تحضير احد مشتقات الكلوكوز كدواء مصاحب ودراسة تأثيره على فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئياً من امصال دم المرضى المصابين بداء السكري

محمد عبود محمد ، هناء كائن صالح ، فراس طاهر ماهر
قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

هدفت الدراسة الحالية الى تحضير دواء مصاحب من سكر الكلوكوز و دواء الآيبوبروفين عن طريق تفاعل الاسترة ، و التنقية الجزئية لإنزيم الفوسفاتيز القاعدي من أمصال دم المصابين بداء السكر ، وتمثل خطوات تحضير المركب :

1- تفاعل الأسترة لمجاميع الهيدروكسي في المركب الحامل الكلوكوز مع كلوريد الحامض للآيبوبروفين .

2- شخصت الصيغة التركيبية للمركب المحضر باستخدام الطرق الطيفية المتاحة (^{1}H-NMR,FTIR).

3- قياس فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل دم المصابين بداء السكر و مصل دم الأصحاء . بينت الدراسة وجود ارتفاع معنوي عالي عند مستوى احتمالية ($P\leq 0.01$) فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في الأشخاص المصابين بداء السكر مقارنة مع الأشخاص الأصحاء .

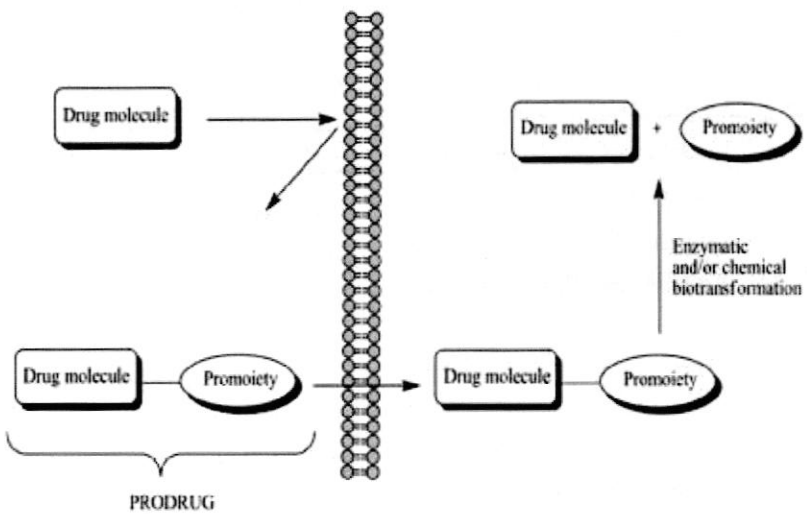
4- استخدمت تقنية الترشيح الهلامي باستعمال عمود الهلام Sephadex G100، لتنقية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي من أمصال الأشخاص المصابين بداء السكر.

5- قدرت فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي بوجود وعدم وجود المركب المحضر خارج الجسم حيث أوضحت النتائج حصول انخفاض في فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي مع زيادة تركيز المركب المحضر.

6- درس نوع التثبيط للمركب المحضر على إنزيم الفوسفاتيز القاعدي وكان التثبيط من النوع غير تنافسي.

المقدمة

تعرف الادوية المصاحبة على انها مركبات علاجية غير فعالة (خاملة دوائياً) تتحول إلى شكل فعال أيضياً . وهو بذلك يختلف عن الأدوية الناعمة (soft drugs) التي تكون فعالة بحد ذاتها لكنها تتحول إلى شكل غير فعال أيضياً [1] . وهي مصطلح صيدلائي يشير إلى المركبات غير الفعالة التي تتحول تلقائياً أو بوجود الإنزيم إلى أدوية ذات فعالية طبية وصيدلائية بعد امتصاصها من قبل النسيج في العضو المصاب داخل جسم الكائن الحي ، وحسب نظام الاتحاد الدولي للكيمياء التطبيقية فإنّ الدواء المصاحب يعرف بإنّه المركب الذي يعانى تحولا حيائيا قبل إنّ يظهر تأثيره الصيدلائي [2]. ويوضح المخطط (1) أدناه كيفية تكوين وتحرير الدواء المصاحب prodrug .



مخطط (1) تكوين وتحرر الدواء المصاحب Prodrug [3].

نوقشت العديد من المقترحات لتحوير أصل جزيئة الأدوية المضادة للالتهابات غير الستيرويدية NSAIDs ليتم التقليل من التأثيرات الجانبية الضارة ، ومن أكثر المقترحات تداولاً هي الأدوية المساعدة الفموية [4]. ان الأساس العلمي لمفهوم الأدوية المساعدة هو تحقيق الحجز المؤقت لمجموعة الكاربوكسيل الحرة الموجودة في NSAIDs إلى ان يتم امتصاصها ، ويعتقد بان جميع NSAIDs تثبط البناء

الحيوي للبروستوكلاندينات Prostaglandins بواسطة تثبيط مجموعة الانزيمات المسماة Cyclooxygenase (COX) . وفي عام 1990 تم اكتشاف اثنين من نظائر COX وهما COX-1 المكون (المؤسس) و COX-2 المستحدث إنّ التهيج الموضعي للأغشية المعدية المخاطية بواسطة مجموعة الكاربوكسيل الحرة للآيبوبروفين يعتبر عامل مهم في تحديد التآكل السطحي للمعدة [5].

