دراسة بايوكيميائية للدواء المصاحب الجديد (الباراسيتمول الفوسفاتي) داخل وخارج الجسم

فراس طاهر ماهر

جامعة تكريت - كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/4/11
تاريخ القبول: 2017/6/4
تاريخ النشر: 30/ 03 / 2018
DOI: 10.37652/juaps.2017.141576

الكلمات المفتاحية:

(الباراسيتمول الفوسفاتي) ،
دهون ،
انزيمات ،
حركيات،
داخل وخارج الجسم.

الخلاصة:

تم في هذه الدراسة استخدام مشتق الباراسيتمول الفوسفاتي كدواء مصاحب والمحضر سابقا لدراسة تاثيره على فعاليه انزيم الكولين استريز المنقى جزئيا من مرضى داء السكري النوع الثاني وكذلك دراسة تحلل الدواء المصاحب وتاثيره على بعض الانزيمات داخل جسم الكائن الحي حيث قسمت الدراسة الى قسمين :

1-الدراسة خارج الجسم (*In vitro*) :تم في هذا الجزء تنقية انزيم الكولين استريز من امصال دم الاشخاص المصابين بداء السكري النوع الثاني ودراسة حركية الانزيم كما تم دراسة تاثير المركب المحضر على فعالية الانزيم المنقى حيث اظهرت النتائج ان قيمة السرعة القصوى كانت13 IU/ml وقيمة ثابت ميكاليس منتن هي 0.066 M بينما كانت درجة الحرارة المثلى للانزيم 37^0C وقيمة pH = 7.4 .تم اختبار تاثير المركب المصاحب على فعالية انزيم الكولين استريز المنقى جزئيا وتبين ان المركب له تاثير تثبيطي على فعالية الانزيم وان درجة التثبيط تزداد كلما زاد تركيز المركب وكان نوع التثبيط من النوع غير التنافسي non-copititive inhibition.

2- الدراسة داخل الجسم *In vivo* : تم دراسة تحلل المركب وتاثيره على بعض المتغيرات البايوكيمياوية داخل جسم الكائن الحي(باستحدام حيوانات مختبرية) حيث وجد ان اعلى تركيز للباراسيتمول المطلق من الدواء المصاحب كانت عند الساعة 6 بعد اعطاء الجرعة للحيوان بعدها تم قياس فعالية بعض الانزيمات وتركيز الدهون داخل جسم الكائن الحي حيث اظهرت النتائج ارتفاعا ملحوضا بفعالية انزيمات ALT, AST، GGT,ChE, ALP, LDH وانخفاضا في تركيز TG, LDL-c، VLDL-c ، Cholesterol، وزيادة في تركيز HDL-c.

المقدمة:

إن زيادة الفهم حول طبيعة الحالات المرضية حث العلماء على البحث بشكل أوسع للوصول إلى تصميم جديد ومطور للأدوية يمكنه استهداف مواقع معينة من الجسم دون المساس بالخلايا غير المصابة[1] لهذا فان البحوث العلمية مستمرة في تطوير انظمة علاجية فعالة وانتقائية للأمراض التي تواجه الإنسان والتعرف على ميكانيكية عمل هذه الأدوية،

* Corresponding author at: College of Science, University of tikrit.

E-mail address: dr.Firas_maher@yahoo.com

وخلال هذه الفترة طور الإنسان انظمة وأشكال جديدة للأدوية تعمل بميكانيكيات واشكال مختلفة متضمنة إشكال الجرع المختلفة غايتها الحد من الاثار الجانبية لهذه الأدوية[2] ، حيث ان بعض الأدوية العلاجية وبشكل عام تمتلك صفات غير المرغوب فيها والتي تشكل عائقا للتطبيقات السريرية لهذه الأدوية ، ولهذا تستخدم مشتقات هذه الأدوية القابلة للتحلل داخل الجسم الى الدواء الاصل و تعرف حاليا بالأدوية المصاحبة والتي حققت أمثل تطبيق سريري للدواء كما أظهرت مرونة وكفاءة عالية ، و توصف الادوية المصاحبة بانها ادوية حاوية على مجموعه مقترنه غير سامه متخصصة تستخدم لتعديل او ازالة الصفات غير مرغوبه للدواء اما

تعريف نظام الاتحاد الدولي للكيمياء التطبيقية للدواء المصاحب بانه المركب الذي يعاني تحولا حياتيا قبل ان يظهر تأثيره الصيدلاني[3] . ان الغاية من تحضير الدواء المصاحب (prodrug) هو زيادة الامتصاص والتوزيع وزيادة ذوبانية الادوية شحيحة الذوبان في الماء زيادة في استقرارية الدواء وزيادة مقاومته تجاه بعض الانزيمات داخل جسم الانسان كذلك لزيادة مدة الاطلاق وتقليل من سمية الادوية والقضاء على الاثار الجانبية للدواء المستخدم كذلك فان بعض الادوية لها طعم غير مرغوب فيه يتم تحسينه عن طريق تحويره الى الادوية المصاحبة [4] .

إنَّ الأدوية المصاحبة الفوسفواستريه phosphate ester prodrug هي تصميم نموذجي لمجاميع الهيدروكسيل والامين لأدوية شحيحة الذوبان في الماء الغاية منها زيادة قابليتها الذوبانية المائية للحصول على جرع فموية ووريدية وعضلية محسنة، وهي نموذجا تظهر استقرارا كيميائيا وتحولا حياتيا سريع الى الدواء الاصل بواسطة انزيم الفوسفاتيز القاعديalkaline phosphatases الموجود على زغابات الامعاء الدقيقة و الموجود ايضا في الكبد[5]، ولهذا أُستخدمت الادوية المصاحبة الفوسفاتية بشكل واسع لزيادة الوفرة الحيوية الفموية oral bioavailability للعديد من الادوية شحيحة الذوبان في الماء بسبب قدرة مجموعة الفوسفات العالية على التأين، حيث أن الجزء المقترن للفوسفات ثنائي الأيون ترفع من القابلية الذوبانية المائية للدواء بشكل واضح كما في Fosamprenavir[6].

ان انزيم الكولين استريز AChE(E.C3.1.1.7) هو انزيم مهم ويحضى باهتمام واسع من قبل الباحثين وفي عملية تطوير الادوية المختلفة بينما انزيم البيوتريك كولين استريز والذي يسمى بانزيم الكولين استريز الكاذب BChE(3.1.1.8) يحضى باهمية اقل من قبل الباحثين بسبب عدم وضوح وضيقته البايولوجية داخل جسم الحي . ان انزيم BChE من الممكن ان يعبر عن وظائف الكبد من خلال انطلاقه الى مجرى الدم . ان دور AChE معروف من خلال نقل الايعاز العصبي داخل جسم الكائن الحي وينتهي نقل الايعاز العصبي من خلال التحلل المائي للاسيتايل كولين في الوصلات العصبية والوصلات العصبية العضلية وفي الدم وغيرها . ان انزيم الكولين استريز حساس لعدد كبير من المركبات الكيمياوية والتي تعمل على تثبيط الانزيم وهذه الخاصية (خاصية تثبيط الانزيم) استخدمت في كثير من العلاجات وخاصة الاضطرابات العصبية مثل مرض الزهايمر او الوهن العضلي[7-11].

بناء الى ما ذكر اعلاه يهدف البحث الى دراسة تاثير الدواء المصاحب (الباراسيتمول الفوسفاتي) على انزيم الكولين استريز المنقى من مرضى السكري كذلك دراسة تحلل الدواء المصاحب وتاثيرة على بعض الانزيمات داخل جسم الكائن الحي.

<u>طريقة العمل :</u>

تم في هذه الدراسة استخدام مشتق الباراسيتمول الفوسفاتي كدواء مصاحب والمحضر سابقا[12] (والمحضر من قبل الباحث واحد طلبة الماجستير) لدراسة تاثيره على فعاليه انزيم الكولين استريز المنقى من مرضى داء السكري وكذلك دراسة تحلل الدواء المصاحب وتاثيره على بعض الانزيمات داخل جسم الكائن الحي حيث قسمت الدراسة الى قسمين:

1-الدراسة خارج الجسم (*In vitro*)

تم في هذا الجزء تنقية انزيم الكولين استريز من امصال دم الاشخاص المصابين بداء السكري ودراسة حركية الانزيم كما تم دراسة تاثير المركب المحضر على فعالية الانزيم المنقى وكما يلي :

جمع النماذج:

جمعت خلال هذه الدراسة (55) عينه من اشخاص مصابين بداء السكري النوع الثاني من كلا الجنسين(اعداد الذكور 30 واعداد الاناث 25 شخصا) حيث تم سحب (5mL) من الدم بمحقنة ذات استخدام واحد فقط ثم وضع الدم في أنابيب بلاستيكية نظيفة ومعقمة وتركت في درجة حرارة الغرفة لحين تخثر الدم ثم فصل المصل باستخدام جهاز الطرد المركزي (4000 r.p.m) لمدة (15 دقيقة) لضمان الحصول على قدر كاف من المصل الخالي من أثار كريات الدم الحمر بعد ذلك تم سحب مصل الدم (الراشح) باستخدام ماصة دقيقة (Micro pipette) وحفظت في حالة التجمد لحين اجراء عملية التنقية .كذلك شملت الدراسة جمع (50) عينة من اشخاص سليمين كمجموعة سيطرة. تم تقدير فعالية بعض الانزيمات AST, ALT, LDH, ALP, GGT,ChE كذلك قياس تركيز كل من Cholesterol, triglyceride Alb, HDL-c,LDL-c, . VLDL-cباستخدام عدد انزيمية جاهزة مجهزة من شركة Biolabo. الفرنسية ومقارنتها مع مجموعة الاصحاء .

