فعالية أنزيم الألنين أمينوببتيديزAAP ومتناظراته المنقاة جزئيا من ادرار المصابين بسرطان الجهاز البولي

فراح غالي الصالحي* أنيس مالك الراويوتغريد علوم العقبي*****
*قسم الكيمياء، كلية التربية للبنات. جامعة تكريت، صلاح الدين -العراق.
**قسم الكيمياء، كلية العلوم للبنات. جامعة بغداد، بغداد -العراق.
*** قسم الكيمياء، كلية العلوم. جامعة بغداد، بغداد -العراق.**

الخلاصة

شملت الدراسة (64) عينة من ادرار المصابين بسرطان الجهاز البولي بالأضافة الى (36) عينة من ادرار الأصحاء كمجموعة ضابطة. وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة ارتفاع معنوي ملحوظ($p<0.05$) بنشاط أنزيم الألنين أمينوببتيديزAAP في ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي مقارنة بالأصحاء، اذ بلغ معدل الفعالية (7.49±2.76) وحدة عالمية/ لتر في حين كان معدل الفعالية (24.83±9.66) وحدة عالمية/ لتر في حالة سرطان الجهاز البولي. وتم أيضا تنقية أنزيم AAP في ادرارالمصابين بسرطان الجهاز البولي باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G-50 ومن ثم تم فصل الأنزيم المنقى جزئيا بأستعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE-Sephadex A-50 الى متناظرين أنزيمية تختلف في درجة تنقيتها.

Keyword: Alanine aminopeptidase, Urinary tract cancer (U.T.C).

المقدمة

سرطان الجهاز البولي Urinary tract cancer يعد مصطلح عام لأورام الكلية، الحالب والمثانه. وأن هذه الأورام تهدد الحياة عادة في العقد الخامس أو السادس من العمر أكثر منها بالنسبة للأعمار الفتية وتشكل نسبة أصابة الذكور بسرطان الجهاز البولي تكون ثلاث مرات أكثر من الأناث[1]،[2].

تعد الخلايا السرطانية من أكثر الأورام الخبيثة أنتشاراً في الكلية فهي تمثل نسبة 1% من مجموع الأمراض الخبيثة الأخر، ويعد سرطان الكلية ثالث أنواع الأمراض الخبيثة المنتشرة في الجهاز البولي[1].

وقد وجد أرتباط بين سرطان المثانة والكلية اذ أن الورم الخبيث في المثانة يظهر بعد اصابة الكلية غالبا[3].

يكون سرطان الحالب من الأورام الحاصلة بنسبة أقل من 5% من كل أورام الكلية وأقل بنسبة 1% من مجموع أورام الجهاز البولي - التناسلي [4].

أما الورم الحاصل في حوض الكلية والحالب فيكون كثير الحدوث عند الذكور عنه عند الأناث بنسبة (1:2) [5].

أصبح للأنزيمات الموجودة في ادرار الأنسان أهمية كبيرة في تشخيص الكثير من الأمراض التي تصيب الكلية والجهاز البولي ،ولهذا يعد قياس الأنزيم بالأدرار طريقة حساسة وتعد مؤشرا لحصول أي أذى أو تلف في أنسجة الكلية أو الجهاز البولي[6].

يعود أنزيم الألنين أمينو ببتيديزAAP الى مجموعة أنزيمات الأمينوببتيديز التي تشطر حامض أميني منفرد من النهايه الأمينية للسلسلة الببتيدية .ويوجد نوعان من الأمينوببتيديزالأول Cytosolic(EC 3.4.11.1) وأفضل مادة أساس له هي L-Leucineamide لذا سمي Leucineamino peptidase(LAP)، أما الاخرى فهو microsomal (EC 3.4.11.2) الذي يعمل على الألنين وكذلك تستعمل مشتقات 4-Nitroanilide و β-Naphthylamide للألنين كمواد أساس له لذا سمي Alanine aminopeptdase(AAP) [7].