وهكذا فإنّ الأخفاء المؤقت لهذه المجموعة يعطي بعض الارتياح للمريض من تهيج القناة الهضمية وبهذا فإنّ مقترح الدواء المصاحب هو التقنية الأكثر ملائمة لهذا الغرض. و اهتمت الدراسات الحالية على التحويرات المختلفة للآيبوبروفين للتقليل من تأثيراته الجانبية المعدية دون تأثير على الإمكانيات الحياتية[4].

يعرف داء السكري بانه اضطراب أيضي ناتج عن أسباب متعددة تشخص من خلال فرط سكر الدم hyperglycemia الذي يكون مترا فقآ مع حدوث خلل في أيض الكاربوهيدرات والدهون والبروتينات ، و ينتج عند حصول انخفاض في مستوى أفراز الانسولين او انخفاض في فعاليته او كليهما،ويعد داء السكري أحد الأمراض المزمنة الأكثر شيوعآ، ويرتبط أيضآ بزيادة الدهن في الدم وعوامل أخرى ، مثل السمنة وارتفاع ضغط الدم [6] .ان الأختلال الوظيفي لجزر لانكرهانس ومقاومة الانسولين المحيطي تتواجد عند مرضى من داء السكري [7] .

ينتمي انزيم الفوسفاتيز القاعدي [EC.3.1-3.1] إلى صنف الانزيمات المميئة إذ له القدرة على تحليل انواع كثيرة ومختلفة من أسترات الفوسفات العضوية لانتاج الفوسفات اللاعضوي والكحول او الفينول او السكر في المحيط القاعدي (pH=9-10) [8]ويُعد انزيم الفوسفاتيز القاعدي من الانزيمات غير المتخصصة إذ يتفاعل مع عدة مواد أساس ، وهو من الانزيمات المستقرة جدا[9]، إذ يبقى محتفظاً بنشاطه لستة أشهر عند 4 م° وبوجود المحلول المنظم 5mM Tris-HCl ، أما عند خزنه في 25م° فانه يحتفظ بنشاطه لمدة عشرة أيام[10]. والفوسفاتيز القاعدي متفاوت في الأوزان الجزيئية [11]. يتواجد انزيم الفوسفاتيز القاعدي بتراكيز عالية في الكبد و العظام والأمعاء والمشيمة والكلى والطحال وخلايا الدم البيض لكن المصدر الأساسي له هو الكبد والعظام [12].

المواد وطرق العمل:

تحضير كلوريد الايبوبروفين

أضيف (2.00) مل من كلوريد الثايونيل إلى (2.00 غم) (9.6) ملي مول من حامض الكاربوكسيلي الايبوبروفين صعد المزيج لمدة ساعة واحدة بواسطة حمام مائي . قُطرت الزيادة من كلوريد الثايونيل باستعمال الضغط المخلخل [13].

تحضير المشتق الأستيري للآيبوبروفين

أذيب (0.324 غم ، 1.8ملي مول) من الكلوكوز في(2 مل) من Dimethylformamide (DMF) مع التسخين قليلاً ثم اضيف له (2.5 مل) من Triethylamine (Et_3N) . وتم إضافة (5) مول من محلول كلوريد الحامض لكل مول واحد من محلول السكر المحرك مغناطيسياً قطرة فقطرة بوساطة قمع فصل إذ تغير اللون من محلول رائق الى قهوائي غامق مائل للأسود وترك المزيج للتحريك لمدة 24 ساعة لإتمام التفاعل .

وقد تم الحصول على راسب جيلاتيني مائل للأسود بعد إذابته وترسيبه بالماء لعدة مرات ثم ترك الراسب ليجف وتم الحصول على بلورات لماعة مائلة إلى القهوائي الغامق من المركب الناتج .

تحضير تراكيز من المادة المحضرة (Prodrug)

باستعمال DMSO كمذيب تم تحضير ($1x10^{-3}$) مولاري من المادة المحضرة وذلك بإذابة (0.002)غم من المادة المحضرة في (30) مل من DMSO وبأستخدام قانون التخفيف تم تحضير التراكيز الأخرى وهي :

($1x10^{-4}$, , $1x10^{-5}$, $1x10^{-6}$, $1x10^{-7}$, $1x10^{-8}$, $1x10^{-9}$) مولاري .

وقد تم قياس فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي(*in vitro*) مع المذيب DMSO فقط وبدون الدواء المحمل ثم مع المحاليل المحضرة .