– تقدير فعالية انزيم الكولين استريز :

المحاليل المستخدمة. :

1- تم تحضير المحلول المنظم (phosphate buffer، pH=7.3 ، (0.2 M) وذلك باذابة 2.84 غرام من(Na_2HPO_4MW=141,69) في 100 مل من الماء المقطر ثم عدل ال pH باضافة بضع قطرات من حامض الهيدوكلوريك وتم استخدامه مباشرة.

2- الكاشف Elman's reagent (DNTB) :

تم تحضير الكاشف (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid، 0.001 M وذلك باذابة 0.01 غرام من الـ DNTB (MW=396.36) في 25 مل من الماء المقطر مع التحريك المستمر ثم حفظ في الثلاجة في قنينة معتمة لانه مادة حساسة للضوء ويتم تحضير هذا المحلول مرتان في الاسبوع .

3- محلول المادة الاساس (S-Acetyl thiocholine iodide):

اذابة (0.01735 غرام) من (AcSchI MW=289.18) في 1 مل من الماء المقطر . ان هذا المحلول يتم تحضيره مرتان في الاسبوع .[13]

طريقة العمل :

تم تقدير فعالية انزيم الكولين استريز في مصل دم الانسان (serum) باستخدام طريقة WHO المحورة. [14]

1- وضع حجم 2.25 مل من محلول المنظم في انبوبة اختبار واضافة 50µl من محلول الكاشف DNTB و10µl من مصل الدم .مزجت المكونات باستخدام جهاز المزج.

2- تم سحب 2 مل من المزيج في الفقرة 1 ووضعه في خلية قياس 3ml ثم اضيف 34µl من محلول المادة الاساس ثم قراءة مقدار التغيير في شدة الامتصاص للانزيم قبل وبعد الاضافة المادة الاساس على طول موجي 412nm لكل ثلاث دقائق من تفاعل الانزيم والمادة الأساس.

3- تم قياس فعالية الانزيم على اساس تحلل مايكرومول من المادة الاساس خلال ثلاثة دقائق µmol/ml/3min

الحسابات : Activity of AChE = Abs.X25

ويتم قسمة الناتج Activity of AChE على 3 لاستخراج الفعالية خلال دقيقة واحدة.

فصل وتنقية انزيم الكولين استريز من مصل دم الاشخاص المصابين بداء السكر :

-إضافة كبريتات الامونيوم :تم ترسيب بروتينات المصل باستخدام تراكيز متدرجة من كبريتات الامونيوم حيث تم إضافة (17,6g/100ml) من محلول كبريتات الامونيوم ببط مع التحريك للحصول على نسبة تشبع 30%. جمع الراشح ووضعه في جهاز الطرد المركزي بسرعة14600Xg عند درجة حرارة $4^{0}C$ ولمدة 20 دقيقة ياخذ الراشح ويضاف اليه محلول كبريتات الامونيوم (27g/100ml) للحصول على نسبة تشبع 70% يخزن المحلول بدرجة حرارة $4^{0}C$ لمدة 3ساعات بعدها يتم وضعه بجهاز الطرد المركزي بسرعة 14600Xg لمدة 20 دقيقة للحصول على الراسب .يذوب الراسب ب 3ml من الماء المقطر البارد بعدها يوضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14600Xg لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة $4^{0}C$.

-الفصل الغشائي (الديلزة): أن الغاية من هذه العمليه هي إزالة المتبقي من كبريتات الامونيوم المضافة لترسيب البروتينات وذلك بوضع البروتين المذاب في الخطوة اعلاه في كيس الفصل الغشائي dialysis bag بعد قياس فعالية انزيم ChE وتركيز البروتين، ويغمس الكيس في المحلول المنظم 0.1M Tris – HCl pH 7.6 وقد تم تغيير المحلول المنظم من حين لأخر لمدة ليلة كاملة، أجريت هذه الخطوة في درجة حرارة 4م° للمحافظة على فعالية ChE وبعد انتهاء عملية الفصل الغشائي تم قياس فعالية ChE وتركيز البروتين.

-الترشيح الهلامي: أساس عمل هذه التقنية هي الاختلاف في الوزن الجزيئي، اذ استعملت لتنقية انزيم الكولين استريز عمود ترشيح هلام Sephadex G200 وبابعاد 1X15 cm [15]

<u>الدراسة الحركية لانزيم الكولين استريز ChE :</u>

<u>تأثير تركيز المادة الاساس</u>

تم دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمادة الاساس (S-Acetyl thiocholine iodide على فعالية انزيم AChE وذلك بإستعمال تراكيز مختلفة منها وهي (0.02,0.04,0.05,0.06,0.08,0.1,0.15,0.2) مولار لمعرفة تأثير تركيز المادة الاساس على عمل انزيم ChE إذ قيست سرعة تفاعل ChE حسب طريقة العمل ومن رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الأساس لمعرفة إن الإنزيم يخضع لمعادلة ميكالس – منتن . تم الحصول على قيم K_m باستعمال طريقة لينوفر – بيرك البيانية والتي تربط بين القيم العكسية لكل من السرعة وتركيز (S-) Acetyl thiocholine iodide (1/v vs. 1/[S]).

<u>تعيين الاس الهيدروجيني الأمثل</u>

دُرس تأثير الاس الهيدروجيني للمحلول المنظم (phosphate buffer على سرعة تفاعل AChE اذ استعملت محاليل ذات pH مختلفة (9, 8.5, 7, 6.5,6، 7.5،8) بوجود المادة الأساس S-Acetyl thiocholine iodide بتركيز 5 mM ودرجة حرارة 37 م°، وقُيست فعالية الإنزيم كما موضح طريقة العمل، ومن خلال رسم العلاقة بين سرعة التفاعل والأس الهيدروجيني تم التعرف على الأس الهيدروجيني الأمثل .

<u>تأثير درجة الحرارة</u>

تم قياس فعالية الانزيم إذ تم اجراء التفاعل في درجات حرارية مختلفة (7، 17، 27، 37، 47،57)م° بوجود المحلول المنظم (phosphate buffer) ذو pH 7.4 وتركيز المادة الاساس(S-Acetyl thiocholine iodide) 5mM ومن ثم رسمت العلاقة بين سرعة التفاعل ودرجة الحرارة لمعرفة درجة الحرارة المثلى للتفاعل.

دراسة تاثير المركبات المحضره على فعالية انزيم الكولين استريز

في هذه الدراسة تم تحضير ستة تراكيز مختلفة من المركب المحضر وكانت التراكيز المحضرة كالاتي:

$1x10^{-4}M$ ، $1x10^{-5}M$ ، $1x10^{-6}M$ ، $1x10^{-7}M$ ، $1x10^{-8}M$ ، $1x10^{-9}M$) اذ تتم اضافة 50µL من المركب المحضر من كل تركيز بعد اضافة الانزيم مباشرة تم حساب النسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة ادناه :

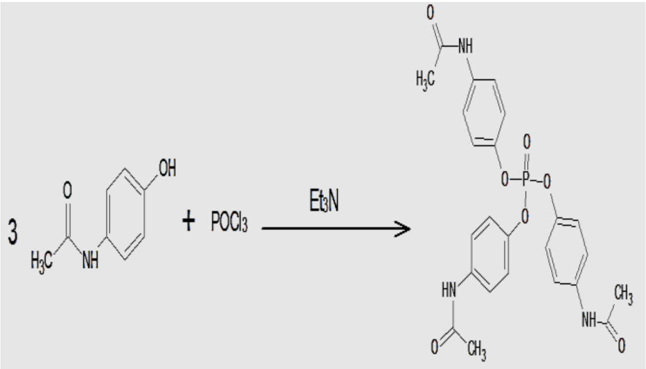
$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left[\frac{\text{The activity with inhibitor}}{\text{The activity without inhibitor}}\right] \text{X}100$$

دراسة نوع التثبيط لانزيم الكولين استريز

تم دراسة نوع التثبيط لانزيم الكولين استريز إذ تم تحضير سبعة تراكيز مختلفة من المادة الاساس لانزيم الكولين استيز ChE وكانت التراكيز المحضرة كالاتي:(2mmol/L ،3mmol/L ،4mmol/L ،5mmol/L ، 1.5mmol/L ،0.75mmol/L ،0. 5mmol/L) تم اتباع طريقة عمل تقدير فعالية انزيم AChE لكن يتم في كل فحص اضافة تركيز مختلف من التراكيز المخففة من المادة الاساس في طريقة العمل وبعد اضافة الانزيم يتم اضافة 50µL من المادة المحضرة (الدواء المصاحب) مباشرة ومن ثم تتبع الاضافات.تم رسم علاقة لينوفر-بيرك لمعرفة نوع التثبيط.