يقوم AAP بتحفيز تحرر 4-Nitroanilide والحامض الأميني في الطرف النايتروجيني مفضلاًالألنين من مدى واسع من الببتيدات والأميدات [8].

ينتشر أنزيم AAP أنتشاراً واسعا في أنسجة الكلية[9]، مصل الدم[10]، الغشاء المخاطي للأمعاء الدقيقة[11]، الكبد،البنكرياس[12]، المشيمة والبروستات في الأنسان[13].

ولا يقتصر وجود الأنزيم على أعضاء جسم الأنسان بل يوجد في أنسجة بعض الحيوانات أيضاً مثل أنسجة كلية الفأر،القشرة الخارجية لكلية الارنب [14]، أنسجة الكبد، الطحال، الكلية، القلب، البنكرياس، المعدة، الأمعاء الدقيقة والرئة لكل من الماشية، الخروف والخنزير.وتعد الكلية من أكثر المصادر الغنية بالأنزيم اذ يكون نشاطه في الكلية بحدود (10-15) مرة أكثرمن بقية الأعضاءالأخرى وبهذا نستطيع القول بأن الكلية هي المصدرالرئيس للأنزيم [15].

يعد AAP مؤشرا حياتيا لتحديد الأذى الذي يصيب الكلية ويكون تحديد نشاطه في الأدرار في غاية الدقة اذ من الممكن أن يعول عليه في تشخيص أمراض الجهاز البولي فهو يوجد بمستويات عالية في الأدرار عندما تعاني الكلية من أعتلالات[16].

المواد وطرائق العمل

العينات

تم جمع (36) عينه ادرار من الاشخاص الأصحاء من منتسبي وطالبات كلية التربية للبنات –جامعة تكريت، ومن كلا الجنسين، اذ كان عدد الذكور (14) وعدد الأناث (22) وكانت أعمارهم تتروح بين(17-65) سنة وذلك بعد التأكد من عدم أصابتهم بأي مرض من أمراض الجهاز البولي. أما النماذج المرضية للمصابين بسرطان الجهاز البولي فقد تم جمع (64) عينه مرضية أخذت من (34) ذكراً و(30) أنثى تتروح أعمارهم بين (18-74) سنة.وتم التشخيص من قبل الأطباء الأخصائيين في مستشفى الأشعاع والطب النووي ومستشفى حماية الأطفال – مدينة الطب/ بغداد.

تم جمع 10 مل من الادرار في انبوبة نظيفة وجافة وتستعمل لمرة واحدة فقط اذ يتم قياس نشاط الانزيم بعد أخذ العينة مباشرة .

طرائق العمل Methods

1- قياس نشاط أنزيم الالنين أمينو ببتيديز AAP في الادرار

قيس نشاط الأنزيم في الأدرار بالأعتماد على طريقة Jung and Scholz (1980) اذ تعتمد هذه الطريقة على قياس كمية 4-Nitroaniline المتحررة بتأثير الأنزيم على المادة الأساس المستعملة Alanine-4-nitroanilide وذلك بعد مقارنة الأمتصاصية للنموذج مع الخط البياني القياسي لتراكيز مختلفة من 4-Nitroanilide [16].

2- قياس تركيز البروتين

أتبعت طريقة لوري (1951)[17] لقياس تركيز البروتين في الادرار وبأستعمال البومين مصل الدم البقري كبروتين قياسي.

3- قياس تركيز الكرياتنين ومعدل تصفية الكرياتنين [18]

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

معدل تصفية الكرياتين (ml/min)= تركيز الكرياتين بالادرار (mg./dl)/ تركيز الكرياتين بمصل الدم (mg./dl)x حجم الادرار (مل)/1440 (min)

4- فصل أنزيم AAP من ادرار الأصحاء والمرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي

تم فصل AAP من الادرار وفقا لطريقة Jung and Scholz(1980)[16] وذلك لغرض تخليصه من المثبطات التي تحدد من نشاطه ومن خلال أستعمال خطوتين هما [19]:

أ- الترشيح الهلامي Gel-filtration

تم تنقيته الأنزيم من الادرار بأستعمال عمود ترشيح الهلام Sephadex G-50 وبأضافة 25 مل من محلول Tris الدارئ، اذ تم جمع(6) أنابيب من الاجزاء الناضحة وبحجم(5) مل لكل جزء وبدرجة حرارة(4)°م وبمعدل سرعة تدفق Flow rate (2.5) مل بالدقيقة الواحدة.