جمع النماذج Samples collection

تم جمع عينات مصل الدم للأشخاص الأصحاء ومن كلا الجنسين وبلغ عددهم (25) عينة ، وتم جمع عينات مصل الدم للأشخاص المصابين بالداء السكري ومن كلا الجنسين وبلغ عددهم (35) عينة مرضية ومن كلا نوعي داء السكري (النوع الأول والنوع الثاني) ، وقد تم تشخيص المرض باستخدام فحص مستوى السكر في الدم.

تم سحب الدم من الوريد باستخدام حقنه بلاستيكية بحجم (5) مل وذات استعمال واحد وضع الدم في أنابيب بلاستيكية (Plain tubes) نظيفة ومعقمة وخالية من مادة EDTA المانعة للتخثر وتُترك ليتخثر في درجة حرارة الغرفة ، بعدها فُصل مصل الدم عن الجزء المتخثر بجهاز الطرد المركزي (Centrifuge) وبسرعة (3000) دورة/الدقيقة لمدة (15) دقيقة لضمان الحصول على قدر كاف من المصل الخالي من أثار كريات الدم الحمراء، وبعد ذلك سُحب مصل الدم باستخدام ماصة دقيقة. وقيست فعالية الإنزيم مباشرة (تمت الدراسة خارج الخلية الحية) (*in vitro*) .

تقدير تركيز إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم

استعملت طريقة Kind and King [14] . في تقدير فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في المصل المتضمنه اضافة فوسفات الفنيل وهي المادة الأساس لعمل الأنزيم ليتحرر الفينول نتيجة تأثير الإنزيم على المادة الاساس وبالتالي يتكون معقد الكوينون الأحمر اللون اذ تتناسب شدة اللون طردياً مع فعالية الإنزيم وتم حساب الفعالية للإنزيم بوحدة I.U/L حسب المعادلة الآتية :-

$$\text{ALP U/L} = \frac{\text{A serum sample - A serum blank}}{\text{A standard}} \times 142$$

دراسة نوع التثبيط لانزيم الفوسفاتيز القاعدي Study the Type of inhibition for ALP

تم دراسة نوع التثبيط لانزيم الفوسفاتيز القاعدي إذ تم تخفيف تراكيز مختلفة من المادة الاساس

ISSN:1813 – 1662

(DPP) Disodium phenyl phosphate لانزيم الفوسفاتيز القاعديALP ،وتم تحضير سبعة تراكيز مختلفة من المادة الاساس .

جدول (1) التراكيز المختلفة من المادة الأساس (DPP)

ت	التركيز
1	5µmol/l
2	4µmol/l
3	3µmol/l
4	2 µmol/l
5	1.5 µmol/l
6	0.75µmol/l
7	0.5µmol/l

طريقة العمل procedure

هي طريقة العمل المتبعة لـ ALP نفسها ، لكن تم في كل فحص إضافة تركيز مختلف من التراكيز المخففة من المادة الاساس يتم اضافتها بدل R_1 .

تقدير مستوى تركيز البروتين الكلي في مصل الدم

استخدمت طريقة لوري (Lowry method) [15] لتقدير تركيز البروتين في مصل الدم .

فصل وتنقية جزئية لإنزيم ALP من مصل مرضى داء السكري

تم تنقية إنزيم ALP من مصل مرضى داء السكري باستخدام الخطوات التالية:

التشبع بكبريتات الامونيوم Saturation of ammonium sulphate

تم ترسيب بروتينات المصل باستخدام تراكيز متدرجة من كبريتات الامونيوم لحين الوصول لنسبة إشباع 55% ، إذ تم اضافة 2.75gm من كبريتات الامونيوم الى 5 مل من المصل خلال مدة (45 - 60) دقيقة بوضع المصل في حمام ثلجي مع التحريك المستمر ، وبعد ذلك تم إذابة الراسب بـ 4ml من المحلول المنظم 0.1M Tris – HCl pH 7.2 .

الفصل الغشائي (الديلزة) Dialysis

وهي من أهم الطرق المستخدمة في تنقية الإنزيمات وأقدمها، و الغاية منها إزالة 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 وقد تم تغيير المحلول المنظم من حين لأخر لمدة ليلة كاملة ، أجريت هذه الخطوة في درجة حرارة 4م° للمحافظة على فعالية ALP وبعد انتهاء عملية الفصل الغشائي تم قياس فعالية ALP وتركيز البروتين.

