P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) *مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة* Open Access
2015 ,(9), (2) : 169 -180

دراسة حركيات انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى من مصل مريضات بمتلازمة تكيس المبايض

فراس طاهر ماهر

كلية العلوم /جامعة تكريت

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٠٠/٠٠
تاريخ النشر: ٠٣/ ٠٥ / ٢٠١٧
DOI: 10.37652/juaps.2017.175961

الكلمات المفتاحية:
حركيات،
انزيم الفوسفاتيز القاعدي،
متلازمة تكيس المبايض.

الخلاصة:
تم تنقية انزيم الفوسفتيز القاعدي من مصل مريضات مصابات بمتلازمة تكيس المبايض حيث استخدمت تقنية الترشيح الهلامي باستعمال عمود الهلام Sephadex G100 ذي الأبعاد (20×٢) سم، لغرض تنقية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي من أمصال المريضات المصابات بمتلازمة تكيس المبايض واستخدام محلول منظم من الـ(Tris–HCl) ذي الأس الهيدروجيني (7.2) لفصل الإنزيم.درست حركية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي، حيث درس تأثير التراكيز المختلفة من المادة الأساس ثنائي صوديوم فنيل فوسفاتيز ، أظهرت النتائج زيادة فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي بازدياد تركيز المادة الأساس وكان الشكل الناتج هو قطع زائدي. وبلغت قيمة ثابت ميكالس – منتن (Km) (1.14)ملي مول، كذلك درس تأثير الأس الهيدروجيني pH ووجد أن pH الأمثل لعمل الإنزيم هو (١٠). أما درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم كانت ٣٧ م° ودرس تأثير زمن التفاعل على فعالية الإنزيم ولوحظ أن أعلى فعالية للإنزيم بعد فترة حضن لمزيج التفاعل الإنزيمي و لمدة (٢٠) دقيقة. تم دراسة تاثير بعض مشتقات حامض الاسكوربك وتبين انها تعمل كمثبط لفاعالية انزيم الفوسفتيز القاعدي المنقى كما وان نوع التثبيط هو من نوع المثبط الغير تنافسي.

المقدمـة:-

متلازمة تكيس المبايض هي اضطراب معقد غير متجانس، يصيب اكثر من 7 % من النساء خلال عمر الانجاب (1) وتعد هذه المتلازمة مسؤولة عن اكثر من 75 % من حالات العقم الناتجة من عدم الاباضة (2) ولا يزال المسبب المرضي لهذه المتلازمة غير محدد لكن من المرجح ان يكون متعدد العوامل اذ تشترك في ظهوره الوراثة والبيئة. تتميز متلازمة تكيس المبايض بعدم الاباضة المزمنة و رط الاندروجينات والتغير في نسبة هرمون LH: FSH الى اعلى من 1:2 او 1:3 وتكيس المبايض(3) علاوة على ذلك ترتبط متلازمة تكيس المبايض بصفات واضطرابات ايضية اخرى تتضمن السمنة والشعرانية وفرط الانسولين ومرض السكري غير المعتمد على الانسولين وتصلب الشرايين وارتفاع ضغط الدم واضطرابات الدهون وامراض الشريان التاجي سرطان بطانة الرحم (4). اول من وصف المتلازمة ستين ولفينثال (Stein & Leventhal) ولهذا تسمى ايضاً متلازمة ستين لفنثال (Stein & Leventhal) من خلال ملاحظتهم وجود ارتباط بين انحباس الطمث والشعرائية وتكيس المبايض(5). احدث معايير وضعت لتشخيص متلازمة تكيس المبايض وضعها ثلاث منظمات هي على الترتيب المعاهد الوطنية لمصحة الجمعية الاوربية للتكاثر البشري والاجنة بالتعاون مع الجمعية الامريكية لطب التكاثر وجمعية فرط الاندروجينات ومتلازمة تكيس المبايض (6).

الدراسة الحالية اعتمدت في تشخيص متلازمة تكيس المبايض على معايير روتردام التي وضعت (ESHRE) بالتعاون مع(ASRM) والمنقحة عام2004 وهي المعايير الاكثر استعمالا في تشخيص

* Corresponding author at: University of Tikrit ,College of Science, Iraq;
E-mail address: **Firas_maher@yahoo.com**

المتلازمة، اذ تشخص الاصابة بالمتلازمة على اساس وجود اثنين على الاقل من الصفات المظهريه عدم الاباضة، فرط الاندروجينا، تكيسات المبايض (7). تشترك عدة مسارات حيوية ايضية وتنظيمية في الاصابة بمتلازمة تكيس المبايض ويعد المسار الحيوي لبناء الهرمونات الستيرويدية من المسارات الحيوية الميمة في الاصابة بالمتلازمة لكون النساء المصابات بالتكيس تعاني من عدم الاباضة وارتفاع مستوى الاندروجينات لوجود خمول في خلايا القارب اوالخلايا الحبيبي في المبيض يؤدي الى انتاج مفرط للاندروجين والبروجستيرون وبالتالي عدم حدوث عملية الاباضة (8) تشترك اربعة جينات رئيسية في تشفير انزيمات هذا المسار تبدأ بالجين (cyp11a) الذي يقوم بتحويل الكولستيرول الى بريكنينولون بفعل انزيم سايتوكرومp450scc (cyp11a) يأتي بعدها دور جين CYP17A1الذي يشفر انزيم سايتوكرومP450 c17 ذي الفعالية الثنائية α 17 (هيدروكسميز17 -20 لاييز) الذي يقوم بتحويل البريكنينولون الى 17 هيدروكسي بركنينولون و الذي بدوره يتحول بفعل الانزيم نفسة الى ديبيدروابااندروستيرون كذلك يقوم هذا الانزيم بعملية تحويل البروجستيرون الى17 هيدروكسي بروجستيرون (9). اما الجين الثالث في هذا المسار 17β-HSD5 فيقوم بتشفير إنزيم 17βهيدروكسي ستيرويد ديهيدروجينيز نوع (5)ويقوم هذا الانزيم بتحفيز علمية تحويل الاندروستينيديون الى تستوستيرون ينتهي المسار الحيوي لبناء الهرمونات الستيرويدية بفعل انزيم الاروماتيز الذي يشفر بوساطة جينCYP19 ، اذ يقوم الانزيم الاخير بعملية تحويل التستوستيرون و الاندروستينيديون الى الاستراداياول والاسترون على الترتيب (10).اكدت االدراسات دور االوراثه في الاصابة بمتلازمة تكيس المبايض عن طريق ملاحظة تجمع الصفات المظهرية لممتلازمة ضمن العائلة الواحدة ومن المعلومات حول التاريخ العائلي للاصابة بالمتلازمة وارتباطيا بالعقم والاضطرابات الايضية ذات العلاقة. .ويعد العالم Cooper وجماعته (1968) اول من درس ارتباط قمة الطمث بمتلازمة تكيس المبايض بين النساء المصابات بالمتلازمة وقريباتها من الدرجة الاولى وقد اوضح في دراسته ان متلازمة تكيس المبايض تورث عن طريق كروموسومات جسمية و مع ضعف في نفاذية تعبير جيناتها (11). ويعرف متلازمة تكيس المبايض بانه ضعف تبيض وهو يشمل قلة الاباضة او انعدام الاباضة و فرط الاندروجينات (12) او هو اجتماع اثنين على الاقل من الاعراض التاليه :فرط الاندروجينات، ضعف التبويض و ورؤية التكيسات على المبايض عند فحصها بالموجات فوق صوتية و ثبتت في عام 2003 ممعايير تشخيص المرض سميت بمعايير روتردام ونقحت عام2004 (13). كما يمكن تعيف المرض بانه وجود فرط الاندروجينات مع ضعف المبيض والذي يتضمن ضعف التبييض او رؤية التكيسات باستعمال التصوير بالامواج فوق الصوتية لتشخيص المتلازمة (14) في كل التعاريف السابقة ينص مصطلح Hyperandrogenism على ارتفاع الاندروجينات السريري او البايوكيميائي.ان اعراض ارتفاع الاندروجينات السريري هي (الشعرائيه وحب الشباب وتساقط شعر مقدمة الرأس) اما الدليل ارتفاع الاندروجينات البايوكيميائي فهو ارتفاع مستوى الهرمونات الذكرية في الدم المحيطي (15) وكذلك فان جميع التعريفات السابقة تتطلب استبعاد الاضطرابات الهرمونية الاخرى التي يمكن ان تحاكي متلازمة تكيس المبايض مثل (زيادة افراز البرولاكتين- تضخم الكظرية الخلقي- اورام افراز الاندروجيف و متلازمة كوشينغ.(16)

