, N., Chen, C., Xie, L., Chen, H., Lin, X. and Zhang, R.(2005) "Characterization of a thermostable alkaline phosphatase from a novel species *Thermus yunnanensis sp*. Nov. and investigation of its cobalt activation at high temperature" *Biochim Biophys Acta*.; 1750(2):103 – 11.

24. Chen, C.C., Tai, Y.C., Shen, S.C., Tu, Y.Y., Wu, M.C. and Chang, H.M.(2006) "Detection of alkaline phosphatase by competitive indirect ELISA using immunoglobulin in yolk (Igy) specific against bovine milk alkaline phosphatase " *Food chemistry* ; 95:213 – 220.

25. Sun, L., Ghosh, I., Barshevsky, T., Kochinyan, S. and Xu, M.Q. (2007) "Design preparation and use of ligated phosphoroteins :A novel approach to study protein phosphatase by dot blot array , ELISA and Western blot assays" *Methods*;42: 220 – 226.

26. Pereira, M., Pereira, H.J., Thedei, G., Rossi, A., Martinez-Rossi, N.H. (1995) "Purification of *Neurospora crassa* alkaline phosphatase without DNAase activity for use in molecular biology" *World J. Microbiol Biotechnol*.; 11:505 – 507.

27. Kind, P.R. and King, E.G. (1954) "Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino antipyrine" *J. Clin. Path*.; 7: 322 – 326.

28. Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L. and Randall, J. (1951) "Prtein measurement with the Folin-phenol reagent" *J. Biol. Chem*.; 193: 265 – 275.

29. Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T_4" *Nature*; 227: 680 – 685.

30. Maxwell, D. B., Fisher, E.A., Ross-Clunis, H.A., Estep, H.L. (1986) "Serum alkaline phosphatase in diabetes mellitus" *J. Am. Coll. Nutr*.;5(1):55 – 9.

31. الشريفي ،غسق عبدالجبار (2000) "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

32. Shaheen, A., Khattak, S., Khattak, A.M., Kamal, A., Jaffari, S.A., Sher, A.(2009) "Serum alkaline phosphatase level in type2 diabetes mellitus and it's relation with periodontitis" *Kust Medical Journal*; 1(2):51 – 54.

33. الصوفي، ايمان سمير محمد (2004)"دراسة مقارنة لفعالية بعض الانزيمات والعناصر الضئيلة في دم الاشخاص

المصابين بداء السكر والاصحاء في مدينة الموصل "
رسالة ماجستير.كلية العلوم/جامعة الموصل.

34. Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwall, V.W. and Cranner, D.K. (1985) "Harpers review of biochemistry" 20th ed. Lange Medical Publication Los Altos, California.

35. Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. and Loscalzo, J. (2008) "Harrison's principles of internal medicine" 17th ed.

36. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. and Aster, J. (2009) "Robbins and cotran pathologic basis of disease" 18th ed.

37. Evliyaoglu, O., Kibrisli, E., Yildirim, Y., Gokalp, O., Colpan, L.(2011) "Routine enzymes in the monitoring of type 2 diabetes mellitus" *Cell Biochem Funct.*; 29(6):506 – 12.

38. Naveed, N., Tayyib, M., Farooq, M., Riaz, R.M., Ditta, A. and Anwar,S. (2009) "Biochemical evaluation of effects of diabetes mellitus on excretory function of liver" *Pakistan Journal of Medical & Health Sciences* ; 3(1).

39. Elhabashy, S.A., Said, O.M., Agaiby, M.H., Abdelrazek, A.A. and Abdelhamid, S. (2011) "Effect physical exercise on bone density and remodeling in Egyption type1 diabetic Osteopenic adolescents" *Diabetology & Metabolic syndrome*; 3:25.

40. Inaba, M., Nagasu, K., Okino, S. and Ueda, M. (2002) "Impaired secretion of parathyroid hormone in hemodialyzed pateints with diabetes mellitus" *Am. J. Kidne*; Dis 39:1269 – 1272.

41. Koimeda, Y. and Inaba, M. (2002) "Diabetic Osteoporosis" *Nippon Rinsho*; 60:459 – 467.

42. Kanis, J.A., Melton, L.J., Christiansen, C., Johnston, C.C., Khaltaev, N. (1994) "The diagnosis of Osteoporosis" *J. Bone Miner. Res.*; 9:1137 – 1141.

43. Garcia-Martin, A., Rozas-Moreno, P., Reyes-Garcia, R., Morales-Santana,S., Garcia-Fontama, B., Garcia-Salcedo, J.A. and Munoz-Torres, M. (2011) "Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type2 diabetes mellitus" *JCEM*; jc:2011 – 2186.

44. Issa, C., Zantout, M.S. and Azar, S.T. (2011) "Osteoporosis in men with diabetes mellitus" *J. Osteoporos.*, 2011: 651867.

45. Sarma, P.V.G.K., Prasad, O.H., Prasad, U.V., Reddy, M.M., Reddy, M.K.S. and Subramanyam, G. (2009) "Purification and characterization of human iiintestinal alkaline phosphatase and it's role in the colonization of Helicobacter pylori in the duodenum" *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*; 3(4):389 – 395.

46. Blackshear, P.J.(1984) "System for polyacrylamide gel electrophoresis" In: Methods in enzymology (ed. W.B. Jakoby) Academic Press- NewYork, 104:237 – 256.

47. Westermeier, R., Fichman, J., Gronon, S., Schickle, H., Beling, G. and Weisner, P. (1997) "Electrophoresis in practice ,Aguide to methods and applications of DNA and protein separation" 2nd ed. , VCH. Germany.

48. Aberomand, M., Rahim, F., Hosseini, S.A. (2008) "Study of alkaline phosphatase from human hydatidiform mole" *Pak. J. Med. Sci.*; 24(3):471 – 474.