الترشيح الهلامي Gel filtration

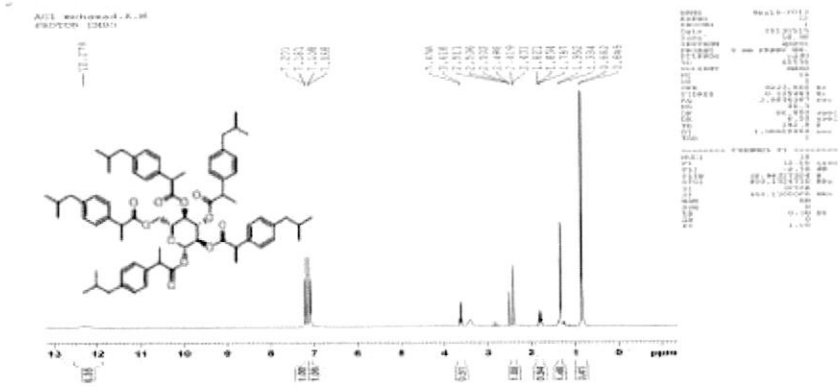
اساس عمل هذه التقنية الاختلاف في الوزن الجزيئي، اذ استعملت لتنقية المتناظر المفصول بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود ترشيح هلام Sephadex G100 اذ جمع 20 Fraction حجم كل Fraction 5 مل .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

تتضمن محورين رئيسيين: الجزء العضوي ألذي يتضمن تحضير الدواء المصاحب والجزء الحياتي ألذي يشمل التنقية الجزئية لانزيم الفوسفتيز القاعدي من مصل دم الاشخاص المصابين بداء السكري و دراسة تأثير الدواء المصاحب المحضر على الانزيم المنقى جزئياً .

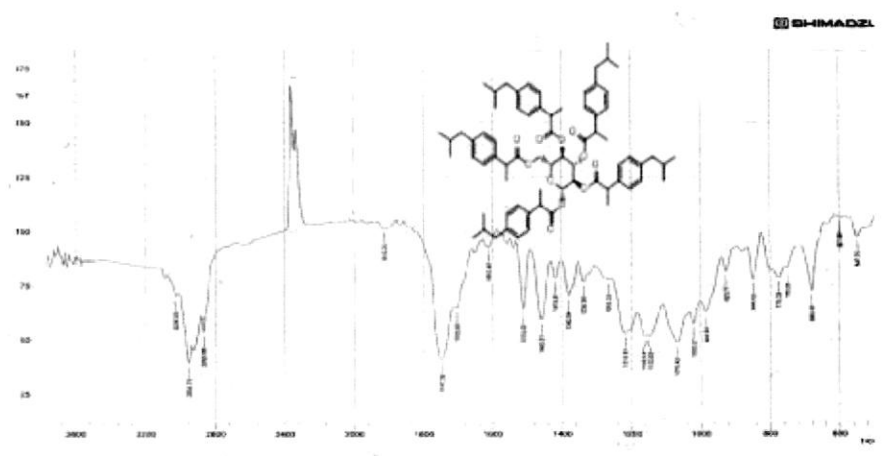
تحضير الدواء المصاحب الاستري للآيبوبروفين (AA) Synthesis of ester prodrug of Ibuprofen

شخص المركب المحضر بتقنية 1H-NMR وقد تم القياس بوحدات الدلتا δ المعتمدة والتي عبر عنها بـ (ppm) حيث اتضح ظهور الإشارة الرنينية الثنائية عند ppm (0.85) التي تعود إلى بروتونات مجموعة CH_3 الأليفاتية وظهور إشارة رنينية ثنائية عند ppm (1.3) والعائدة إلى بروتونات مجموعة CH_3 المرتبطة بـ CH للحلقة الاروماتية أما الإشارة الرنينية الظاهرة عند ppm (1.8) فهي تعود إلى بروتونات مجموعة CH المرتبطة بمجموعتي CH_3 وظهور إشارة ثنائية عند ppm (2.4) تعود الى بروتونات مجموعة CH_2 المرتبطة بـ CH و الحلقة الاروماتية وظهور الاشارة عند ppm (2.5) تعود الى المذيب DMSO ، كما ظهرت الإشارة الرنينية الثنائية عند ppm (2.83) والتي تعود إلى بروتونات مجموعة CH_2O التابعة لسكر الكلوكوز أما الإشارة الرنينية عند ppm (3.62) فهي تعود لبروتونات مجموعة CHCO المرتبطة بمجموعة CH_3 العائدة لعقار الآيبوبروفين وظهور إشارة رنينية رباعية عند ppm (7.14) تعود إلى بروتونات الحلقة الاروماتية العائدة لعقار الآيبوبروفين وظهور إشارة رنينية عند ppm (12.27) والتي تعود إلى بروتونات مجموعة CHO العائدة لحلقة سكر الكلوكوز، كما موضح في الشكل (1) .



الشكل (1) طيف الرنين النووي المغناطيسي للمركب المحضر

كما تم التأكد من الصيغة البنائية للمركب المحضر من خلال تقنية الأشعة تحت الحمراء(FTIR) حيث اتضح من خلال الطيف اختفاء حزمة مجموعة OH والذي يدل على اشتراك جميع مجاميع الهيدروكسيل الأولية والثانوية لسكر الكلوكوز بتفاعل الأسترة حيث ظهرت حزمة متوسطة عند 3028 Cm-1 تعود الى الإهتزاز الإمتطاطي للأصرة (=C—H) الأروماتية كما ظهرت حزمة عند 2954 Cm-1 تعود الى الأهتزاز الأمتطاطي للآصرةC—H الأليفاتية إضافة الى ذلك ظهرت حزمة واضحة عند 1747 Cm-1 والتي تعود الى الأهتزاز الأمتطاطي لمجموعة كاربونيل الأستر، كما موضح في الشكل (2) .