الفوسفاتيز القاعدي:

هو أحد أنزيمات الغشاء البلازمي، يتوافر في مختلف أنسجة الجسم(31، 32) وفي مصل الدم(33). يصنف الفوسفاتيز القاعدي من ضمن مجموعة الأنزيمات التي تحلل الفوسفيت (phosphate) في مدى من الPH القاعدي. والرقم التصنيفي للأنزيم هو [EC3.1.3.1](34)، الفوسفاتيز القاعدي مصادره مختلفة يُظهر ثلاثة أنواع من النشاط هي Phosphotransferase activity و hydrolytic activity و Pyrophosphate activity (35) إذ إن مجاميع الفوسفاتيز القاعدي تحرر الفوسفات غير العضوي من أسترات الفوسفات العضوي مع ناتج مصاحب هو الكحول، وأفضل رقم هيدروجيني يتم به التفاعل هو (pH=9-10.2)(36).يوجد الفوسفاتيز القاعدي في جميع أنسجة الجسم ولاسيما في غشاء الخلية، ويوجد بتراكيز عالية في الغشاء الطلائي المعوي(37، 38) (intestinal epthelium) والكبد(39) (Liver) والكلى(40) (Kidney) والخلايا البانية للعظم(41) (Osteoblasts) والمشيمة(42، 43) (Placental) وكذلك يوجد بالكروموسومات(44) وغدد الثدي(45) (Mammary Gland) والحليب (milk).ترجع فعالية

الفوسفاتيز القاعدي إلى تغيرات فسيولوجية، وإن هذه التغيرات كانت مسبقاً تعزى إلى أسباب مرضية أو أي شيء يظهر كناتج طبيعي(46).حيث تزداد فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في الحمل الطبيعي بمعدل مرة ونصف الذي يمكن الكشف عنه ما بين (٢٠-١٦) أسبوعاً(47. 48) من الحمل. يمكن ملاحظة ارتفاع فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي أيضاً في حالات الحمل التي تصاحبه بعض المضاعفات مثل: ارتفاع ضغط الدم (hypertension)، مقدمة الارتعاج (Preeclampsia)، الارتعاج (eclampsia) والإجهاض (abortion).كما تكون الفعالية الكلية لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي في البلازما عند الأطفال حديثي الولادة أعلى من (٥ مرات) عن القيمة المحددة عند البالغين، ويكون السبب في ارتفاع هذه الفعالية مشاركة نظير الأنزيم المفرز من المشيمة. تزداد الفعالية الكلية للأنزيم إلى أكثر من (٢.٥ مرة) وقد تصل إلى (٥ مرات) أو أكثر في الأطفال في طور النمو، وإن هذه الزيادة تحدث في سن البلوغ نتيجة لزيادة نشاط نمو العظم (المتناظر للأنزيم المفروز من خلايا العظم) التي تزداد تدريجياً مع تقدم العمر(49).و تقل فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي كلما تقدم الإنسان بالسن، وذلك لقلة نشاط نمو العظم(49).يحتوي أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في البالغين الأصحاء على أكثر من نوع واحد من النظائر (isoenzyme).

طريقة العمل :

تم جمع عينات مصل الدم للأشخاص الأصحاء وبلغ عددهم (٢٥) عينة، وتم جمع عينات مصل الدم للأشخاص المصابين بتكيس المبايض وبلغ عددهم (٣٥) عينة مرضية وقد تم تشخيص المرض باستخدام اجهزة السونار.تم سُحب 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. وتُرك ليتخثر في درجة حرارة الغرفة ، بعدها فُصل مصل الدم عن الجزء المتخثر بجهاز الطرد المركزي (Centrifuge) وبسرعة (3000 G) لمدة (15) دقيقة لضمان الحصول على قدر كاف من المصل الخالي من أثار كريات الدم الحمراء، وبعد ذلك سُحب مصل الدم باستخدام ماصة دقيقة (Micro pipette). وقيست فعالية الإنزيم مباشرة تمت الدراسة خارج الجسم (in vitro). كما تم تقدير تقدير مستوى تركيز البروتين الكلي في مصل الدم حيث تعتمد هذه الطريقة على مفاعلة عينة مصل الدم الحاوية على البروتين مع محلول ترترات الصوديوم البوتاسيوم بوجود النحاسيك القاعدية (ايونات cu2+ في محيط قاعدي) والذي يعرف بكشف بايوريت (Biuret Reagent) ليعطي معقدا ذا لون بنفسجي شدة امتصاصه تعتمد على عدد أواصر الببتيد الموجود في البروتين ، إذ تقاس شدة الامتصاص عند طول موجي (٥٥٠ nm).

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

١- إضافة كبريتات الامونيوم:

تم ترسيب بروتينات المصل باستخدام تراكيز متدرجة من كبريتات الامونيوم لحين الوصول لنسبة ٥٥% ، إذ تم اضافة 2.75gm من كبريتات الامونيوم الى 5 ml 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.