2-الدراسة داخل الجسم

تم في هذه الدراسة استخدام ارانب الانكورا الانكليزية English Angora rabbits عدد 10 ارانب حيث كانت اوزان الحيوانات (2.5±0.5) Kg . تم قطع الطعام عن الحيونات لمدة 48 ساعة وتم اعطاء المركب المحضر وبنسبة 20% من وزن حيوانات التجربة . تم سحب نماذج الدم من الارانب المختبرة عن طريق طعنة القلب (سحب الدم من القلب) قبل وبعد اعطاء الجرعات حيث تم سحب نماذج الدم من الحيوانات المختبرة وباوقات (0,2,3,4,6,8,10 hr.) من اعطاء الجرعة تم سحب (1ml) من الدم بمحقنة ذات استخدام واحد فقط ثم وضع الدم في أنابيب بلاستيكية نظيفة ومعقمة وتركت في درجة حرارة الغرفة لحين تخثر الدم ثم فصل المصل باستخدام جهاز الطرد المركزي (4000 r.p.m) لمدة (15 دقيقة) لضمان الحصول على قدر كاف من المصل الخالي من أثار كريات الدم الحمر، بعد ذلك تم سحب مصل الدم (الراشح) باستخدام ماصة دقيقة (micro pipette) . تم تقدير تركيز الباراسيتمول داخل جسم الكائن الحي وذلك بتثبيت الطول الموجي عند 251nm في جهاز ال UV–VIS [16] . كذلك تم تقدير فعالية بعض الانزيمات AST, ALT, LDH, ALP، GGT,ChE كذلك قياس تركيز كل من Alb, HDL–c,LDL– Cholesterol, triglyceride . VLDL–c،c داخل جسم الكائن الحي وعند الساعة 6 بعد اعطاء الجرعة



باستخدام عدد قياس جاهزة للانزيمات اعلاه من شركة بايولابو الفرنسية.

النتائج والمناقشة:

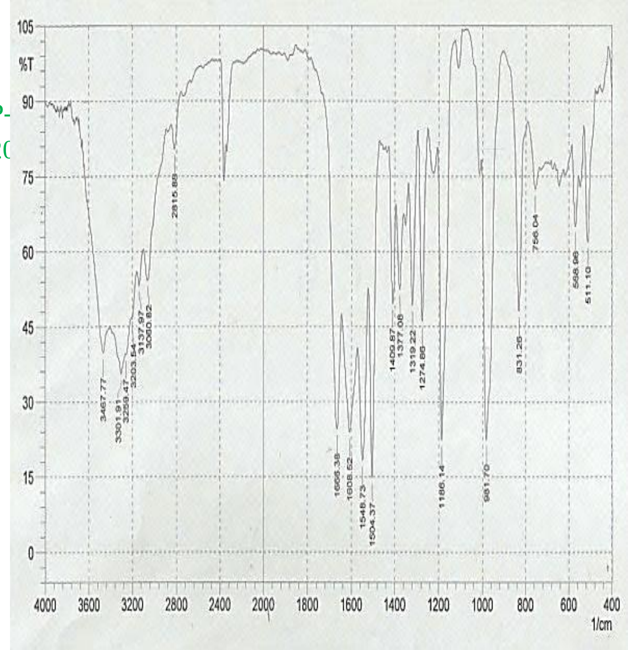
ان تحويل الباراسيتمول الى دواء مصاحب من خلال مفاعلته مع مجموعة فوسفات هي للتخلص من الاثار الجانبية لدواء الباراسيتامول والناتجه عن مجموعة الهيدروكسيل الحره عن طريق تحويلة الى مركب اقل سميه (دواء مصاحب) بواسطة ربط مجموعة الهيدروكسيل مع مجموعة مقترنه ، لذلك تم في هذا البحث استخدام مشتق الباراسيتمول

الاستري ثلاثي الفوسفات والمحضر سابقا (حيث تم تحضير هذا المركب من قبل الباحث واحد طلبة الماجستير) [12] وحسب المعادلة التالية:

تم الحصول على الناتج كراسب ابيض اللون كانت درجة انصهاره $97-98^{0}C$ونسبة منتوجه كانت52%.كما تم تشخيص المركب المحضر من خلال تقنية الأشعة تحت الحمراء IR حيث يبين طيف الأشعة تحت الحمراء اختفاء حزمة الهيدروكسي لدواء الباراسيتامول عند المنطقة (3325) و ظهور حزمة قويه وحادة في منطقة ($1186\ cm^{-1}$) والعائدة الى مط مجموعة (P=O) الاستريه و ظهور حزمة قويه وحادة في منطقة ($981\ cm^{-1}$) والعائدة الى مط مجموعة (P-O) الاستريه ، أن ظهور الحزمتين السابقتين واختفاء حزمة مجموعة (H-O) دليل واضح على نجاح عملية الاستره وبالتالي نجاح تحضير الاستر الفوسفاتي لدواء الباراسيتامول، والشكل ادناه يوضح طيف الاشعة تحت الحمراء للمركب المحضر (الدواء المصاحب) :

الشكل (1) طيف الاشعة تحت الحمراء للمركب المحضر

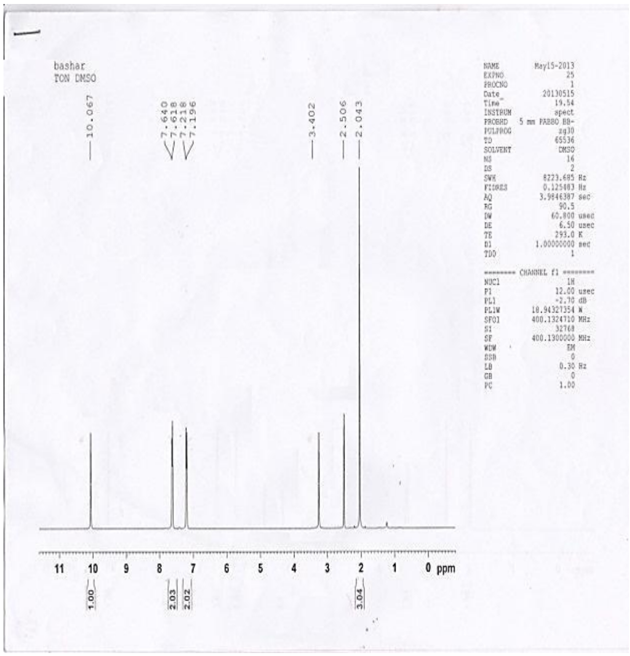
كما تم تشخيص المركب بتقنية الرنين النووي المغناطيسي H^{1}- NMR حيث وجد ظهور الاشارة الرنينيه عند (7.64-7.19 δ, ppm) والتي تعود الى اثنا عشر بروتون (بروتونات الهيدروجين الاوروماتية) لثلاث حلقات معوضه عند الموقع بارا، و ظهور الاشارة الرنينيه عند (10.06 δ, ppm) والتي تعود الى ثلاثة بروتونات لثلاثة مجاميع (NH)، أنّ هذه الاشارات تدل بشكل واضح على وجود ثلاثة مجاميع لدواء البراسيتامول في المركب المحضر وعلى صحة تركيب الدواء المصاحب المحضر، والشكل ادناه يمثل طيف الرنين النووي المغناطيسي للمركب المحضر.



الشكل (2) طيف الرنين النووي المغناطيسي للمركب المحضر

تقدير فعالية انزيم الكولين استريز :

تم تقدير فعالية انزيم AST, ALT, LDH, ALP, GGT,ChE



وقياس تركيز كل من- Cholesterol, triglyceride. Alb HDL VLDL-c،c,LDL-cلدى المرضى المصابين بداء السكري ومقارنته مع الاصحاء حيث تبين وجود ارتفاع في تراكيز كل من Cholesterol, triglyceride,Alb. VLDL-c,،HDL-c,VLDL-c وازدياد في فعالية انزيم الكولين استريز ولم تكن هناك فروقات معنوية في فعالية الانزيمات

بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وكما AST, ALT, LDH, ALP, GGT موضح في الجدول (1).

ان فعالية االانزيم لدى المرضى كانت 18.3±0.7 IU/ml بينما كانت فعالية الانزيم لدى الاصحاء هي 12.8±0.7 IU/ml وعند اجراء المقارنة تبين وجود فروق معنوية بين فعالية الانزيم عند المرضى مقارنة مع الاصحاء اذ لوحظ ازدياد واضح في فعالية الانزيم عند الاشخاص المصابين بداء السكري، كما تشير النتائج السابقة الى زيادة فعالية انزيم الكولين استريز في مصل دم المصابين بداء السكري كما في دراسة Emilia وجماعته حيث اشار الى زيادة فعالية الانزيم للاشخاص المصابين بداء السكري عن الاشخاص السليميين [17] .

وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي تؤكد على ارتفاع فعالية إنزيم الاستيل كولين استريز لدى المرضى المصابين بداء السكري مقارنة مع مجموعة السيطرة حيث يمكن أن تعزى سبب هذه الزيادة إلى ارتفاع نسبة الدهون الثلاثية والبروتين ألدهني الواطئ الكثافة جدا حيث أشارت معظم الأدبيات إلى دور الاستيل كولين استريز في ايض وتمثيل البروتين ألدهني الواطئ الكثافة جدا والدهون الثلاثية، وان هناك علاقة طردية وثيقة بين ارتفاع مستوى الدهون في مصل الدم وزيادة الفعالية الأنزيمية لإنزيم الاستيل كولين استريز ولما كان فقدان الأنسولين في مرضى السكري يؤدي الى رفع مستوى تركيز الدهون الثلاثية والبروتين ألدهني واطئ الكثافة لهذا تزداد فعالية الاستيل كولين استريز لدى مرضى السكري. كما وجد ان ارتفاع فعالية انزيم الكولين استريز في مرض السكري هو بسبب تأثير المرض على ميكانيكية عمل الانزيم مما يتسبب في ارتفاع فعالية الانزيم في مصل الدم . كما يمكن أن تعزى زيادة الفعالية لإنزيم الاستيل كولين استريز لدى مرضى السكري الى الحالات النفسية المرتبطة بمرض السكري، حيث اشارت الدارسات الى ارتفاع فعالية الإنزيم عند الأشخاص الذين يعانون من اضطرابات نفسية منها الكآبة والملل والحزن لهذا يمكن ان تعزى ارتفاع فعالية الاستيل كولين استريز لحالات الاكتئاب والملل والقلق التي غالبا ما تكون مرتبطة بداء وهو ما يؤكد على علاقة مرض السكري بالصحة النفسية والاضطرابات النفسية . ان ارتفاع فعالية الاستيل كولين استريز في مصل الدم يمكن ان تؤثر في جوانب فسيولوجية عديدة لدى المرضى المصابين بداء السكري ومنها امراض الكبد وامراض الكلى المزمنة بالاضافة الى التعرض لحالات الاكتئاب والقلق [18- 23].