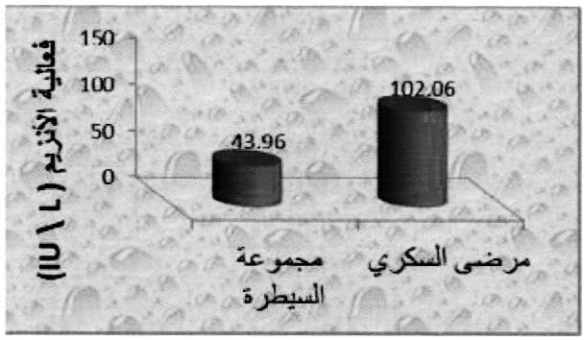


الشكل (2) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب المحضر

<u>قياس فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في أمصال الأشخاص الأصحاء والمصابين بالداء السكري</u>

تم قياس فعالية انزيم ALP في أمصال المصابين بداء السكري والأصحاء باستخدام طريقة (Kind&King 1954)[14] . في أمصال 35 حالة مرضية مصابة بالداء السكري ، وبلغ معدل فعالية الانزيم IU/L (102.06±24.09) ، وبلغ مستواه في أمصال الأشخاص الأصحاء بمعدل فعالية IU/L (43.96±8.23) لـ 25 متطوع ، وقد لوحظ عند مقارنة مستوى فعالية انزيم ALP في أمصال دم المصابين مع مستواه في أمصال الأشخاص الأصحاء حدوث ارتفاع في فعالية الانزيم بقيمة معنوية عالية عند مستوى احتمالية ($P\leq 0.01$) عند مرضى الداء السكري و كما موضح في الشكل (3) ، وتشير النتائج بصورة عامة الى زيادة فعالية انزيم ALP في مصل دم المصابين بداء السكري كما في دراسة الشريفي (2000) اذ اثبتت وجود زيادة في فعالية انزيم ALP في مصل دم المصابين بداء السكري[16]. واظهر Shaheen وجماعته (2009) هناك زيادة في مستوى ALP المصلي في مرضى داء السكري [17] و Kalburgi وجماعته (2010)[18] ،واثبتت الطائي (2012) ان فعالية ALP تزداد في لعاب المصابين بداء السكري [19] . ان هذا الارتفاع في فعالية ALP يعود عادةً الى العديد من الحالات المرضية كأمراض الكبد او القناة الصفراوية او وجود حصى في المرارة ، وقد يدل ارتفاع ALP الى امراض العظام مثل Osteopenia او Osteoporous ، وكذلك تسبب اضطرابات الدم ايضاً زيادة في ALP [20] . وان الزيادة في نشاط ALP لمصل الدم في حالة داء السكري يمكن ان تكون كنتيجة لنداء متزايد للطاقة خلال نشاط ALP بدلاً من التحلل السكري ومسار أكسدة Glucose-6-phosphate والذي يسبب لتحلل وتلف خلايا الكبد [21]. كما تعمل المستويات المرتفعة من كلوكوز الدم على حدوث

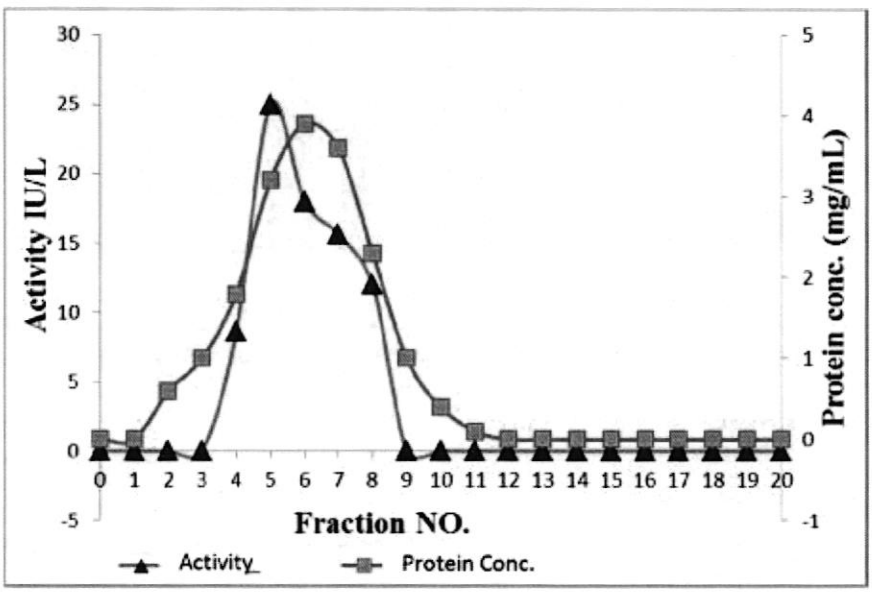
اضطرابات عديدة للعظام ولا سيما امراض تنخر العظام التي تعتبر من الامراض الايضية للعظام والتي تسبب زيادة ALP [22]. وقد افترض ان امراض العظام عند مرضى السكري ربما تعود الى ضعف في افراز هرمون جنب الدرقية (PTH) والذي له دور تثبيطي في انتاج التصلب [23].