٢- الفصل الغشائي (الديلزة):

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 ١٦ساعة، أجريت هذه الخطوة في درجة حرارة(4 م° ±١) للمحافظة على فعالية ALP وبعد انتهاء عملية الفصل الغشائي تم قياس فعالية ALP وتركيز البروتين.

٣- الترشيح الهلامي :

اساس عمل هذه التقنية الاختلاف في الوزن الجزيئي، اذ استعملت لتنقية المتناظر المفصول بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود ترشيح هلام Sephadex G100 حيث استخدمت عدة محاليل منها المحلول المنظم 0.1M Tris – HCl pH 7.2 والذي حُضر بإذابة 15.76 gm من Tris – HCl في لتر ماء مقطر وضُبط الـ pH عند 7.2. كذلك حُضر المحلول العالق للترشيح الهلامي

Sephadex G100 بإذابة 2.5 gm من مادة تعبئة العمود Sephadex G100 في 200 ml من المحلول المنظم – 0.1M Tris HCl pH 7.2 وتُرك المحلول لمدة (24– 28) ساعة بدرجة 4 م° وأثناء هذه المدة تم تبديل المحلول المنظم عدة مرات لازالة الدقائق الناعمة من المحلول لان وجودها يقلل من سرعة انسياب المحلول الناضح خلال العمود. وحُضر محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 500 ملي مول بإذابة 29.25 غم من NaCl في لتر من المحلول المنظم 0.1M Tris – HCl pH 7.2.

طريقـة العمـل :

استعمل عمود زجاجي بقطر 2 سم وطول 20 سم و وضع في نهايته قليل من الصوف الزجاجي لمنع حبيبات الهلام من التسرب خارج العمود ، سُكب المحلول العالق للهلام في العمود بصورة بطيئة ومتجانسة لمنع تكون الفقاعات الهوائية التي تعيق الفصل الى ان وصل ارتفاع الهلام الى (11cm)، غسل العمود بكميات كافية من المحلول المنظم 0.1M Tris – HCl pH 7.2 حتى تم الحصول على سرعة تدفق بمقدار (1.5مل \ دقيقة). أُضيف ٥ مل من الإنزيم بعد الفصل الغشائي ببطء فوق سطح هلام Sephadex G100 وترك لمدة 5دقائق ليتشرب في عمود الهلام. تم البدأ بعملية الفصل بإستخدام 150مل من المحلول المنظم الحاوي على 500 ملي مول من NaCl ، اذ جمع 5 مل للجزء الواحد. بعد جمع الأجزاء الناضحة من عمود الفصل تم تقدير فعالية إنزيم ALP وتركيز البروتين

-الدراسات الحركية لإنزيم الفوسفاتيز القاعدي:

تم دراسة الصفات الحركية لإنزيمALP بعد فصله وتنقيته جزئياً من مصل مريضات تكيس المبايض بواسطة الترشيح الهلامي حيث تم دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمادة الاساس Disodium phenyl phosphate (DPP) على فعالية انزيم ALP ، وذلك بإستعمال تراكيز مختلفة منها وهي (0.5،1،2،3،4،5،6) ملي مولار لمعرفة تأثير تركيز المادة الاساس على عمل انزيم ALP إذ قيست سرعة تفاعل ALP ، ومن رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الأساس لمعرفة إن الإنزيم يخضع لمعادلة ميكالس– منتن.وتم الحصول على قيم Km باستعمال طريقة لينوفر– بيرك البيانية والتي تربط بين القيم العكسية لكل من السرعة وتركيز DPP (1/v vs.1/[S]).

كما دُرس تأثير الاس الهيدروجيني للمحلول المنظم (Sodium carbonate – Bicarbonate) على سرعة تفاعل ALP، اذ استعملت محاليل ذات pH مختلفة (7،8،9،10،11،12،13) بوجود المادة الأساسDPP بتركيز 5 mM ودرجة حرارة 37م°، وقُيست فعالية الإنزيم، ومن خلال رسم العلاقة بين سرعة التفاعل والأس الهيدروجيني تم التعرف على الأس الهيدروجيني الأمثل.

تم دراسة تاثير درجة الحرارة اجراء التفاعل في درجات حرارية مختلفة (7،17،27،37،47،57)م° بوجود المحلول المنظم(Sodium carbonate– Bicarbonate) ذو pH 10 وتركيز المادة الاساس(DPP) 5mM، ومن ثم رسمت العلاقة بين سرعة التفاعل ودرجة الحرارة لمعرفة درجة الحرارة المثلى للتفاعل.

تم دراسة تأثير زمن الحضن على فعالية إنزيم ALP تم دراسة تأثير المدة الزمنية لحضن مزيج التفاعل على فعالية انزيم ALP باستعمال تركيز 5 mM من المادة الاساس DPP وبفترات زمنية (٥، ١٠، ١٥، ٢٠، ٢٥ ،٣٠،٣٥) دقيقة وبدرجة حرارة 37م° وبوجود المحلول المنظم (Sodium carbonate –Bicarbonate) ذي pH 10، رسمت العلاقة بين فعالية الانزيم والزمن للتعرف على تأثير زمن الحضن على سرعة التفاعل الإنزيمي.

تاثير حامض الاسكوربك على فعالية انزيم ALP المنقى من متلازمة تكيس المبايض:

تم قياس تاثير حامض الاسكوربيك ((L–Ascorbic acid على فعالية انزيم ALP المنقى وذلك باستخدام تراكيز متعددة من المركب (0.5gm/25ml – 0. 5X10–7gm/25ml). كذلك تم دراسة نوع التثبيط باستخدام تراكيز متعددة من المادة الاساس(46).

النتائج والمناقشة :

التنقية الجزئية لإنزيم الفوسفاتيز القاعدي من دم مرضى تكيس المبايض:

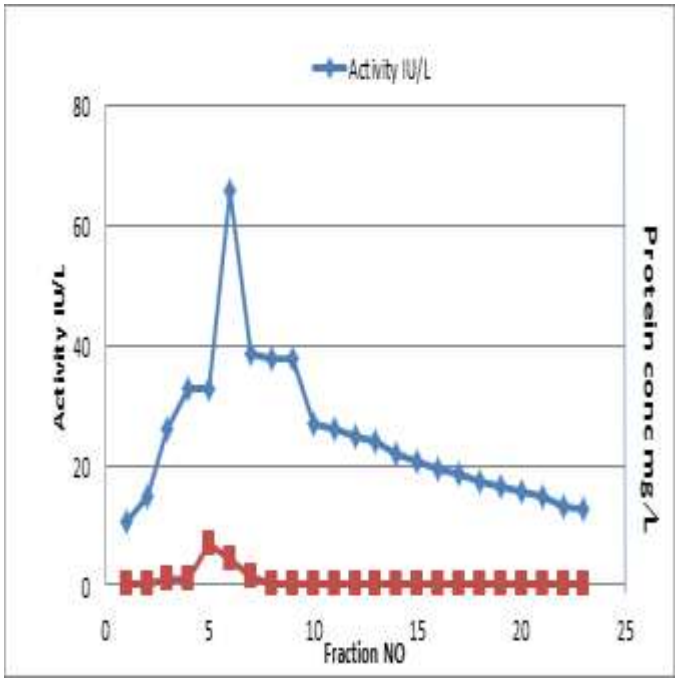
يتم عادةً تركيز البروتينات في مراحل التنقية الأولى للإنزيمات، وذلك بالتخلص من نسبة كبيرة من الماء والحصول على درجة من النقاوة