جدول (1) فعالية انزيمات AST, ALT, LDH, ALP، GGT,ChE و تركيز كل من T-Cholesterol, triglyceride VLDL-c،ALb, HDL-c,LDL-c خارج جسم الكائن الحي *Invitro*

ALT	Control	60.44±2.2 U/L
	Test	77.35±2.1U/L
AST	Control	177.65±8.2 U/L
	Test	180.34±8.1U/L
LDH	Control	265.37±15.0U/L
	Test	450.29±50.3U/L
ChE	Control	12.8±0.7 U/L
	Test	18.3±0.7U/L
ALP	Control	14.10±1.8 gm/dl
	Test	34.70±3.2 gm/dl
GGT	Control	4.66±1.1 mg/dl
	Test	5.34±1.3 mg/dl
T-Cholestrol	Control	177.28±7.4 U/L
	Test	225.16±6.4U/L
TG	Control	54.32±3.3 mg/dl
	Test	71.10±3.8 mg/dl
HDL-c	Control	50.67±2.1 mg/dl
	Test	61.13±2.7 mg/dl
LDL-c	Control	4.96±0.6 mg/dl
	Test	6.71±1.42 mg/dl
VLDL-c	Control	8.79±0.69 mg/dl
	Test	11.13±0.52 mg/dl
Alb.	Control	4.69±0.58 mg/dl
	Test	5.70±0.35 mg/dl

تنقية انزيم الكولين استريز ChE :

يتم عادةً تركيز البروتينات في مراحل التنقية الأولى للإنزيمات وذلك بالتخلص من نسبة كبيرة من الماء والحصول على درجة من النقاوة

وغالباً ما يستخدم لهذا الغرض الأملاح مثل كبريتات الامونيوم إذ يحدث الترسيب بالأملاح نتيجة لمعادلة شحنات البروتين بفعل الملح مما يؤدي الى خفض ذوبانية البروتين وترسيبه وهذا ما يسمى بالتمليح الخارجي Salting Out، لذا تمت عملية فصل وتنقية جزئية لإنزيم ChE من أمصال مرضى داء السكري النوع الثاني بمراحل متعددة، ففي خطوات التنقية الأولى رسب الإنزيم باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بتركيز 30- 70% لتركيز الإنزيم والحصول على درجة من النقاوة وتم التخلص من الملح الزائد خلال عملية الفصل الغشائي Dialysis بواسطة Tris-HCl ذي pH=7.6 إذ بلغت درجة تنقية الإنزيم بهذه المرحلة 3.27 مرة وبحصيلة إنزيمية 66.3%, ثم اكملت تنقية الإنزيم باستخدام طريقة كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G200 اذ بلغت بدرجة تنقية الى 15.53 مرة وبحصيلة إنزيمية 64.4% كما مبين في الجدول (1) .

الجدول (2) تنقية انزيم الكولين استريز جزئيا من مرضى داء السكري

Step	Elute (ml)	Activity IU/ml	Total activity IU	Protein conc. (mg/ml)	Total protein mg	Specific activity I U/mg	Purification Fold	Yield %
Crud Serum	10	18.3	183	20.23	202.3	0.904	1	100
Ammonium sulphate	8	16.1	128.8	10.44	83.53	1.542	1.7	70.3
Dialysis	9	13.5	121.5	4.56	41.04	2.960	3.27	66.3
Gel filtration Sephadex G200	10	11.8	118	0.84	8.40	14.047	15.53	64.4

الدراسة الحركية للانزيم المنقى:

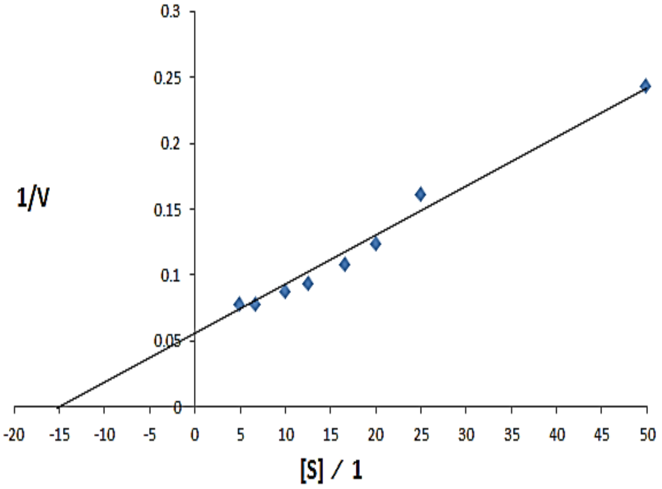
ان دراسة حركيات الانزيمات هو فرع من فروع علم الانزيمات والذي يتعامل مع العوامل المؤثرة على فعالية الانزيم (تركيز المادة الاساس، تركيز الانزيم، درجة الحرارة،الدالة الحامضية pH وغيرها) وعند دراسة هذه العوامل فانها تعطينا معلومات قيمة عن طبيعة التفاعل الانزيمي بالاضافة الى معرفة الميكانيكية الحركية للتفاعل الانزيمي تم في هذه البحث دراسة تاثير تركيز المادة الاساس ودرجة الحرارة والدالة الحامضية pH على فعالية الانزيم المنقى.

- تم دراسة تأثير تركيز المادة الأساس Disodium phenyl phosphate (DPP) على سرعة التفاعل الإنزيمي لإنزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئياً المفصول من عمود Sephadex G200, إذ وجد هناك ارتفاع في سرعة التفاعل الإنزيمي مع ارتفاع تركيز المادة الأساس، لحين الوصول إلى السرعة القصوى عند التركيز (0.2) مول وبعدها بدأت سرعة التفاعل بالانخفاض عند التراكيز العالية (التراكيز الأعلى من التركيز الأمثل للمادة الأساس) لحدوث التثبيط، ويوضح الشكل (3) ارتفاع سرعة التفاعل الإنزيمي مع ارتفاع تركيز المادة الأساس وكما يوضح الشكل نفسه ان إنزيم ChE المنقى من المصل يخضع لمعادلة ميكالس – منتن إذ أن الشكل الناتج هو زائدي المقطع . ولحساب قيم الثابت Km و Vmax. للانزيم المنقى جزئيا بوساطة الترشيح الهلامي اتبعت طريقة لينوفر-بيرك الشكل (4), وكانت قيمة Km مساوية الى 0.066 M وقيمة Vmax هو(13 IU/L) .
- ان سرعة التفاعل الانزيمي تزداد بازدياد الأس الهيدروجيني تدريجياً لحين الوصول إلى السرعة القصوى عند الأس الهيدروجيني الأمثل ثم

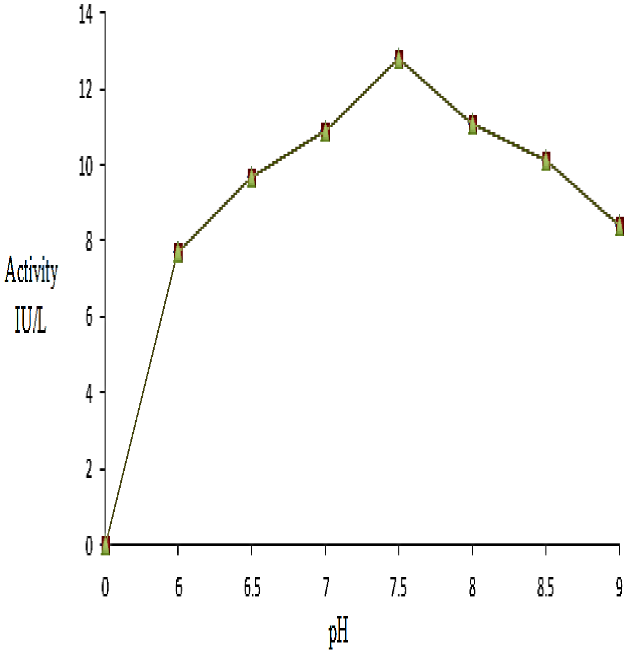
تبدأ السرعة بالانخفاض وهذا ما تم التوصل إليه في هذه الدراسة إذ وجد ان pH = 7.4 هو الاس الهيدروجيني الأمثل (Optimum) pH.

وقد أوضحت النتائج ارتفاع سرعة التفاعل لإنزيم ChE مع زيادة درجة الحرارة وكان أقصاها عند الدرجة الحرارة 37 م° والشكل (6) يوضح تأثير درجات الحرارة على فعالية الانزيم.