الشكل (3) فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في الاشخاص المصابين بداء السكري مقارنة مع الاشخاص الاصحاء

التنقية الجزئية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي من أمصال دم مرضى داء السكري

تمت عملية فصل وتنقية جزئية لانزيم ALP من أمصال مرضى داء السكري بمراحل متعددة ، ففي خطوات التنقية الاولى رسب الانزيم باستخدام ملح كبريتات الأمونيوم بتركيز إشباع 55% لتركيز الانزيم والحصول على درجة من النقاوة وتم التخلص من الملح الزائد خلال عملية الفصل الغشائي Dialysis بواسطة Tris-HCl ذي pH 7.2 إذ بلغت درجة تنقية الانزيم بهذه المرحلة 2.8 مرة وبحصيلة انزيمية 58% كما مبين في الجدول (2) ، ثم اكملت تنقية الانزيم باستخدام طريقة كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G100 إذ تم الحصول على قمة منفردة للانزيم المنقى كما موضح في الشكل (4) ، وبدرجة تنقية وصلت الى 4.2 مرة وبحصيلة انزيمية 24.1% كما مبين في الجدول (2).



الشكل (4) تنقية ALP بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

جدول (2) فصل وتنقية ALP جزئيا من أمصال مرضى داء السكر

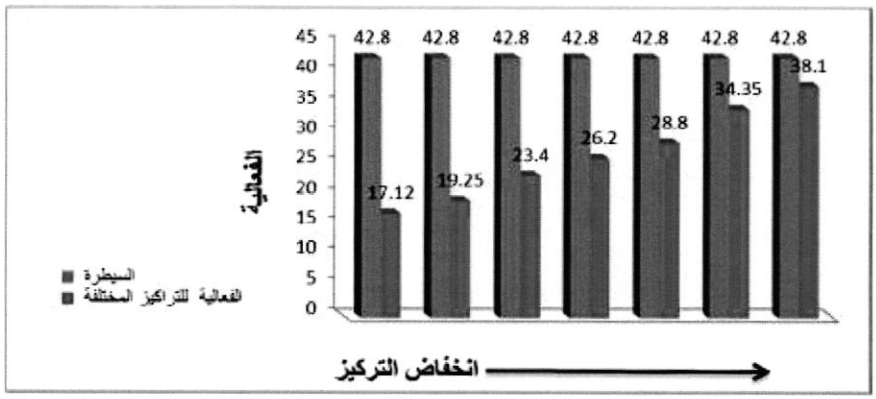
Step	*Elute (ml)*	*Activity (I U/L)*	*Total activity (I U)*	*Protein conc. (mg/ml)*	*Total protein (mg)*	*Specific activity (I U/mg)*	*Purification (Fold)*	*Yield %*
Crud serum	5.5	102.62	0.564	51.723	284.48	0.00198	-	100
Ammonium sulphate	5	75	0.375	23.54	117.7	0.00318	1.6	66.4
Dialysis	4	59.6	0.238	14.32	57.3	0.0041	2.07	42.2
(Gel filtration) Sephadex G100	5	24.9	0.124	3.24	16.2	0.0076	3.8	22

دراسة تأثير الدواء المصاحب المحضر على مستوى فعالية إنزيم ALP

درس تأثير الدواء المصاحب المحضر على فعالية إنزيم ALP خارج جسم الكائن الحي (in vitro) ، ووجد هناك انخفاض واضح في فعالية الإنزيم بتأثير المركب المحضر اذ كان الانخفاض متزايداً مع زيادة التركيز للمركب المحضر علماً ان هناك زيادة بالتثبيط بالنسبة للانزيم مع زيادة تركيز المركب المحضر من خلال المقارنة مع السيطرة وكما هو موضح بالجدول (3)، وكذلك شكل (5).