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة** Open Access
2015 ,(9), (2) : 169 -180

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 (19)، لذا تمت عملية فصل وتنقية جزئية لإنزيم ALP من أمصال مرضى تكيس المبايض بمراحل متعددة، ففي خطوات التنقية الأولى رسب الإنزيم باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بتركيز ٥٥% لتركيز الإنزيم 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 الإنزيم بهذه المرحلة ١.١٩ مرة وبحصيلة إنزيمية ٥٥.٧٤%، ثم اكملت تنقية الإنزيم باستخدام طريقة كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G100 إذ تم الحصول على قمة منفردة للانزيم المنقى، وبدرجة تنقية وصلت الى ٢.٧٦ مرة وبحصيلة إنزيمية ٣٣.٩٤% كما مبين في الجدول (١) والشكل (١).

جدول رقم (١) فصل وتنقية إنزيم ALP جزئيا من دم مرضى متلازمة تكيس المبايض

Step	Elute (ml)	Activity	Total Activity	Protein Conc	Total Protein	Specific Activity	Puri. NO.	Yield
Crud - Serum	5.5	139.43	0.766	59.72	388.46	0.00233	1	100
Ammonium sulphate	5.1	105.58	0.538	36.81	187.73	0.00286	1.22	70.23
Dialysis	4.7	91.02	0.427	26.55	124.785	0.00342	1.19	55.74
Gel Filtration SephadexG-100	5	65.22	0.260	6.898	27.592	0.00945	2.76	33.94

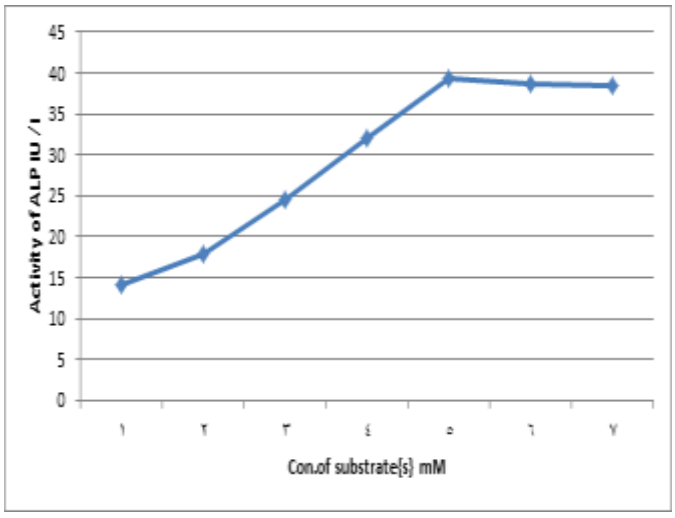


الشكل (١) تنقية *ALP* بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

الدراسة الحركية لانزيم ALP المنقى :

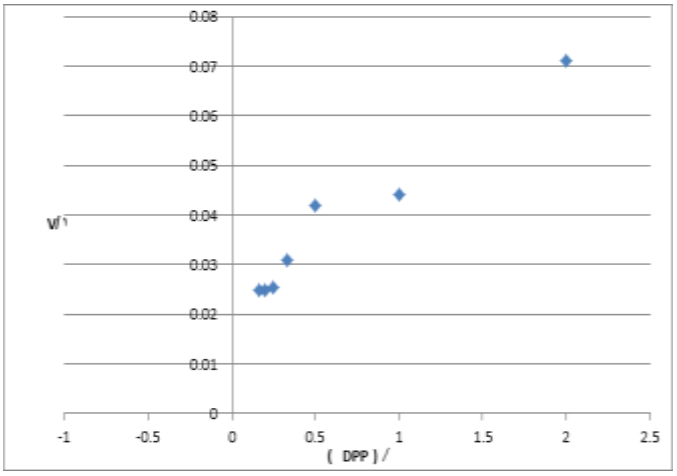
تمت دراسة حركيات انزيم ALP حيث تمت دراسة تاثير تركيز المادة الاساس كذلك دراسة تاثير الدالة الحامضية pH كذلك تاثير درجة الحرارة وتاثير الزمن وكانت النتائج وكما موضحة بالاشكال (٢)،(٤)،(٥)،(٦) على التوالي حيث يوضح الشكل (٢) تاثير تركيز المادة الاساس للانزيم حيث نلاحظ ارتفاع في سرعة التفاعل الإنزيمي مع ارتفاع تركيز المادة الأساس (DPP)، لحين الوصول إلى السرعة القصوى عند التركيز (5.2) ملي مول وبعدها بدأ سرعة التفاعل بالانخفاض عند التراكيز العالية (التراكيز الأعلى من التركيز الأمثل للمادة الأساس) .وكما يوضح الشكل نفسه ان إنزيم ALP المنقى من المصل يخضع لمعادلة ميكالس – منتن إذ أن الشكل الناتج هو زائدي المقطع وهذا يتفق مع ما توصلت العديد من الباحثين. ولحساب قيم الثابت Km و Vmax. للانزيم المنقى بوساطة الترشيح الهلامي اتبعت طريقة لينوفر–بيرك الشكل (٣)، وكانت قيمة Km مساوية الى1.14 mM وقيمة Vmax هو (٣٩.٣IU/L) هذا لا يتوافق لما حصلت عليه الشريفي (٢٠٠٠)[٥٠]، بينما اشار Cho–Ngwa (٢٠٠٧) في دراسة على انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى من دودة Onchocerca ان قيمة ثابت ميكالس – منتن