ب- الفصل الغشائي Dialysis

التي تعد من أهم وأقدم الطرق المستعملة في تنقية الأنزيمات، إذ تم أستخدام كيس الفصل الغشائي الموضوع في محلول Tris الدارئ لفصل وتنقية أنزيم الألنين أمينو

ببتايديز المفصول من عمود الترشيح الهلامي في الخطوة السابقة.

5- فصل وتنقية جزئية لمتناظرات AAP من إدرار والمرضى المصابين بالعجز الكلوي المزمن[20]

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

النتائج والمناقشة

لقد أوضحت نتائج هذه الدراسة وجود فروقات معنوية في مستوى نشاط أنزيم الألنين أمينو ببتايديزAAP في (64) عينة مرضية من المصابين بسرطان الجهاز البولي مقارنة مع (36) عينة من الأشخاص الأصحاء ومن كلا الجنسين، وكما مبين في الشكل(1).

ومن أجل متابعة التغيرات الحاصلة في أنزيم AAP عند الأصابة بسرطان الجهاز البولي، فقد تم تنقية هذا الأنزيم جزئياً وفصلت متناظراته من إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي فقد تم تنقية الأنزيم (8) مرة بأجراء تقنية الترشيح الهلامي وإزدادت الى (28) مرة بعد أستخدام الفصل الغشائي وكما موضح في الشكل رقم (2).

ومن ثم تم فصل الأنزيم المنقى جزئياً بأستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الى متناظرين أنزيمية تختلف في درجة تنقيتها وكما موضح في الشكل رقم (3)، وهذا يتطابق مع ما توصلت اليه الباحثة (Al-Akabie ،2006)[20] من نتائج والمتعلقة بمتناظرات AAP المفصولة من ادرار المصابين بسرطانات الجهاز البولي.

إذ لوحظ عند الفصل بأستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بأن المتناظر I المفصول من إدرارالمصابين بسرطان الجهاز البولي ازداد نشاطه ليصل (29.6) وحدة عالمية/ لتر وكان المتناظر II يحمل شحنة موجبة أيضاً وبلغ نشاطه (35.7) وحدة عالمية/ لتر.في حين لم تظهر أية متناظرات عند أستعمال محاليل متدرجة التراكيز من كلوريد الصوديوم.

ويوضح الجدول رقم (1) مقارنة لمستوى نشاط AAP في إدرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي إذ بلغ (9.17±23.73) وحدة عالمية/ لتر وإدرار الأصحاء إذ بلغ (2.17±7.94) وحدة عالمية/ لتر، إذ هنالك إرتفاع معنوي بمستوى $p<0.0001$ وربما يعزى هذا الأرتفاع بالفعالية الى التلف الحاصل في أنسجة الكلية والجهاز البولي[19].

وبالأخص خلايا النبيبات الدانية للنفرونات التي يطرح منها هذا الأنزيم [21].