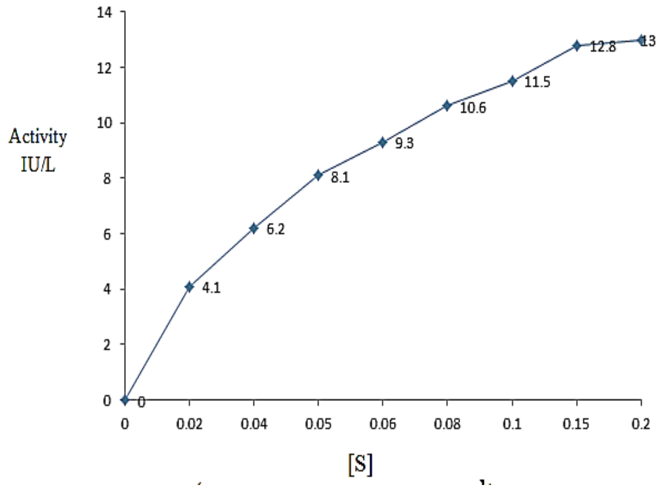
ان النتائج اعلاه (نتائج التنقية والدراسة الحركية للانزيم المنقى) تتوافق مع عدد من الباحثين حيث اشار احمد ومساعديه الى ان قيمة Km تساوي 0.068 mM عند استخدام رسم لاينويفر–برك بينما كانت قيمة السرعة القصوى هي *Vmax* = 651 µmol/min/mg protein. [24] بينما اشار A.M.ASSIRI الى ان قيمة Km تساوي $2.7X10^{-5}$ M عند تنقية الانزيم من البلازما وكانت قيمة ال pHالمثلى هي 8.2-8.5 ودرجة الحرارة المثلى هي $45^{0}C$ [25]. كذلك فان النتائج متوافقة مع K. A. LORD [26]. كما اشار كل من Vivek Kumar Gupta1 وجماعته الى ان قيمة ال pHكانت 7.4 وقيمة ال Km كانت 0.037 mM لانزيم الكولين استريز المنقى من دماغ الجرذان.[27]



الشكل (4)رسم لاينويفر – برك لحساب قيمة *Km* و*Vmax*. لانزيم *ChE* المنقى جزئياً من دم مرضى السكري

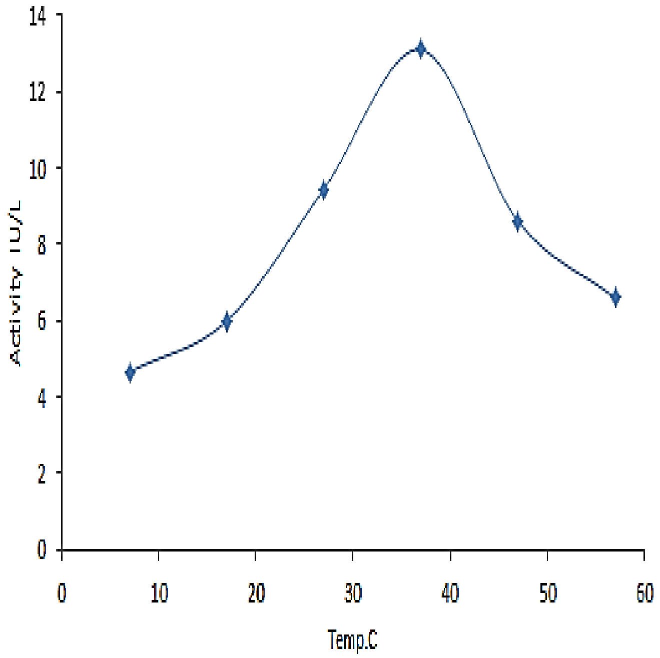


الشكل (5) تأثير الاس الهيدروجيني على فعالية انزيم *ChE* المنقى جزئياً من دم مرضى السكري



الشكل (3) تأثير تركيز المادة الاساس على فعالية انزيم *ChE*المنقى جزئياً من داء السكري

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (2) :12-29



الشكل (6)تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم ChE المنقى جزئياً من مرضى داء السكري

دراسة تأثير المركب المحضر على فعالية انزيم الكولين استريز المنقى جزئيا من مرضى داء السكري:

تم دراسة تاثير المركب المحضر وحسب طريقة العمل حيث استخدمت تراكيز متعددة من المركب (1x10^{-4}M ، 1x10^{-5}M ، 1x10^{-6}M ، 1x10^{-7}M ، 1x10^{-8}M ، 1x10^{-9}M). بينت النتائج انخفاضا في فعالية انزيم ChE المنقى و يزداد التثبيط بالنسبة للانزيم مع زيادة تركيز المركب المحضر بالمقارنه مع مجموعة السيطره اذ كانت الفعالية (13 IU/ml) لمجموعة السيطرة اما فعالية الأنزيم والنسبة المئوية للتثبيط فكانت (4.2، 67.8% IU/ml) (5.7، 56.1% IU/ml)، IU/ml) (7.8،40% IU/ml) (9.6، 26.1% IU/ml) (11.3، 13.1% IU/ml) (4.2، 67.8% IU/ml) (12.6، 3.1% IU/ml) على التوالي وكما موضح في الجدول (2).

الجدول (3) تاثير المركب المحضر prodrug على فعالية انزيم ChE

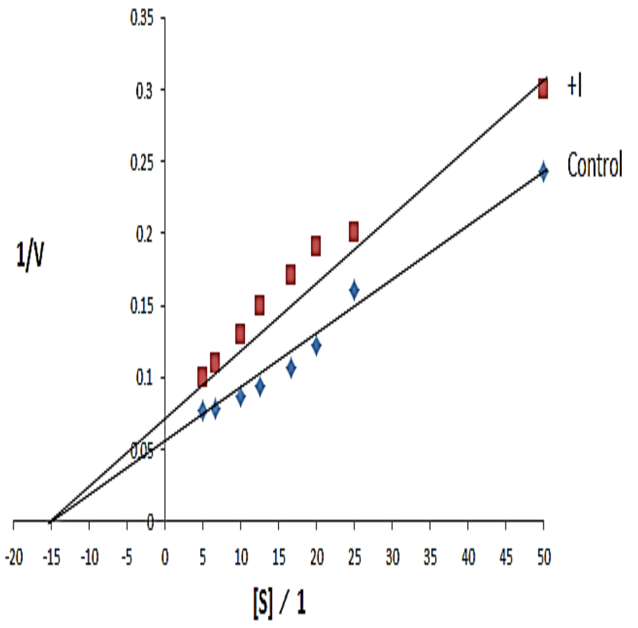
Con.[M]	Activity IU/L	Inh.%	Rec.%
Control) 0 (	13	0%	100%
1x10^{-4}	4.2	67.8%	32.3%
1x10^{-5}	5.7	56.1%	43.8%
1x10^{-6}	7.8	40.0%	60.0%
1x10^{-7}	9.6	26.1%	73.8%
1x10^{-8}	11.3	13.1%	86.9%
1x10^{-9}	12.6	3.1%	96.9%

ان هذه النتائج تتوافق مع ما وجده عدد من الباحثين حيث اشار Catherine Megan Crowch وجماعته الى ان مستخلص نبات (.Acacia nilotica (L قام بتثبيط انزيم الكولين استريز المنقى من مرضى الزهايمر [28]. كذلك فقد اشار Wasim Ahmed ومساعديه الى ان مستخلص اسود الصفصاف *Salix nigra* يعمل على تخفيض فعالية انزيم الكولين استريز ومن نوع التثبيط التنافسي[29].

كما اشار Ji Young Kim ومساعديه الى ان مستخلص توت الايهو Morus lhou كان له نشاط تثبيطي على فعالية انزيم الكولين استريز لمضى الزهايمر[30].

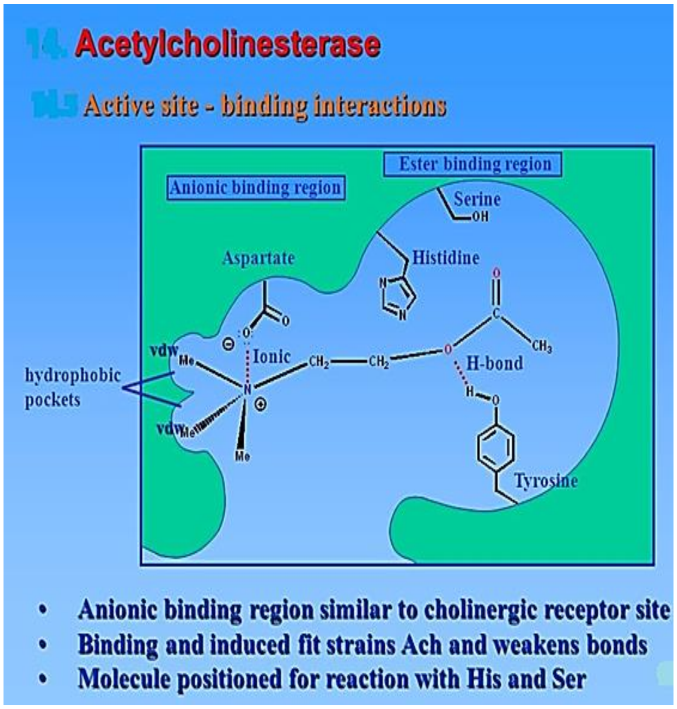
دراسة نوع التثيط :

تم دراسة نوع التثبيط لانزيم الكولين استريز إذ تم تحضير سبعة تراكيز مختلفة من المادة الاساس لانزيم الكولين استيز ChE وتركيز واحد من المركب المحضر وبعد رسم معادلة لينوفر-بيرك وجد ان نوع التثبيط هو من نوع غير التنافسي non-copititive inhibition حيث ان قيمة السرعة القصوى Vmax قد انخفضت بينما كانت قيمة ثابت ميكاليس منتن Km بقيت ثابتة.