جدول (3) تأثير المركب المحضر على فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي خارج الخلية

Con.[M]	Activity IU/L (mean ± SD)	%Inhibition	% Recovery
(Control) 0	(42.8±0.02)	0	100
$1x10^{-3}$	(17.12±0.200)	60	40
$1x10^{-4}$	(19.25±0.250)	55.02	44.97
$1x10^{-5}$	(23.4±0.768)	45.32	54.67
$1x10^{-6}$	(26.2±0.642)	38.78	61.21
$1x10^{-7}$	(28.80±0.80)	32.71	67.28
$1x10^{-8}$	(34.35±0.50)	19.74	80.25
$1x10^{-9}$	(38.1±0.85)	10.98	89



الشكل (5) فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي باستخدام تراكيز مختلفة من المركب المحضر

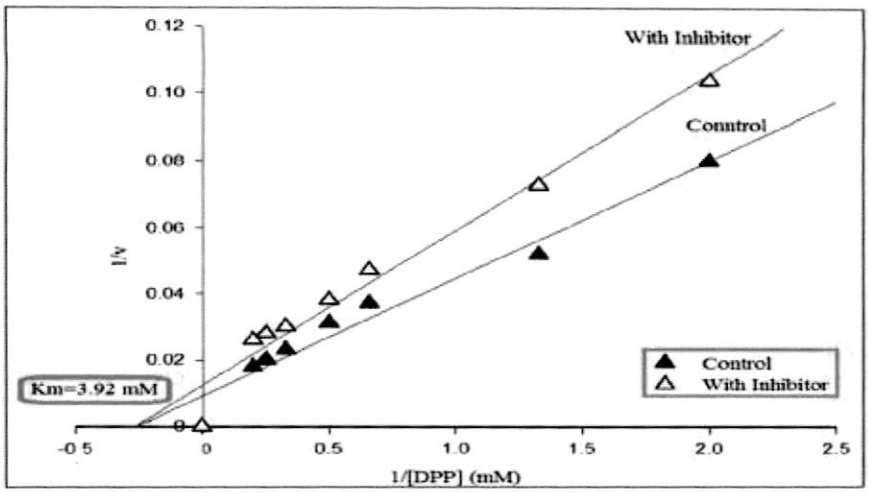
دراسة نوع التثبيط

تمت الدراسة بتحضير تراكيز مختلفة من المادة الأساس بالنسبة للانزيم واستخدام تركيز واحد من التراكيز المحضرة من الدواء المصاحب ($1x10^{-5}$) ويتم تحديد نوع التثبيط من خلال دراسة معادلة لاينويفر – برك اذ كان التثبيط من خلال المعادلة من النوع غير التنافسي. كذلك يمكن حساب قيمة السرعة القصوى وثابت ميكالس – منتن من المعادلة الاتية:

$$\frac{1}{v} = \frac{Km}{V\ max}\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V\ max}\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)$$

الجدول (4) يوضح قيم K_m وV_{max} وV_{maxi}

المركب	V_{max}µmol/ml/min	K_m mM	V_{maxi}µmol/ml/min
AA $1x10^{-5}$ M	55.55	1.4	47.61

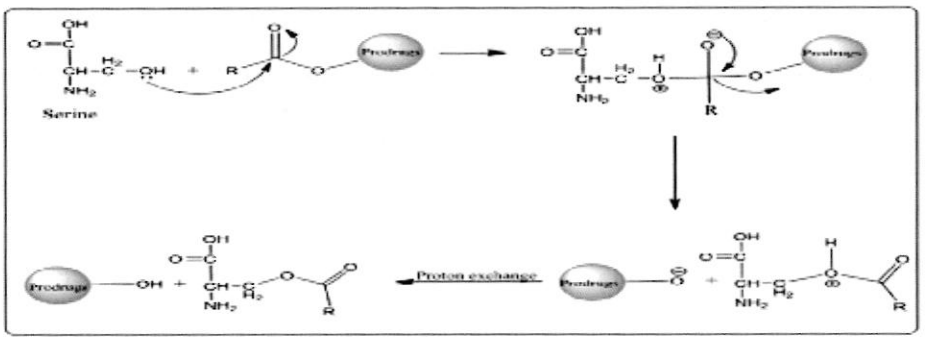


الشكل (6) تأثير المركب المحضر على سرعة التفاعل الانزيمي حسب معادلة لاينويفر–بريك

جدول (5) تركيز المادة الأساس مع السرعة (V).

[S] M	(V)Normal U/l	(V) with Inhibitore U/l
0.5	13.7	9.6
0.75	18.6	13.6
1.5	27	21.2
2	32	26.3
3	37.4	33
4	41	35.7
5	42.8	37

ان ميكانيكية التثبيط يمكن توقعها كالآتي يحتوي إنزيم الفوسفاتيز القاعدي على السيرين ويتوقع حدوث تفاعل أسترة متبادلة بين مجموعة الهيدروكسيل الحرة للسيرين ومجاميع الأستر المحضرة للدواء المصاحب . ومن خلال دراسة نوع التثبيط والميكانيكية تبين ان التثبيط من النوع غير التنافسي وكما في المخطط التالي .



مخطط (2) ميكانيكية الاسترة المتبادلة المقترحة لتثبيط إنزيم الفوسفاتيز القاعدي

المصادر

1. D. Shan, M. G. Nicolaou, R. T. Borchardt and B. Wang, (1997) "Prodrug Strategies Based on Intramolecular Cyclization Reactions", J. Pharm. Sci.; 86, 765 – 767.