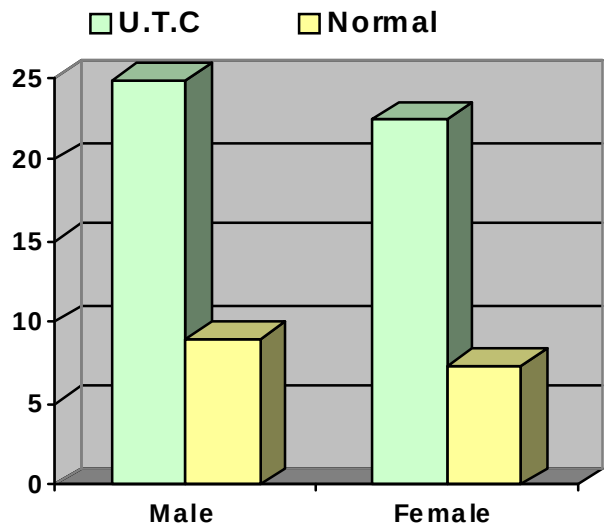
ويشير الجدول رقم (1) الى إن طرح أنزيم AAP لكل لتر من الأدرار يكون بالذكور أكثر من الأناث سواءًبالأصحاء أو المرضى، لذا يمكن إزالة هكذا أختلافات وتصحيح التغير في حجم الأدرار خلال وحدة الزمن من خلال قسمة المطروح من AAP خلال 24 ساعة على الكرياتنين المطروح خلال نفس المدة[22].

أما الجدول رقم (2) فيوضح تراكيز (AAP) المطروحة في ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي، اذ وجد تغير معنوي ملحوظ $p<0.0001$ من خلال أختبار الطالب، في تراكيز AAP للذكور والأناث المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي مع الذكور والأناث الأصحاء.

وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود علاقة مابين نشاط AAP والكرياتنين المطروح بالادرار، اذ وجد ان نسبة نشاط الانزيم الى الكرياتنين المطروح بالادرار تكون ذات دلالة واضحة ومؤشراً للضرر الذي يصيب الأنسجة الكلوية[23] وبذلك يكون أنزيم AAP حساسا للتلف الكلوي[22].

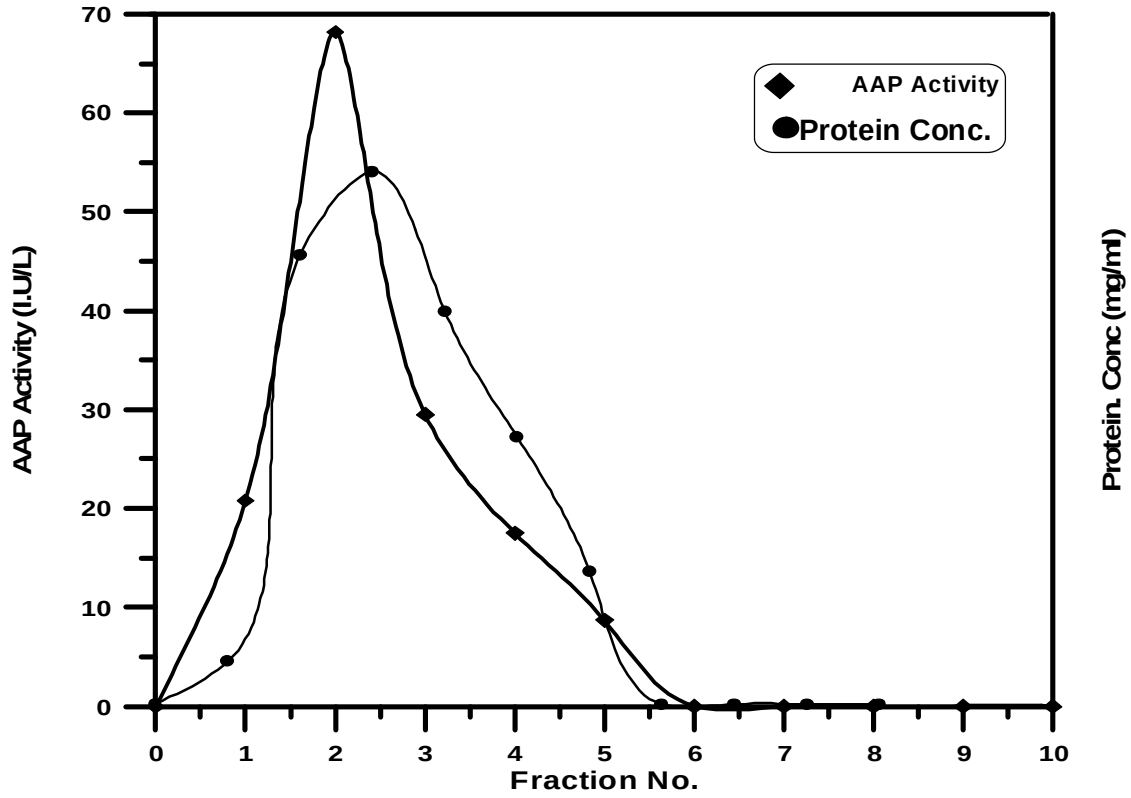
ويوضح الجدول (3) خلاصة لخطوات التنقية، اذ يلاحظ ان نشاط أنزيم AAP في ادرار المرضى قد زاد بعد اجراء عمليات الترشيح الهلامي والفصل الغشائي، وذلك يعود للتخلص من المثبطات كاليوريا والاحماض الامينية والامونيا الموجودة في الادرار والتي تقلل من نشاط الانزيم بالادرار[19][24].