الشكل (7) رسم لينوفر- بيرك

ان الموقع الفعال النشط (Active site) لانزيم الكولين استريز يتالف من الموضع الانيوني (Anionic site) والموضع الاستيري (Esteraic site) . فالموضع الانيوني يتالف من مجموعة الكربوكسيل التابع للحامض الاميني الكلوتاميك كما يوجد في الموقع الفعال لانزيم الكولين استريز مجموعة حامضية (H–A) للحامض الاميني التايروسين ويحتوي الموقع الفعال ايضا على حلقتي اميدازول Im1,Im2 ويوجد ايضا مجموعة الهيدروكسيل التابعة للحامض الاميني السيرين.ان ميكانيكية عمل انزيم الكولين استريز تقوم على اساس ارتباط مجموعة الهيدروكسيل للحامض الاميني السيرين مع الايمادازول Im1 عن طريق التاصر الهيدروجيني وذلك يؤدي الى زيادة نيوكليوفيلية مجموعة الهيدروكسيل لحامض السيرين وكذلك يرتبط هيدروجين المجموعة الحامضية (H–A) على ذرة الاوكسجين لمجموعة الكربونيل لاستر الكولين وهذا يؤدي الى زيادة الكتروفيلية كاربون مجموعة كاربونيل الاستر كما موضح في المخطط رقم (1).



المخطط (8) ميكانيكية التحفيز لانزيم الكولين استريز

ويمكن اقتراح ميكانيكية التثبيط كما يلي ان المركب الدوائي المحضر prodrug هو مشتق استر الفوسفات والذي يحتوي في تركيبه على مجموعة (P=O) والتي من الممكن ان تتاصر مع بروتون مجموعة الهيدروكسيل عن طريق تكوين الاصرة الهيدروجينية للحامض الاميني السيرين الموجود في الموقع الفعال لانزيم الكولين استريز مما يودي الى تثبيط الانزيم لانشغال جزء من الموقع الفعال (لارتباطه مع استر الفوسفات).

الدراسة داخل الجسم:

تم في هذه الدراسة استخدام ارانب الانكورا الانكليزية English Angora rabbits حيث كانت اوزان الحيوانات Kg (2.5±0.5) وكانت الجرعة المعطاة فمويا هي 20% من وزن حيوانات التجربة جيث بينت الدراسة ان تركيز الباراسيتمول المتحرر كان ,($1.3X10^{-6}$ M) (2 hr.) ($6.7X10^{-6}$ M) (3 hr.)‘($2.1X10^{-5}$M) (4hr.)‘($5.5X10^{-}$ (6hr.) ^{5}M)، ($1.6X10^{-5}$M) (8hr.)‘($4.8X10^{-6}$ M) (10 hr.). ان النتائج

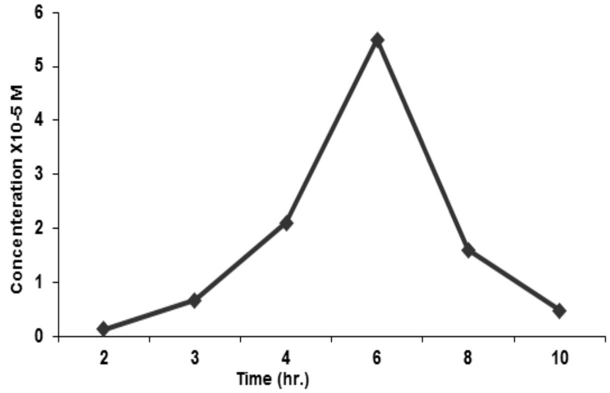
P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (2) :12-29

اعلاه تبين ان تركيز الباراسيتمول في داخل جسم الكائن الحي يكون قليلا عند الاوقات (2hr.,3hr,and 4hr.) ويزداد التركيز عند الوصول الى الساعة 6hr. (وهو اعلى تركيز للبارسيتمول داخل جسم الكائن الحي) بعدها يبدا تركيز المادة بالانخفاض عند الساعة (8hr.,10hr.) . بعد الساعة 10hr. يكون تركيز الباراسيتمول المتحرر مساويا للتركيز عند الساعة 2 وكما موضح في الجدول (3) والشكل(6).

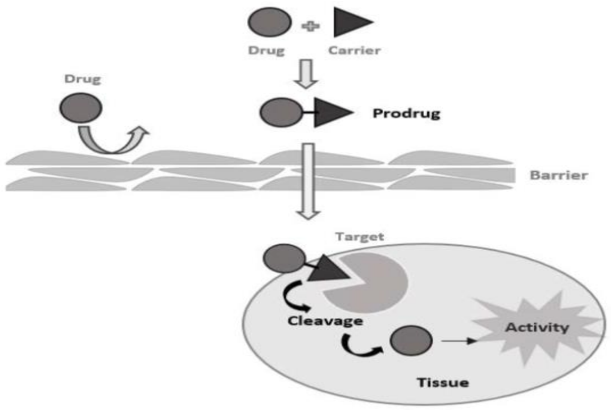
ان عملية التحلل للمركب داخل الجسم يتم عن طريق عدد من انزيمات الاستريز الموجودة في الدم او داخل الانسجة والقادرة على تكسير الاصرة الاسترية ومن هذه الانزيمات (Ester hydrolase, ،Acetyl cholinesterase،Cholesterol esterase،Lipase Carboxypeptidase). كما في الشكل (9)[32].

جدول (4)تركيز الباراسيتمول دداخل جسم الكائن الحي *Invivo*

Time (hrs.)	Concentration of paracetamol M
0	0
2	$1.3X10^{-6}$
3	$6.7X10^{-6}$
4	$2.1X10^{-5}$
6	$5.5X10^{-5}$
8	$1.6X10^{-5}$
10	$4.8X10^{-6}$



الشكل (9) تركيز الباراسيتمول داخل جسم الكائن الحي



الشكل (10) اطلاق الدواء بعد تحلله وجعله بشكل فعال عن طريق الانزيمات المحللة[32]

لقد اشار Jun–ichi Yokoel [33] واخرون ان تركيز كلا من 5–ASA،SASA في البلازما بعد اعطاء الجرعة الفموية يزداد بسرعة ليصل تركيز 5–ASAالمتحرر من تحلل SASA الى 94.7% وان نسبة 70.6% من 5–ASA يمتص داخل الجسم. كذلك اشار Joachim BROUWERS وآخرون [34] إلى ان تطوير أدوية استر الفوسفات هو طريقة مهمة لزيادة امتصاص الأمعاء للأدوية قليلة الانحلال بالماء. ويستند امتصاص الدواء من استر الفوسفات على اطلاق الفوسفات في الأمعاء بسبب وجود الانزيمات المحللة للاستر بالاضافة الى المحيط القاعدي للامعاء.كما اشار Hanna Kumpulainen [35] واخرون ان الذوبانية المائية واستقرار البروبوفول propofol يزداد عندما يكون بشكل دواء مصاحب prodrug بالاضافة الى انه يكون اقل سمية من المركب الاصلي كذلك فان عملية تحلل البروبوفول يزداد بسرعة عالية عند وجود الانزيمات. وبين Qiong Xie [36] واخرون الى ان الدواء المصاحب (Z)–3–[2–(propionyloxy)phenyl]–2–propenoic ester قد ازداد 4 أضعاف في التوافر الحيوي عن طريق الفم على meptazinol المركب الأصلي او الاساسي في الفئران . واشار Arik Dahan et al [37] الى ان تحلل وامتصاص الاندوميثاسين قد ازداد داخل الامعاء عند وجوده على شكل ادوية مصاحبة prodrug. ان الادوية المصاحبة لها

اهمية كبيرة جدا في علاج الكثير من الامراض فقد تم تحضير عدة مركبات دوائية مهمة تستخدم في علاج العديد من الامراض منها مرض الميلانوما الخبيثة Malignant Melanoma [32]. كذلك تم تحضير بعض المركبات المضادة للسرطان ولسرطان القولون [39,38].

كذلك تم تقدير فعالية بعض الانزيمات AST, ALT, LDH, ALP، GGT,ChE وقياس تركيز كل من Cholesterol, triglyceride HDL-c,LDL-c Alb.،T-VLDL-c داخل جسم الكائن الحي قبل وبعد اعطاء الجرعة حيث تم سحب الدم من الارانب المختبرة قبل اعطاء الجرعة وقياسها مرة اخرى بعد اعطائها الجرعة وعند الوقت 6hr. تحديدا بسبب كونة التركيز الاعلى للباراسيتمول داخل جسم الحيوان المختبر . اظهرت النتائج زيادة لفعالية الانزيمات المختبرة AST, ALT, LDH, ALP، GGT,ChE وانخفاضا ملحوضا في تركيز كل من، triglyceride T-Cholesterol, LDL-c VLDL-c،ALb, وارتفاعا في تركيز HDL-c كما موضح في الجدول (4).