2. Verma A., Verma B., Prajapati K. and TripathiK., (2009) Asian. J.research chemistry;2(2); 100-103.

3. Huttunen, Kristiina M. and Jarkko Rautio(2011)" Prodrugs – An Efficient Way to Breach Delivery and Targeting Barriers" Current Topics in Medicinal Chemistry, (11); 2265-2287.

4. Makhija Dinesh T. and Rakesh R. Somani (2010) "Improvement of GI tolerance of NSAIDs using oral prodrug approach" Der Pharmacia Lettre (2); 300-309.

5. Halen Parmeshwari K., Prashant R. Murumkar, Rajani Giridhar and Mange Ram Yadav,(2009) "

15- Lowry, H., Rosebrough, J. Farr, L. and Randall, J. (1951)."protein measurement with the Folin-phenol reagent". J.Biol.chem.; 193:265-275.

16. الشريفي ،غسق عبد الجبار (2000) "دراسة كيميائية حياتية للفوسفاتيز القاعدي الكلي والفوسفاتيز القاعدي ذي الوزن الجزيئي العالي المنقى من أمصال الأشخاص المصابين بداء السكري" رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات/ جامعة تكريت.

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

18. Kalburgi, V., Jenifer, H. D., Warad, S., Bhola, S., Chaudhari, H. L. (2010) "Comparison of salivary alkaline phosphatase levels among diabetes and non-diabetics with chronic periodontitis" Journal of Oral Health Research; 1(4), p.146 –152.

19. الطائي، إسراء إسماعيل ياسين(2012) " تنقية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي ودراسة تأثير بعض الهرمونات المسترويدية في لعاب مرضى داء السكر " كلية التربية ، جامعة تكريت .

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

21- 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 and Health sciences ;3(1).

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

23-Garcia-Martin,A.,Rozas-Moreno,P., Reyes-Garcia ,R., Moralas-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.

Prodrug Designing of NSAIDs" Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, (9), ; 124-130.

6. Holt, R. I.; Cockram, C. S.; Flyrbjerg, A.; Goldstein, B. J. (2010)." Text book of diabetes".4th. ed. Wiley-Blackwell.: 3-18, 24, 25, 577 ISBN: 9781405191814.

7. Giugliano. D.; Ceriello A; Esposito K (2008) "Glucose metabolism and Hyperglycemia" American society for Nutrition, 87; 217.

8. 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.

9. Janeway, C. M., Xu, X., Murphy, J. E., Chaidaroglou, A. and Kantrowitz, E. R. (1993) "Magnesium in the active site of Escherichia coli alkaline phosphatase in important for both structural stabilization and catalysis" Biochemistry; 32: 1601 – 1609.

10. Junior, A. B., Guimaraes, L. H. S., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Leone, F. A. and Polizeli, M. L. T. M. (2008) "Purification and biochemical characterization of thermostable alkaline phosphatase produced by rhizopus microspores var. Rhizopodi formis" Folia microbial; 53: 509 – 516.

11. De prada, P. and Brenchley, J.E. (1997) "Purification and characterization of two extracellular alkaline phosphatase from psychrophilic arthrobacter isolate" Apple Environ Microbiol; 63(7): 2928 – 31.

12. Feldman, M.; Scharschmidt, B.F.; & Sleisenger, M.H. (1998)," Gastrointestinal and Liver Disease Pathophysiology / Diagnosis / Management", 6th ed. Vol. 2 .W.B. Saunders company , USA.

13. Vogel, A.I. (1956). "A text book of practical organic chemistry". 3rdEd, Longman group limited. London.

14. 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.

Preparation of One Derivatived of Glucose as a Prodrag and study Thier Effect on Alkaline Phosphat as Activity Partially Purified from the serum of Diabetic Patients

Mohammed Abbood Mohammed , Hanaa Kaain Salih , Firas Taher Maher
Chemistry Department , College of Science , Tikrit University , Tikrit , Iraq

Abstract:
The aim of this study was to prepare a prodrug by esterification of glucose with Ibuprofen by the esterification reaction, and partially purified the alkaline phosphatase from the serum of diabetic patients by the following steps:
1-Esterification reaction of hydroxyl groups of the glucose carrier with the acid chloride of Ibuprofen.
2-the chemical formula was characterized by spectrophotometric methods using (^{1}H-NMR and FTIR).
3-Determinatin of alkaline phosphatese activity in the serum of diabetic and healthy subjects. the study indicated that there was a highly significant increase ($p \leq 0.01$) in the activity of alkaline phosphatase of diabetic patients compare to healthy subjects.
4-Alkaline phosphatase was purified by gel filteration chromatography using sephadex G100 from the serum of diabetic patients.
5-The alkaline phosphatase activity was estimated in the presence and the absence of prepared prodrug in vitro which showed inhibitory effect in the enzyme activity with increase concentration of the prepared compound.
6-Inhibition study on alkaline phosphatase showed the inhibition was Non- Competitive.