وبالتالي يلاحظ ارتفاع نشاط منتاظرات AAP المفصولة من ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي، وهذا يدل على تأثر المتناظرين II,I الواضح بالحالة المرضية. ومن خلال هذه النتائج يمكن التأكد بأن مصدر هذه المتناظرات هو أنسجة الكلية متمثلة بخلايا النبيب الداني للنفرونات وكما توصل اليه Mattenheimer (1988) ولهذا نجدها تتأثر بالضرر الذي يصيب الكلية والجهاز البولي وخلايا الكلية خصوصا.

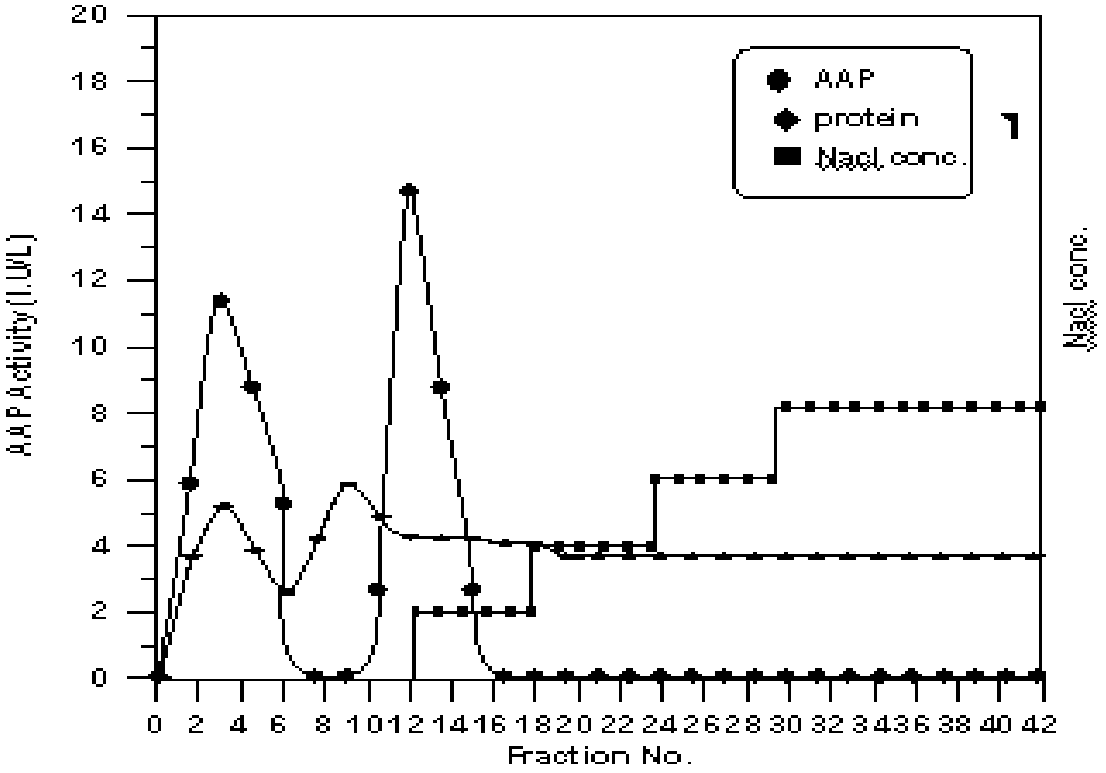


شكل رقم (1) قيم نشاط (AAP) في ادرار الأصحاء والمرضى وحسب الجنس(الذكور والأناث) البالغين المصابين بسرطان الجهاز البولي.

U.T.C: سرطان الجهاز البولي.



شكل رقم(2) فصل منتاظرات AAP من ادرار المصابين بسرطان الجهاز البولي بأستخدام كروموتوغرافيا الترشيح بالهلام.



شكل رقم (3) قصل وتنقية جزئية لمتناظرات AAP من ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي بأستخدام كروموتوغرافيا التبادل الأيوني.

جدول رقم (1)

نشاط (AAP) في إدرار الأصحاء والمرضى المصابين بسرطان الجـــــهاز البولي.

Normal					U. T. C				
Specimer	No. of Cases	Range of age (Years)	AAP Activity (I.U/L)		No. of Cases	Range of age (Years)	AAP Activity (I.U/L)		
			Range	Mean ± S.D			Range	Mean ± S.D	P<
Male	14	20-65	5.5-14.3	8.92± 2.98	34	30-74	15.6-52.8	24.85± 10.30	0.0001
Female	22	17-60	3.5-12.3	7.32±2.46	30	18-70	12.3-40.6	22.47 ±7.67	0.0001