جدول (5) فعالية انزيمات AST, ALT, LDH, ALP، GGT,ChE و تركيز كل من T-Cholesterol, triglyceride VLDL-c،ALb, HDL-c,LDL-c داخل جسم الكائن الحي *Invivo*

ALT	Control	60.44±2.2 U/L
	Test	110.75±3.4U/L
AST	Control	177.65±8.2 U/L
	Test	280.55±11.1U/L
LDH	Control	265.37±15.0U/L
	Test	450.29±50.3U/L
ChE	Control	11.25±3.3 U/L
	Test	25.02±2.3U/L
ALP	Control	14.10±1.8 gm/dl
	Test	66.60±7.6 gm/dl
GGT	Control	4.66±1.1 mg/dl
	Test	7.12±1.0 mg/dl
T-Cholestrol	Control	98.78±6.5 U/L
	Test	87.76±5.1U/L
TG	Control	51.22±3.1 mg/dl
	Test	44.10±2.3 mg/dl

HDL-c	Control	50.46±1.7 mg/dl
	Test	61.26±2.4 mg/dl
LDL-c	Control	4.87±0.7 mg/dl
	Test	3.68±1.53 mg/dl
VLDL-c	Control	8.82±0.72 mg/dl
	Test	6.97±0.51 mg/dl
Alb.	Control	4.75±0.66 mg/dl
	Test	3.61±0.32 mg/dl

ان الية عمل الباراسيتمول يتشابه الى حد كبير مع الأسبرين في منع إنتاج المركبات الكيماوية البروستاكلاندية المسببة للالتهاب. ولكن على عكس الأسبرين فأن الباراسيتامول لايمتلك الكثير من الصفات المضادة للالتهاب. وكذلك فأن الباراسيتامول – على عكس الأسبرين أيضاً – لايقوم بمنع المركبات التي تسبب تجلط الدم . ومن المعروف أن الأسبرين يقوم بمنع عائلة إنزيمات السيكلوأكسجينيز. وبسبب التشابه الجزئي بين تأثير الأسبرين وتأثير الباراسيتامول، فقد ركز الباحثون على الكشف فيما إذا كان الباراسيتامول يقوم بمنع السيكلوأكسجينيز أيضاً. وأقترح العلماء طريقتين يعمل بهما الباراسيتامول. تقترح إحدى النظريات أن الباراسيتامول يعمل عن طريق منع COX-3، وهو "أيزوفورم" من عائلة إنزيمات السيكلوأكسجينيز. ولدى هذا الإنزيم تشابه قوي مع إنزيمات الكوكس الأخرى، ويقوم بإنتاج الكيماويات المسببة للالتهاب. ويقوم الباراسيتامول بمنعه انتقاءياً ولكن بعض الأبحاث تقول أن إنزيم COX-3 لا يسبب الالتهابات في البشر والفئران . ويُحتمل أيضاً أن الباراسيتامول يغلق مفعول السيكلوأكسجينيز بنفس طريقة الأسبرين ولكن في منطقة الالتهاب توجد البيروكسيدات الذي تمنع التأثير المؤكسد للباراسيتامول. وهذا يعني أن هذه الاحتمالية غير صحيحة وأن الباراسيتامول لايعمل في منطقة الالتهاب ولكنه يعمل على الجهاز العصبي المركزي حيث لاتوجد عوامل مؤكسدة [40- 44].

في هذه الدراسة نلاحظ ارتفاعا في فعالية انزيمات AST, ALT, GGT,ChE،LDH, ALP, داخل جسم الكائن الحي وقد يعود سبب ذلك الى ان الباراسيتمول قد احدث ضررا حادا في الكبد مما ادى الا اطلاق الانزيمات المتواجدة في السايتوبلازم والمايتوكندريا او الرايبوسوم والتي تطلق الى مجرى الدم بعد تضرر الخلايا [45] . او زيادة في تخليق او نقصان في عملية هدم الانزيمات الناقلة aminotransferases[46] .

ان الكبد هو العضو المهم والهدف الاكبر للادوية و المركبات ذات السمية العالية وذلك بسبب ان جميع الادوية الماخوذة فمويا تمر عن طريق الكبد وتجرى عليها عمليات ايض مختلفة للتخلص من سميتها [47] وان الباراسيتمول عندما ياخذ بكميات عالية يوثر وبشكل كبير على الكبد (قد يؤدي الى اصابة حادة في الكبد) من خلال تكوين مركب N-acetyl-p-benzoquinoneimine (وهو احد المركبات السامة الناتجة عن ايض الباراسيتمول) للسايتوكرومات P450 و ان المركب p-benzoquinoneimine غير فعال للكلوتوثايوم الكبدي لكنة يعمل على على الارتباط بالبروتين الكبدي في التراكيز العالية مما يسبب التسمم الكبدي [49,48].

ان هذه النتائج تتفق مع عدد من الباحثين حيث اشار كوفاندك (2008) وجماعته الى ان مستويات انزيمات AST,ALT قد ارتفعت الى اربعة اضعاف مقارنة بمجموعة السيطرة كذلك وجد كانجانا وصادق (2011) ان اعطاء جرعة فموية مقداره 400 mg /kg قد تسببت بزيادة فعالية انزيمات ALT, AST, LDH, ALP و GGT كذلك فان النتائج تتفق مع كل من لوتكوفا وجماعته (2009) والذي اشار الى ان الجرع العالية من الباراسيتمول تؤدي الى زيادة فعالية انزيم LDH ونقصان في تركيز .Alb كذلك اشار عبد العظيم وجماعته (2013) الى ان السمية الحادة للباراسيتمول قد ادت الى زيادة فعالية انزيمات ALT, AST, ALP وانخفاض في تركيز البروتين الكلي والالبومين في مصل دم الحيوانات المختبرة فيما اشار محمد وجماعته (2013) الى ارتفاع في فعالية انزيمات الكبد وتغير في تركيز الدهون [50-.54] .

اظهرت النتائج ايضا انخفاضا في مستويات TG,LDL-c,VLDL-c,T-Cholestrol وزيادة في مستوى HDL-c وقد يعود سبب ذلك الى ضعف في عمليات الايض للبيوبروتين والكولسترول ان هذه النتائج تتفق مع محمد وجماعته ولا تتفق مع عدد اخر من الباحثين مثل سيتي وجماعته (2007) وراكافيندرين وجماعته (2005) والذين اوضحوا ان الحيوانات المعاملة بجرع من الباراسيتمول عانت ارتفاعا في مستوى الدهون T-Cholestrol,TG,LDL-c وانخفاضا في مستوى HDL-c ويمكن أن يعزى هذا التباين في هذه النتائج إلى الاختلافات في جرعات الباراسيتامول ومدة التجربة[55,56].

المصادر:

1. Gilchrist, Fiona M., The activity of pH membrane disruptive pseudo peptides and their subcellular fate in mammalian cells cultured in-vitro. Ph.D thesis, Aston University, Birmingham, 2002.
2. Nicholas B., Teruo M., Whei-Mei Wu., "Soft Drugs 18. Oral and Rectal Delivery of Loteprednol Etabonate, a Novel Soft Corticosteroid, in Rats—for Safer Treatment of Gastrointestinal Inflammation" Pharmaceutical Research, 1995, Vol. 12, No. 6, p. 869-874.
3. C. G. Wermuth, C. R., Ganellin, P., Lindberg and L. A. Mitscher., "Glossary of terms used in medicinal chemistry" Pure Appl. Chem., 1998, Vol. 70, No. 5, p. 1129-1143.
4. Kelemen Hajnal1, Hancu Gabriel1*, Rusu Aura1, Varga Erzsébet2, Székely Szentmiklósi Blanka1Acta Medica Marisiensis "Prodrug Strategy in Drug Development" 2016;62(3):356-362
5. Heimbach T., Fleisher D., Kaddoumi A., Overcoming Poor Aqueous Solubility of Drugs for Oral Delivery In Prodrug, The American Association of Pharmaceutical Scientists, New York, Vol. V, 2007.
6. Heimbach, T., Oh D.M., Li. Y., Rodriguez-Hornedo N., Garcia, G., Fleisher D., "Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs" Int J Pharm, 2003, Vol. 261, No. 1, p. 81-92.
7. Roopa, R., Maruthi Prasad, B. V. and Vishwanath, H. L."Serum cholinestarasein relationto indices as cardiocardio-viscular riskassessment marker in type 2 dibetes mellitus" International Journal of Current Research, Vol. 7, Issue, 12, pp.23904-23907, December, 2015

18. Inacio L.G., Stefanello F, Sausen L.D., Maria M.V., Schetinger M.R. &Goncalves J.F (,2006). " Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies " Diabetes Res .72(1):28-32.
19. Rose, L.,Davis, D.A.andLehmaan, H.,Lancet(1965). pp 225,563
20. Rubins, H.B., Robins, S.J., Collins, D. (2002).Treating Diabetic Dyslipidemia with Gemfibrozil for secondary prevention of coronary Heart Diseaes. Veterans Affairs High-Density Cholesterol Intervention trial study Group. N EnglJ.Med.341:410-8.
21. Magarian EO, Dietz AJ (1 987). Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins.J ClinPharmacol. 21:819-820
22. Cucuianu M, Opincaru A, Tapalaga D (1978).Similar behaviour of lecithin-cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterasein liver disease and hyperlipoproteinemia .ClinChimActa85 :73–79.
23. Nelson, D.L. Cox,M.M.(2008)."Lehninger Principles of Biochemistry" . 5th Ed. 1 NewYork, USA :PP:209,210
24. White, A. Handler, P. & Smith, E. (1973). "Principles of biochemistry". 2nd ed. Mc Grow-Hill book company Ablakiston puplication, New York.
25. Ahmed M, Latif N, Khan RA Ahmad A, Rocha JBT, Mazzanti CM, Bagatini MD،Morsch, Schetinger MRC،"Enzymatic and biochemical characterization of Bungarus sindanus snake venom acetylcholinesterase",J Venom Anim Toxins incl Trop Dis، 2012, volume 18 issue 2
26. ASSIRI.A.M "Cholinestarase in plasma :Purification and some Biochemical Properties" Jour.Chem.Soc.Pak.Vol.25,No.1,2003
8. Miroslav Pohanka "Electrochemical Biosensors based on Actylcholinesterase and Butyrylcholinestarase. A Review "Int. J. Electrochem. Sci., Vol. 11, 2016
9. Rui Wang Xi Can Tang " Neuroprotective Effects of Huperzine A A Natural Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease " Neurosignals 2005;14:71–82
10. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK (2006). Handbook of Clinical Anesthesia (5th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 546–9..
11. M. Pohanka, Int. J. Mol. Sci., 15 (2014) 980912. Stella, V. J., Charman, W. N. & Naringrekar, V. H.Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice? Drugs 29, 455–473 (1985).
12. H .Bashar، A. Hameed F. Maher " Synthises of two new phosphate paracetamol prodrugs and study their effect on alkalaine phphspatase which purified from serum of diabetic patients" A MSc. thesis،college of science،Tikrit university، 2013
13. AL-Rawi,I.A.,Hebeeb, R.M., and Rabbafat,H.R., Bulletin of Health Research Vol.28 pp.73,1987
14. Vandekar،M.J.,WHO/VBS VOL.78,692,1978
15. Mahendrakar S. and Dipes R. DASGUP" Purification of the enzyme acetylcholinesterase (AChE. 3.1.1.7)from Meloidogyne incognita and Heterodera zeaeRevue Nématol." 14 (4) : 51 7-52{ (1991)
16. Wilson and Gisvold "Drug Latentiation and prodrugs " 1998,P123-137
17. Emilia Krajewska,IIya Zavodnik,Beata Kluska،et.al "Acetylcholinesterase activity of normal and diabetic human erythrocyte membranes: the effect of oxidative agent" Biochemistry and molecular biology international p 203-210,VOl42,No 1, June 1997.

