Journal of Education and Scientific Studies Chemistry Science
JESCS Vol. 16, No. 5, August 2020, ISSN 2413 - 4759

تقييم فعالية انزيم البرولايديز في امصال دم مرضى الفشل الكلوي

رفاه رزوق حميد السامرائي* ، مفاز مؤيد علي** ، عبد السلام توفيق صالح *
* جامعة سامراء / كلية التربية - قسم الكيمياء
** جامعة سامراء / كلية العلوم التطبيقية - قسم الكيمياء

خلاصة :

أجريت الدراسة الحالية على 64 عينة مصل دم، 33 منها لأشخاص مصابين بالفشل الكلوي و 31عينة مصل دم لاشخاص اصحاء كمجموعة سيطرة ، تتراوح اعمارهم مابين 22–55 سنة جمعت في الفترة من 22/ 11/ 2019 إلى 5/ 2/ 2020.

تم قياس فعالية انزيم البرولايديز ، وقياس تركيز كلا من المالون ثنائي الديهايد ، الكلوتاثيونو اليوريا في امصال دم مجموعتي المرضى والاصحاء وباستعمال الطرائق اللونية القياسية.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاض معنوي في فعالية انزيم البرولايديز في امصال دم المرضى وعند مستوى احتمالي $P \leq 0.05$ مقارنة بالاصحاء، مع انخفاض معنوي في تركيز الكلوتاثيون في امصال دم المرضى وعند مستوى احتمالي $P \leq 0.05$ مقارنة بتركيزه لدى الاصحاء اما تركيز المالون ثنائي الالدهايد ، ومستوى اليوريا فقد ارتفعا معنويا في امصال دمالمصابين بالفشل الكلوي وعند مستوى احتمالي $P \leq 0.05$ مقارنة بمستواه لدى الاصحاء. كما تم دراسة علاقة الارتباط بين فعالية انزيم البرولايديز وتركيز كلا من الكلوتاثيون والمالون ثنائي الالدهايد واليوريا، وقد اظهرت النتائج وجود علاقة ارتباط معنوية موجبة بين فعالية انزيم البرولايديز وتركيز الكلوتاثيون وكانت قيمة معامل الارتباط $r=0.483$ في حين كانت علاقة الارتباط ضعيفة وغير معنوية بين فعالية الانزيم وتركيز اليوريا والمالون ثنائي الالدهايد الا ان العلاقة كانت موجبة مع اليوريا وسالبة مع الـ MDA.

الكلمة المفتاحية: البرولايديز ، الكلوتاثيون ، المالون ثنائي الالدهايد ، الفشل الكلوي.

Evaluation the activity of serum prolidase in patients with renal failure

RafahRazooq Al-samarrai* Mafaz Moaied Ali** and Abdulsalam Tawfeeq Salih Alsamarai*
*Department of chemistry, college of education-University of Samarra
**Department of applied chemistry, college of applied science- University of Samarra

Abstract:

Current study conducted on serum of 64 persons 33 of them are with renal failure and 31apparently healthy as control group their age ranged between 22 - 55 years for the period between 22 / 11 / 2019 to 5 / 2 / 2020.

The parameters that measured are prolidase enzyme activity and concentration of Malondialdehyde-MDA, Glutathione-GSH and Urea in serum of patients and control groups by colorimetric methods.

The present study results show a significant ($P \leq 0.05$) decrease in prolidase enzyme activity in patients serum as compared to control with a significant ($P \leq 0.05$) decrease in Glutathione-GSH mean in patients serum as compared to control, while Malondialdehyde-MDA and Urea levels show a significant ($P \leq 0.05$) increase in patients serum as compared to control.

The correlation coefficient between prolidase activity and GSH, MDA and urea, the results indicate that the correlation was significant positive correlation between prolidase and GSH (R=0.483), while the correlation with other parameters (MDA and urea) were non-significant, in which the correlation was positive with urea and negative with MDA.

Key words: Prolidase , Malondialdehyde-MDA, Glutathione-GSH , Renal failure.

المقدمة

لدى الانسان كليتان والكلية عبارة عن عضو يشبه حبة الفاصوليا ذو لون يميل إلى الحمرة تقع خلف البريتون Peritoneum الذي يبطن الجدار الخلفي للبطن على جانبي العمود الفقري[1]. تعتبر الكلية الحارس الأمين للسوائل الجسمية فهي التي تنظم حجم وتركيب السوائل وتبقيها ضمن الحدود الطبيعية لذا فان عجز الكليتين عن عملهما يؤدي إلى اضطراب في السوائل الجسمية فتحدث حالات مرضية خطيرة حيث تقوم الكليتان بطرح الكثير من الفضلات كاليوريا Urea وحامض اليوريك Uric acid والامونيا والأملاح الصفراوية Bile salts وبالإضافة إلى ذلك تطرح الكليتين السموم المتكونة في الجسم نتيجة للفعاليات الحيوية المختلفة أو الداخلة إلى الجسم عن طريق الطعام ، وتقوم الكليتين أيضا بطرح العقاقير أو المواد الناتجة من تحللها ومنع تراكمها في الجسم[2].