Total	36	17-65	3.5-14.3	7.94±2.75	64	18-74	12.3-52.8	23.73± 9.17	0.0001

جدول رقم (2)

تراكيز (AAP) المطروحة في إدرار المرضى المصابين بـــسرطان الجهاز البولي والأصحاء.

	No. of Cases	I.U/4hr	Creatinine /4hr	I.U/gm Creatinine
		Mean ± S.D	Mean ± S.D	Mean ± S.D
Normal	36	1.59 ± 0.54	0.18 ± 0.028	8.50 ± 2.18
U. T. C	64	4.8 ± 1.7	0.01 ± 0.004	286.1 ± 126.8
P<		0.0001	0.0001	0.0001

U.T.C:Urinary Tract Cancer

جدول رقم (3)

فصل وتنقية متناظرات AAP من ادرار المرضى المصابين بسرطان الجهاز البولي.

Step	Elute (ml)	Protein Conc. (mg/ml)	Total Protein (mg)	Activity (mu/ml)	Specific Activity (mu/mg)	Degree of Purification (fold)
1. Crude Urine	10	252	2520	14.6	0.005	1
2. Sephadex G- 50	5	84	420	17.5	0.04	8
3. Dialysed urine	5	42	210	29.5	0.14	28
4. DEAE Sephadex A-50						
Isoenzyme I	2.0	10	20	26.9	1.34	268
Isoenzyme II	2.0	11	22	35.7	1.62	324

المصـــادر

[1] N. M.D. Javadpour," Principles & management of urologic cancer". Williams and Wilkins, 2nd edition, 1983. pp.481-651.

[2] A.A Bawazir, G.Abdul-Hamid, & E. Morales, 1998. J.Easterm Mediterranean Health., Vol.4, No.(1). 1998. pp. 107-113.

[3] A.I. Neugut, A.T.Meadows & E. Robinson, "Multiplte primary cancers" Lippincott Williams and Wilkins., 1999. pp. 365-382.