٠.٥٦mM بوجود المادة الأساس (PNPP) [47]. واوضحت دراسة Zhang وجماعته (٢٠٠٨) على انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALPالمنقى من *Geobacillus thermodenitrificans* ان قيمة ثابت ميكالس–منتن بلغت ٣١.٥ mM [48]، وكانت قيمة ثابت ميكالس – منتن لانزيم الفوسفاتيز القاعدي في العصيات الدقيقة KIBGE–HAS مساوية لـ mM 2.74 [49]. بينما اشارت الطائي (٢٠١٢) الى ان قيمة ثابت ميكالس – منتن لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى من لعاب مرضى داء السكري مساوياً لـ mM ٥.٨٨[٥١]. (المصادر من رسالة محمد) كما تتفق هذه النتائج مع الباحثين (محمد بشار امنة). يبين الشكل (٤) زيادة سرعة التفاعل الانزيمي بازدياد الأس الهيدروجيني تدريجياً لحين الوصول الى السرعة القصوى عند الأس الهيدروجيني (١٠) ثم تبدأ السرعة بالانخفاض وعلى هذا الأساس يعتبر الأس الهيدروجيني١٠ هو الأس الهيدروجيني الامثل (Optimum pH). إذ الزيادة في pH تؤدي الى التنافر الكهربائي الداخلي او فقدان الشحنة الكهربائية الداخلية على جانب سلاسل الأحماض الأمينية الناتجة من فتح جزيئة البروتين المكون للانزيم وبذلك يصبح الانزيم غير قادر على تكوين معقد – مادة الأساس (ES)[٤٩]. ان ما تم التوصل الية يتطابق مع ما توصل له الباحثان Chuang و Yang (1990)[٥٢] والشريفي (2000)[50] و Raimi وجماعته (2011)[53] والطائي (٢٠١٢)[51]. بينما أظهرت نتائج Zhang وجماعته (٢٠٠٨) ان انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP المنقى من *Geobacillus thermodenitrificans* يمتلك رقماً هيدروجينياً أمثل عند ٩[48]، وكذلك اظهرت نتائج الباحثين Marhovaو Kostadinova (2010) ان pH الامثل لانزيم ALP المنقى من *Bacillus cereus* هي 9.5 باستعمال المحلول المنظم Tris–HCl و NaOH – glycine[54] ، أمّا pH الامثل للانزيم في *Bacillus spp.* فقد كانت (8.8) في دراسةMahesh وجماعته (2010)[55] كذلك وجد ان pH المثلى لعمل انزيم ALP المستخلص من بذور النباتات المختلفة تتراوح بين (10 و11)[56]. ووجد Morales وجماعته (٢٠١٢) ان pH الأمثل لعمل انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى من جذور الفاصوليا هي ٨ [57]. كذلك تم قياس درجة الحرارة المثلى للانزيم المنقى وقد أوضحت النتائج ارتفاع سرعة التفاعل لإنزيم ALP مع زيادة درجة الحرارة وكان أقصاها عند الدرجة الحرارة ٣٧ م وهذه النتائج تتفق مع ما توصلت اليه الشريفي (٢٠٠٠) بالنسبة للدرجة المثلى لعمل في مصل الدم [50]. و Ul–Qader وجماعته (٢٠٠٩)[49]. ووجد Kumar وجماعته (٢٠٠٨) ان درجة الحرارة المثلى لعمل ALP في بكتريا *Rhizobium* تقترب من ٣٧م°[58]. ووجد Morales وجماعته (٢٠١٢) ان درجة الحرارة المثلى لانزيم ALP المنقى من جذور الفاصوليا هي ٣٧م°[57]. وكذلك اظهرت نتائج الطائي (٢٠١٢) ان درجة الحرارة المثلى لعمل انزيم ALP المنقى من لعاب المصابين بداء السكري هي٣٧ م°[51] ، وبينت نتائج Njoku وجماعته (2011) ان درجة الحرارة المثلى لعمل انزيم ALP في كبد الارنب هي 45 م°[59]. تمت دراسة تأثير زمن التفاعل على فعالية الأنزيم المنقى إذ أظهرت النتائج ارتفاعاً في فعالية الانزيم مع زيادة مدة الحضن ولوحظ اقصى فعالية للانزيم عند ٣٧م° بعد مدة حضن لمزيج التفاعل الانزيمي لمدة (٢٠) دقيقة وبعدها بدأت فعالية الانزيم بالانخفاض. وقد يكون ذلك بسبب الطبيعة الحرارية المنسوبة للانزيم إذ كلما زاد الوقت تبدأ درجة الحرارة بكسر الاواصر بين اثنين من الأحماض الأمينية،وقد اتفقت النتائج لزمن استقرار الانزيم مع الباحث Raimi وجماعته (2011)[53] والطائي (٢٠١٢)[51]، أمّا Ul Qader وجماعته (2009) فقد اظهرت نتائجهم ان اقصى نشاط يصل له الانزيم عندما تكون مدة حضن المعقد ES لمدة (20) دقيقة [52] بينما اعطت نتائج Mahesh وجماعته (2010) ان مدة الحضن المثلى لمعقد التفاعل هي (30) دقيقة[55].

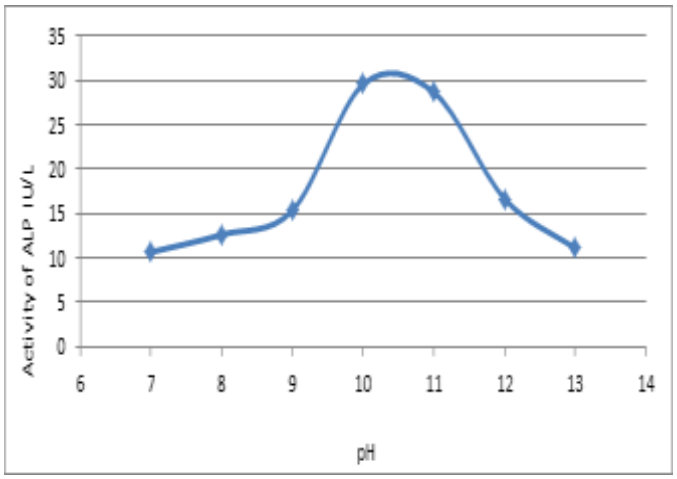


الشكل (٢) تأثير تركيز المادة الاساس على فعالية انزيم *ALP*المنقى جزئياً من متلازمة تكيس المبايض.

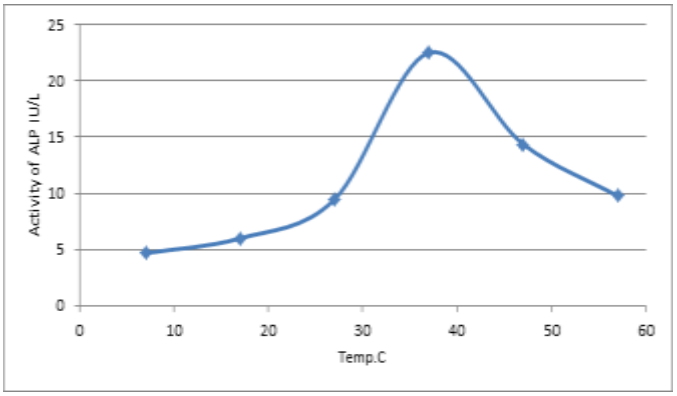
الشكل (٣)رسم لاينويفر – برك لحساب قيمة *Km* و *Vmax*. لانزيم*ALP*المنقى جزئياً من دم متلازمة تكيس المبايض عند النساء.