35. Jun-ichi Yokoe, Norio Iwasaki, Shunji Haruta, Keitaro Kadono, Ken-ichi Ogawara,
36. Kazutaka Higaki, Toshikiro Kimura. "A nalysis and prediction of absorption behavior of colon-targeted prodrug in rats by GI-transit-absorption model". Journal of Controlled Release 86 (2003) 305–313.
37. Joachim Brouwers, Jan Tack, Patrick Augustijns ." In vitro behavior of a phosphate ester prodrug of amprenavir in human intestinal fluids and in the Caco-2 system:Illustration of intraluminal supersaturation" . International Journal of Pharmaceutics 336 (2007) 302–309
38. Hanna Kumpulainen, Tomi Ja¨ rvinen, Anne Mannila, Jukka Leppa¨nen,Tapio Nevalainen, Antti Ma¨ntyla, Jouko Vepsa¨ la¨ inen, Jarkko Rautio." Synthesis, in vitro and in vivo characterization of novel ethyl dioxy phosphate prodrug of propofol". european journal of pharmaceutical sciences 34 (2 0 0 8) 110–117.
39. Qiong Xie, Xiaolin Wang, Xinghai Wang, Zhiqiang Jiang and Zhuibai Qiu." Design, synthesis, and bioavailability evaluation of coumarin-based prodrug of meptazinol". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 15 (2005) 4953–4956
40. - Arik Dahan, Revital Duvdevani, Eran Dvir, Anat Elmann, Amnon Hoffman." A novel mechanism for oral controlled release of drugs by continuous degradation of a phospholipid prodrug along the intestine In-vivo and in-vitro evaluation of an indomethacin–lecithin conjugate". Journal of Controlled Release 119 (2007) 86–93.
41. Fábio Pedrosa Lins Silva, Bruna Braga Dantas, Gláucia Veríssimo Faheina Martins,Demétrius Antônio Machado de Araújo and Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos ."Synthesis and Anticancer
27. K. A. LORD "The Partial Purification and Properties of a Cholinesterase from Blatella germanica L." Bsochem. J. (1961) 78, 483
28. Vivek Kumar Gupta, Abhishek Kumar, Nikhat Jamal Siddiqi and Bechan Sharma" Rat Brain Acetyl Cholinesterase as a Biomarker of Cadmium Induced Neurotoxicity" Journal of Toxicology Volume 1 Issue 1 - January, 2016
29. Catherine Megan Crowch and Edward Jonathan Okello "Kinetics of acetylcholinesterase inhibitory activities byaqueous extracts of Acacia nilotica (L.) and Rhamnus prinoides (L'Hér.)",African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 3(10). pp. 469-475, October, 2009
30. Wasim Ahmed, Mushtaq Ahmad, Rahmat A Khan and Nadia Mustaq
31. Promising inhibition of krait snake's venom acetylcholinesterase by Salix nigra and its role as anticancer, antioxidant agent Indian J. Anim. Res., 50 (3) 2016:317-323
32. Ji Young Kim, Woo Song Lee, Young Soo Kim, Marcus J. Curtis-Long, Byong Won Lee, YoungBae Ryu, and Ki Hun Park "Isolation of Cholinesterase-Inhibiting Flavonoids from Morus lhou" J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 4589–4596
33. Balqiz,W,K.,"The effect new pyrazol derivatives and shiff bases on the activity of acetyl choline esterase in human serum"MSc.thesis Al-Mustansirya Unversity، college of Science,2001
34. Marcella Gabrielle Mendes Machado, Paulo Renato Yamasaki, Jean Leandro dos Santos and Chung Man Chin "Targeted Prodrug Design for the Treatment of Malignant Melanoma"Journal of Dermatology Research and Therapy Volume 2,Issue 2،2016

50. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicol. Sci. 65:166–176.
51. Gardner CR, Heck DE, Yang CS, Thomas PE, Zhang XJ, de George GL (1998). Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. Hepatol. 26:748–754.
52. Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Sacco M, Durham SK, Bruno MK, Cohen SD, Gordon MK, Gerecke DR, Zhou P, Laskin DL (2002). Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10. Toxicol. Appl. Pharmacol. 184:27–36.
53. Kuvandik G, Duru M, Nacar A, Yonden Z, Helvaci R, Koc A, Kozlu T, Kaya H, Sogüt S (2008). Effects of erdosteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Toxicol. Pathol. 36:714-719.
54. Kanchana N, Sadiq AM (2011). hepatoprotective effect of plumbago zeylanica on paracetamol induced liver toxicity in rats. Int. J. Pharm. Sci. 3(1):151-154
55. Lotková H, Kučera O, Roušar T, Endlicher R, Křiváková P, Garnol T, Červinková Z (2009). Effect of S-adenosyl methionine on acetaminophen acetaminophen-induced toxic injury of rat hepatocytes in vitro ACTA. VET. BRNO. 78:603-613.
56. Abdel-Azeem AS, Hegazy AM, Ibrahim KS, Farrag AR, El-Sayed EM (2013). Hepatoprotective, antioxidant and ameliorative effects of ginger (Zingiber officinale Roscoe) and vitamin E in acetaminophen treated rats. J. Diet. Suppl. 10(3):195-209.
57. Mohamed A Lebda*, Nabil M Taha, Mahdy A Korshom, Abd El-Wahab A Mandour and Raghda I Activities of Novel Guanylhydrazone and Aminoguanidine Tetrahydropyran Derivatives" Molecules 2016, 21, 671
42. Wisut Wichitnithad, Ubonthip Nimmannit،Sumrit Wacharasindhu Pornchai and Rojsitthisak "Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Succinate Prodrugs of Curcuminoids for Colon Cancer Treatment" Molecules 2011, 16
43. Kis B, Snipes JA, Busija DW. "Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties". J. Pharmacol. Exp. Ther. 315(1): (2005)
44. Aronoff DM, Oates JA, Boutaud O. "New insights into the mechanism of action of acetaminophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H2 synthases". Clin. Pharmacol. Ther. (2006) 79 (1): 9–19..
45. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. "Paracetamol: new vistas of an old drug". CNS drug reviews 12 (3–4): (2006) 250–75.
46. Graham GG, Scott KF. "Mechanism of action of paracetamol". American journal of therapeutics 12 (1): (2005) 46–55.
47. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al . "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (21): (2002) 13926–31.
48. Sallie R, Tredger J (1991). Drugs and the liver. Biopharm. Dru. Dispos. 12: 251-259.
49. Nuduka N (1999). Clinical biochemistry for students of pathology, Longman Nigerian Plc. pp. 1–236

59. Raghavendran HRB, Sathivel A, Devaki T (2005). Effect of Sargassum polycystum (Phaeophyceae)-sulphated polysaccharide extract against acetaminophen-induced hyperlipidemia during toxic hepatitis in experimental rats. Mol. Cell. Biochem. 27(1-2):89–96.

Goda" Ginger (Zingiber officinale) potentiate paracetamol induced chronic hepatotoxicity in Rats" Journal of Medicinal Plants Research Vol. 7(42), pp. 3164-3170, 10 November, 2013.

58. Setty SR, Quereshi AA, Swamy AHMV, Patil T, Prakash T, Prabhu K, Gouda AV (2007). Hepatoprotective activity of Calotropis procera flowers against Paracetamol induced hepatic injury in rats. Fitoter. 78(7-8):451–454.

Biochemical study of novel phosphate paracetamol prodrug *invivo* and *invitro*

Firas Taher Maher

E-mail:dr.Firas_maher@yahoo.com

Abstract:

The present study describes the effect of phosphate ester of paracetamol as aprodrugs on choline estarse was partial purified from serum of patients with diabetes type two and the effect of the prodrug in some enzyme activity *In vivo* . This study devided two parts :

1- *In vitro* study : choline estarse was partial purified from serum of patients with diabetes type two .The kinetics of the enzyme were studied and the results showed that the maximum velocity was 13 IU / ml and the Km was 0.066 M while the optimum temperature of the enzyme was 37^0C and the optimum pH was 7.4.The effect of this new prodrug was tested on the activity of choline estarase . Result showed that the compound has inhibitory effect on the enzyme activity and that the degree of inhibition increases when the concentration of the compound was increased. The type of inhibition was non-competitive.

2- ***Invivo*** study showed highest concentration of parcetamol drug released from prodrug at 6hr. after giving the dose to the animal . The results showed an increase in the activity of (AST, ALT, LDH, ALP,, GGT and ChE) and a decrease in the concentrations of TG, LDL-c, VLDL-c, Cholestrol while there was an increase in HDL-c level.