[4] J.F Holland, R.C Bast, D.L.Morotn, E.Frei, D.W.Kufw, & R.R.Weichselbaum, "Cancer Medicin". Williams and Wilkins, 4th edition, 1997, pp. 2085-2120.

[5] R.E. Rieselbach, & M.B. Garnick, "Cancer and Kidney".Lea and Febiger.1982. pp. 718-758.

[6] D. Maruhn, K. Wehling, & U.Metz,. Clin. Chim. Acta., Vol.160, 1986, pp. 119-122.

[7] Mattenheimer, H., "Aminopeptidase in urine in animal clinical biochemistry" (Ed D.J Blok Mors) Cambridge university Press. 1988. pp. 209-218.

[8] Zlatkovic, M.M., Cukuranovic, R & Stefanovic, N 1988. J.Med and Biol. Vol.5, No.(1), 1988, pp. 40-43.

[9] Horpacsy, G., Dutz, W., May, G., Zinsmeyer, J., & Mebel, M.Zurol Nephrol, Vol.66 No.(5), 1973, pp. 365-6.

[10] H.Tsushima., H.Sumi., R.Ikeda., E.Yoshida., H.Mihara., & V.Hopsu-Haw. Biomed Biochim Acta., Vol.49, No.(5), 1990, pp. 38-327.

[11] H.J.Hutter., J.Graving hoff, J., & I. Bohme. Z Med Lab Diagn, Vol.21, No. (1), 1980, pp. 9-17.

[12] W.L.Starness., J.Szechinski., & F.J. Behal. .Eur.J.Biochem, Vol.124. 1982. pp. 363-370.

[13]W.Sidorowicz., W.C.Hsia., O.M.Zownir., & F.J.Behal. Clin.Chim.Acta., Vol. 107, (1980). pp.245-256.

[14] Hardwicks; Squire J.R.Clin.Scio., Vol.14. 1955. pp. 509.

[15] S.L.Lopponen., & M. Makinen J.Ana.Biochem., Vol.148. 1985. pp;50-53.

[16] K.Jung., & D.Scholz., "Anoptimized assay of alanine aminopeptdase activity in urine" Clin.Chem., Vol.26. No(9). 1980. pp. 251-1254.

[17] H.Lowry., J.Rosebrough., L.Farr., & Randall.J.Biol.Chem., Vol.193, 1951, pp. 265-275.

[18] M.J., Rybek.J.J., Frankowski., D.J., Edwards. & L.LM., Albrecht.Antimicrobial Agents & Chemotherapy, Vol.31, No.(10), 1987, pp. 1461-1464.

[19] C.R.W., Edward "Davidsons principle and practice of medicine. Atextbook for student doctors".16 th ed, 1991, pp. 586-587.

[20] 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.

[21] A.Kumar, H.N.Pandey, G.Sharma, D.N.Pandey, & B.K.J. Sur .J.Physiol. Pharmac., Vol.31, No(1), 1987, pp;13-17.

[22] M.Verrelli, L.L.Mulloy, F.Talavra, F.Aronoff, R.J.Schmidt, & V. Batuman. "Medicine Encyclo. Chronic renal failure" 2005, P.2.

[23] L.G. Whitby, A.F.Smith, & G.J. Beckett, G.J1988). "lecture notes on clinical chemistry" 4th ed BlackWell scientific publications, 1988, pp. 168-170.
[24] M.M. Zlatkovic, R.Cukuranovic, & N. Stefanovic, J.Med and Biol., Vol.5, No.(1), 1988, pp. 40-43

Abstract

This study was performed on (64) urine specimens of patients with urinary tract cancer, in addition (47) healthy specimen were investigated as control group. The results of the study reveal that Alanine aminopeptidase (AAP)activity of urinary tract cancer patients urine shows ahigh significant increase ($p<0.05$) compare to healthy subject.

AAP was purified from urine patients with urinary tract cancer and healthy subjects by gel filtration using sephadex G-50, and two isoenzymes of AAP I, II were separated from patients urine samples using DEAE-Sephadex A-50.