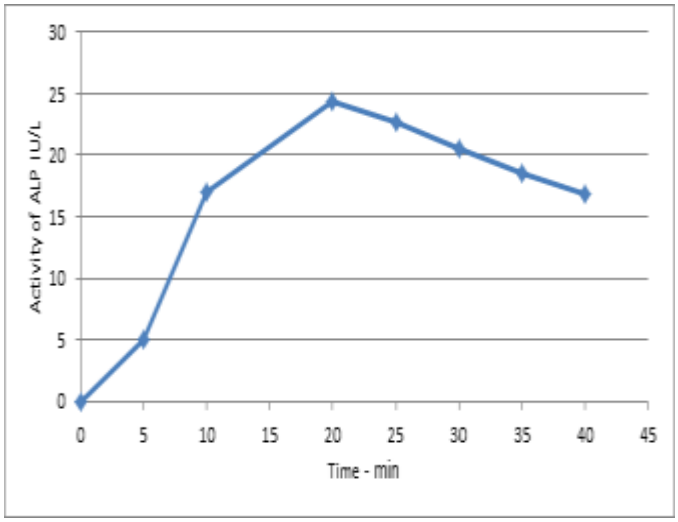
الشكل (٤) تأثير الاس الهيدروجيني على فعالية انزيم *ALP*المنقى جزئياً من متلازمة تكيس المبايض عند النساء



الشكل (٥) تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم *ALP*المنقى جزئياً من متلازمة تكيس المبايض عند النساء.

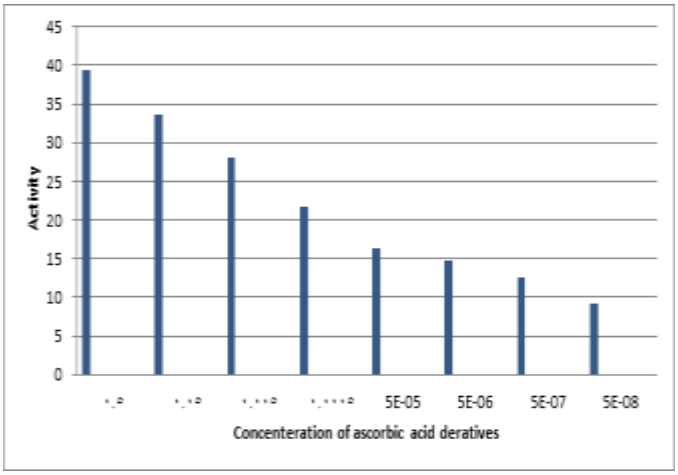


الشكل (٦) تأثير الزمن على فعالية انزيم ALPالمنقى جزئياً من متلازمة تكيس المبايض عند النساء

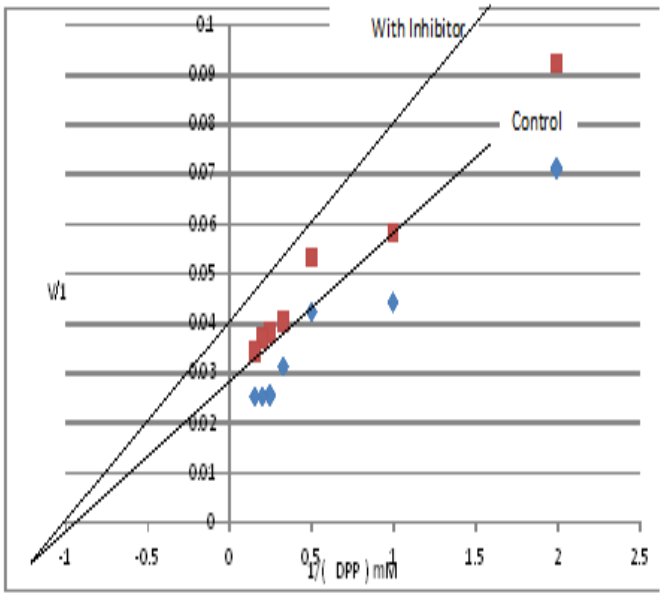


دراسة تاثير بعض مشتقات حامض الاسكوربك على فعالية انزيم ALP المنقى :

بينت النتائج حصول تثبيط في فعالية انزيم ALP وكانت نسبة التثبيط تتناسب مع زيادة تركيز المادة المثبطةوكما موضح في الشكل (٧) وهذا يتطابق مع الباحثين السابقين فقد وجد ان مشتقات كل من الكلوكوز ومشتقات الباراسيتومول تعمل على التقليل من فعالية انزيم ALP المنقى من مرضى داء السكري(60)(61) . كذلك لوحظ ان مشتقات حامض الاسكوربيك تعمل على تقليل سرعة انزيم اسبارتيت امينو ترانسفيريز(46). كما تم دراسة نوع التثبيط حيث تبين من خلال الدراسة ان نوع المثبط هو من نوع غير التنافسي non-compitive Inhibition حيث نلاحظ من رسم لينوفر–بيرك الشكل (٨) ان قيمة ال Km تبقى ثابتة بينما قلت قيمة ال Vmax.



الشكل (٧) تاثير بعض مشتقات حامض الاسكوبيك على فعالية انزيم ALP

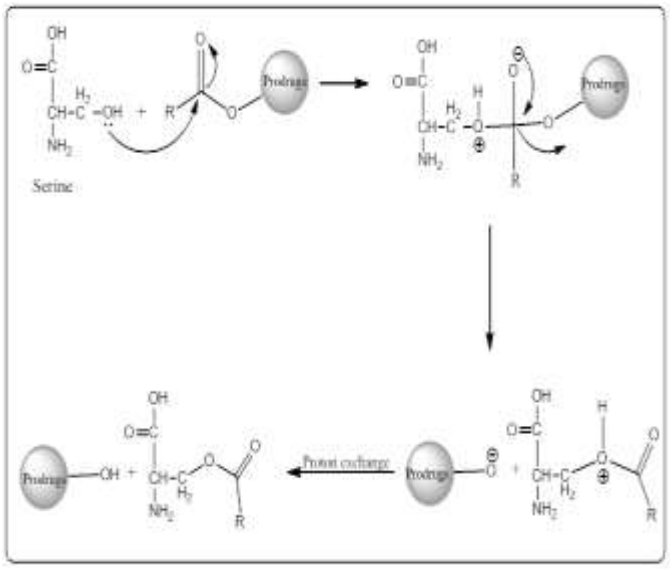


الشكل (٨)رسم لاينويفر – برك لمعرفة نوع التثبيط

جدول (٢) يوضح قيمKm، Vmax، Vmaxi للانزيمALP المنقى

	Km mM	Vmax (IU/L)	Vmaxi (IU/L)
Without Inhibitor	**1.14**	**39.8**	
With Inhibitor	**1.14**		**34.4**

ان ميكانيكية التثبيط يمكن توقعها كالآتي يحتوي إنزيم الفوسفاتيز القاعدي على السيرين في الموقع الفعال للانزيم ويتوقع حدوث تفاعل أسترة متبادلة بين مجموعة الهيدروكسيل الحرة للسيرين ومجاميع الكربونيل الموجودة في تركيب حامض الاسكوربيك حيث يتم فقد +H من متبقي الحامض الاميني السيرين والمكون للموقع الفعال للانزيم والضروري لعمل الانزيم وان هذا الفقدان سيودي الى تقليل او فقدان الانزيم لفعاليته وكما في الميكانيكية المقترحة التالية:



ميكانيكية الاسترة المتبادلة المقترحة لتثبيط إنزيم الفوسفاتيز القاعدي

المصادر:

1. Diamanti - Kandarakis، E. (2008). Polycystic ovarian syndrome : Patho- physiology, molecular aspects and clinical implications. Cambridge university press. Expert reviews in molecular. 10 : 1-15.
2. Gorry, A.; White, D.M. and Franks, S. (2006). Infertility in polycystic ovary syndrome. Springer. 30 (1): 27-33.
3. Dunaif، A.(1997)Insulin resistance and polycystic ovary syndrome :mechanism and implications for pathogenesis. Endocrinol.Rev.18:778-800.
4. Odunsi، k. and kidd,k.k (1999). A parad digm for finding genes for a complex human trait : polycystic ovary syndrome and follistation proc. Natl.Acad Sci 96 : 8315-8317.

national approach. Oxford: Blackwell Scientific publication.

13. Fauser، B. C. (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term healthy risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod. 19(1): 41-47.
14. Azziz, R.; Carmina, E.; Dewailly, D.; Diamanti-Kandarakis، E.; Escobar- Morreale، H. F. and Futterweit، W. (2006). Positions statement : criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. J.Clin. Endocrinol. Metab. 91(11): 4237-45.
15. Rotterdam, ESHRE /ASRM-Sponsored،PCOS،Consensus, Workshop, Group.(2004). Revised 2003.Consensus on diagnostic criteria and Long -term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril. 81(1): 19-25.
16. Schmidt, J. (2011). Polycystic ovary syndrome.: Ovarian pathophysiology and consequences after the menopause. University of Gothenburg, Sweden.
17. Elanine, M.; Biochem. J.; 244: 725, (1987).
18. Kaplan, L. A. and Pesce, A. J; "Clinical Chemistry – Theory, Analysis and Correlation"; 2nd edition; The C. V. Mosby Company; ST. Louis; P. P. 898-905 (1989).
19. MOSS, D. W.; J. Clin. Chem., 28(10) 2007; (1982).
20. Dixon, M.; Webb, E. C.; "Enzyme"; 3rd Edition, Longman group ltd; London, P. 255 (1979).
21. Varely, H and Gowenlock, A. H.; " Practical Clinical Biochemistry"; 6th edition. William Heinemann medical Books. Ltd; London. P. 528. (1988).

5. Schmidt, J. (2011). Polycystic ovary syndrome.: Ovarian pathophysiology and consequences after the menopause. University of Gothenburg, Sweden.
6. Veltman-Verhulst, S.M. (2012). Women's health implications of polycystic ovary syndrome. Ph.D.Thesis،Univer. of Utrecht.The Netherlands.
7. Rotterdam, ESHRE /ASRM-Sponsored،PCOS،Consensus, Workshop, Group.(2004). Revised 2003.Consensus on diagnostic criteria and Long -term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril. 81(1): 19-25.
8. charani ،N ; water worth، D.M ; Batty،S ; white، D.; Gihing – Smith,C; Conway، G.S.; Mc carthy، M.; franks، S.and will amson، R.(1997). Association of the storiod synthesis gene cyptt a with polycystic ovary syndrome and hyperandogenism.Hum.Mol.Genet.6 : 391-402.
9. Small, C.M.; Marcus, M.; Sherman, S.L. and Sullivan, A.K.(2005). CYP17 genotype predicts serum hormone levels among premenopausal women. Human Rep.20(8): 2162-2167.
10. Zhang, C.W. ; Zhang, X.L.; Xia, Y.J. ; Cao, Y.X. ; Wang, W.J. ; Xu, P. ; Che, Y.N. ; Wu, X.K. ; Yi, L. ; Gao، Q. and Wang, Y.(2012). Association between polymorphism of the CYP11A1 gene and polycystic ovary syndrome in Chinese women. Mol. Biol. Rep. 39: 8379-8385.
11. Cooper, H. E. ; Spellacy، W.N. ; Prem، K.A. and Cohen, W.D. (1968).Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. American J. of Obstet. and Gynecol. 100(3): 371-387.
12. Zadawski، A. and Duanif، A. (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a

22. Michael, L.; Bishop and Larrys, S. "Clinical Chemistry"; 5th edition; Baltimore. U.S.A.; P.252. (2005).
23. Garner, P. and Shin, W. J.; J. Clin. Endo. Cri. Metab.; 79: 1693; (1994).
24. Burtis, C. A. and Shwood, E. R.; "Tietz text Book of Clinical Chemistry" 3ed edition,; W. B. Sanders Company; Philadelphia; P. P. 767 – 770 (1999).
25. TrePanier, J. M.; Sergeant, L. E. and Stinson, R. A.; J. Biochem; 155: 653, (1976).
26. Fandek, N.; Moreau, D.; "Clinical Laboratory tests", 2nd edition; spring house corporation; P. 35 (1995).
27. LipPinco, T. T.; Williams and Wilkins; "Amanual of Laboratory and diagnostic tests"; 7th edition; Baltimor, U.S.A., P. 390. (2004).
28. LipPinco, T. T.; Williams and Wilkins; "Amanual of Laboratory and diagnostic tests"; 7th edition; Baltimor, U.S.A., P. 390. (2004).
29. Cepollaro, G. S.; and et al; Eur. J. Clin. Invest.; 26: 391; (1996).
30. Dixon, M. and Weeb, E.; "Enzyme"; 2nd edition; Longman Group Limited; London; P. 635 (1964).
31. Carpenter, P. L.; "Microbiology"; 2nd edition W. B. Saunders Company; Philadelphia, P. 316 (1961).
32. Whitby, C.; Smith, F. and Bechkette, J.; "Lecture notes on Clinical Chemistry"; 4th edition; Black Well Scientific Publication; London. P. 110 (1988).
33. Zilva, J. F; Panuall, P. R. and Manye; "Clinical Chemistry in diagnosis and treatment"; 6th edition; P. 306. (2002)
34. Leavell, D. E.; "Illustrated guide to diagnostic tests"; 1st edition; Spring House Corporation; P. 102 (1994).
35. Keiding, R; Chin. Sci.; 26: 291. (1964).
36. Stolbach, L. and Krant, M.; Gastro entolerology; 52: 819. (1967).
37. Latner, L.; "Enzymes in Clinical Chemistry"; Ruyssen and Van-deriessche, Eds., Elsevier. P. 110 (1963).
38. Latner, L.; "Enzymes in Clinical Chemistry"; Ruyssen and Van-deriessche, Eds., Elsevier. P. 110 (1963).
39. MOSS. D. W. and Whitby, L. G.; Clin. Chem. Acta.; 61: 63. (1975).
40. Hunter, J. and Prinkerto, M.; Obstel Gyencol; 36: 536. (1970).
41. Aleen, A., Obstel Gynecol; 40: 163; (1972).
42. Stolbach, L. and Krant, M., N. Engi. J. Med., 281: 757. (1966).
43. Nathonson, L. and Fishman, H.; Cancer; 27: 1388. (1971).
44. Fishman, W. H.; Inglis, N. R., Krant, M. J.; " Serum alkalinphosphatase of intestinal origin in patients with cancer and with cirrhosis of the liver. Clin. Chem. Acta, 12: P.P. 298-303. (1965).
45. MOSS, D. W.; King, E. J.; "Properties of Alkaline phosphates Fraction Separated by Starch-gel electrophoresis". Biochem. J. 84: P.P. 192-195. (1962).
46. Amina Farouk Yahya, Hanaa Kaain Salih,Firas taher maher.(2013)"Preparation of Prodrug from Indomethacine and Ascorbic acid and study of It's Effect on Asparatate amino transferase Enzyme Partially Purified from Blood of Diabetic Patients Type2". A thesis submitted To the Council of the College of Science،University of Tikrit.in Partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in Biochemistry)
47. الشريفي ،غسق عبد الجبار.(٢٠٠٠). "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

. 48. Zhang،Y.Ji, Ch. & Mao,Y.(2008)."Amoderately Thermostable alkaline phosphatase from Geobacillus thermodenitrificans T2:cloning expression and biochemical characterization". Applied Biochemistry and Biotechnology ;151(1):P:81-92.

49.Ul Qader, S. A. Iqbal, S. and Niazi, Z. (2009). "Partial purification and characterization of intracellular alkaline phosphatase from newly isolated strain of Bacillus subtillis KIBGE-HAS". Inter. J. of Microbiology; 7(1).

٥١. الطائي، إسراء إسماعيل ياسين.(٢٠١٢)." تنقية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي ودراسة تأثير بعض الهرمونات الستيرويدية في لعاب مرضى داء السكر " اطروحة دكتوراه. كلية التربية، جامعة تكريت

52.Chuang, N. N. & Yang, B. C. (1990). "A comparative study of alkaline phosphatase among human placenta, bovine milk, hepatopancrease of shrimp penaeus monodon(crustacean: Decapoda) and clam meretrix Iusoria (Bivalvia: Veneidae): to obtain an alkaline phosphatase with improved characteristics as a reporter". Comp. Biochem.Physiol. B.; 96(4):P: 787 - 789.

53. Raimi, O. G. Fatai, A. A. Bankole, H. A. Olaitan, S. N. Fajana, O. O. Kazeem, M. I. and Akabada, K. A. (2011). "Characterization of alkaline phosphatase [EC 3.1.3.1] from Giant African Snail (Archachatina marginata)". J. Cell

Tissue Research; 11(1):P: 2485 - 2489.

54. Kostadinova, S. and Marhova, M. (2010). "Purification and properties of alkaline phosphatase from Bacillus cereus".Biotechnol. & Biotechnol.EQ. ; 24(2) :P:602 - 606.

55.Mahesh, M. Neha, G. Rajesh, T. S. Somashekhar, R. and Puttaiah, E. T. (2010)."Isolation and characterization of extracellular thermostable alkaline phosphatase enzyme from Bacillus spp". JABPT.; I(1):P: 21 - 33.. Kumar, V. P. Prasanthi، S. Reddy, A. C. Raj، N. D. Anudeep, L. (2010).

56. "Characterization studies of thermostable alkaline phosphatase from various plant seeds". Journal of Applied Biosciences.; 36:P: 2403 - 2408.

57. Lorena, Morales. Natalia, Gutiérrez. Vanessa, Maya. Carmen, Parra. Eleazar, Martínez-Barajas. and Patricia, Coello.(2012)." Purification and Characterization of an Alkaline Phosphatase Induced by Phosphorus Starvation

in Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) Roots". J. Mex. Chem. Soc; 56(1):P: 82.

58. Kumar, M. Kour, P.P. and Ganjewala, D. (2008). "Isolation of periplasmic alkaline phosphatase from Rhizobium bacteria" Research Journal of microbiology ; 3(3):P:157 - 162.

59. Njoku, V. O. Chikezie, P. C. Kaoje, M. A. Monago, C. C. and Uwakwe, A. A. (2011). "Kinetic studies of alkaline phosphatase extracted from Rabbit (Lepus towsendii) liver". African Journal of Biotechnology;10(6):P:3157- 3162.

60-Mohammed Abbood Mohammed AL-Dolaymi،Hanaa Kaain Salih,Firas taher maher. (2013) "Preparation of Prodrug from Ibuprofen and Glucose and study of It's Effect on Alkaline Phosphatase Enzyme Partially Purified from Blood of Diabetic Patients Type II". A thesis submitted To the Council of the College of Science،University of Tikrit.in Partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in Biochemistry

61-Bashar Hifdhy Abbas ،Firas taher maher،Ayad Sa'ady Hameed.(2013) "Synthesis Of some phosphate paracetamol derivatives as prodrug and

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (2) : 169 -180

Tikrit.in Partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in Biochemistry.

study its effect on alkaline phosphate purified from serum of diabetic patient". A thesis submitted To the Council of the College of Science،University of

STUDY OF ALKALINE PHOSPHATASE KINETICS IN POLYCYSTIC OVARIES PATIENTS.

FIRAS T. MAHER

E.mail: Firas_maher@yahoo.com

ABSTRACT:

Purification of the alkaline phosphatase from serum for people living with polycystic ovaries were used gel filtration technique using the gel Sephadex column G100 with dimensions (20 × 2) cm, for the purpose of purification of alkaline phosphatase the use of a buffer of the (Tris -HCl) with a pH (7.2) to separate، enzyme kinetics, where studied the effect of different concentrations of substrate (sodium bi-article basis Phenyl phosphatases), results showed increasing the activity of alkaline phosphatases when increased substrate concentration. The resulting shape is hyperbolic. Km (1.14) mM, also studied the effect of pH and found that the optimal pH of the enzyme is (10). The optimum temperature was 37 ° C and the effect of reaction time was 20 minutes. The effect of Ascorbic acid show it works as an Inhibitor to the purified enzyme as that type of inhibition is non-competitive inhibitor type.