تقسم أسباب الفشل الكلوي او مايعرف بالقصور الكلوي Renal failure إلى حالات مرضية قبل الكليمثل حالات الجفاف أو انخفاض الدم الشديد، وحالات مرضية كلوية، وحالات مرضية بعد الكلى مثل انسداد مجرى البول بسبب تضخم البروستاتا عند الرجال أو الحصوات. يتطور القصور الكلوي المزمن خلال اشهر او سنوات والاسباب الاكثر شيوعا له هي الاصابة بداء السكري غير المراقب ، ارتفاع ضغط الدم غير المسيطر عليه والتهاب الكبيبات الكلوية المزمن. اما الاسباب الاقل شيوعا فتتضمن مرض الكلى متعددة الكيسات ، اعتلال الكلى الناجم عن ارتداد البول من المثانة الى الحالب فالكلية، المتلازمة النفرونية ، الحصى الكلوية وامراض البروستات[3]. تتباين فعالية العديد من الانزيمات عن المستوى الطبيعي في امصال دم المرضى المصابين بالقصور الكلوي المزمن، اذ تنخفض فعالية العديد من الانزيمات Paraoxinase، aryl esterase ، Lactonase، Glucoolatonase، Superoxide dismutase، Aspartate Aminotransferase، Alanine Aminotransferase و Gamma–GlutamylTransferase مع ارتفاع فعالية انزيمات اخرى مثل polymine oxidase، Glutathion – Stransferase [4و5].

انزيم البرولايديز Prolidase (E.C.3.4.13.9) هو احد الانزيمات الموجودة في سايتوبلازم الخلية الحية، ينتمي الى صنف الانزيمات التي تحفز التحلل المائي Hydrolysis للبتيدات الثنائية او الثلاثية التي تحتوي على الحامض الاميني البرولين في النهاية الطرفية لكاربون الفا لينتج البرولين بشكل حر لذا فهو يلعب دورا حيويا مهما في المراحل الاخيرة من هدم البروتينات، كما ويساهم في الحفاظ على الاحماض الامينية سواء كانت من مصادر خارجية او داخلية من البروتين خاصة الكولاجين، اذ يلعب البرولايديز دوراً هاما في إعادة تدوير البرولين لصناعة الكولاجين ونمو الخلية، وربما بمثابة وسيلة ربط بين التغذية وهدم البروتين[6،7]. ويبدو أن نشاط البروليديز قد يكون خطوة تحديد في تنظيم التخليق الحيوي للكولاجين، اذيتشارك في نمو الخلايا وأيض الكولاجين، كما ان له دورا مهما في تجدد الخلايا بعد العمليات الجراحية من حيث دوره الفعل في علاج الجروح والخدوش والالتهابات[8].

يتواجد البرولايديز في البلازما؛ كريات الدم البيض؛ كريات الدم الحمر وفي مختلف الأجهزة

مثل الكلي والرحم والغدة الصعترية[9]. جين البروليديز يقع على الكروموسوم 19 ويرمز له (PEPD)، يتواجد الانزيم بشكل دايمر متجانس Homodimer معتمدا على وجود المنغنيز في مركز الانزيم لكل سلسلة ببتيدية، تتألف كل سلسلة ببتيدية من 493 من بقايا الأحماض الأمينية وبوزن جزيئي 54 كيلودالتون[10]، وتفيد الدراسات إن نشاط البروليديزيعتبر علامة للإجهاد التاكسدي Oxidative stress في العديد من الأمراض، مثل امراض القلب Heart disease، السكري، واعتلال الأعصاب السكري، وأمراض الكبد المزمنة وهشاشة العظام[11-16]، وكذلك يتأثر نشاط الانزيم لدى مرضى الاعتلالات الكلوية المصاحبة لمرض السكر Diabetic Nephropathy [17]. لذا تم اجراء الدراسة الحالية لتقييم نشاط الانزيم لدى المرضى المصابين بالفشل الكلوي.

المواد وطرائق العمل
Material and methods

- عينات الدراسة:

تم جمع 33 عينة دم من المرضى المصابين بالفشل الكلوي و31 عينة دم لأشخاص اصحاء كمجموعة سيطرة تتراوح اعمارهم مابين 22-55 للفترة من 22/ 11/ 2019 الى 5/ 2/ 2020. وذلك بسحب (5 سم^3) من الدم الوريدي بواسطة محقنة طبية تستعمل لمرة واحدة فقط ووضع الدم في انابيبGel tube ذات غطاء محكم، ثم وضعت هذه الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 3000 دورة/ دقيقة بعدها تم سحب المصل بواسطة الماصة الدقيقة Micropipette ثم قسّم المصل الى عدة اقسام ووزع في Eppendrof tube وحفظ عند درجة حرارة 20- مْ لحين قياس المتغيرات الكيموحيوية. التي شملت قياس فعالية انزيم البرولايديز ، وتركيزات كلا من المالون ثنائي الالدهايد Malondialdehyde-MDA، الكلوتاثيون Glutathione-GSH و اليوريا Urea في امصال دم العينات قيد الدراسة.

- طرائق العمل:

تقدير فعالية أنزيم البرولايديز في مصل الدم: تعتمد الطريقة على تفاعل انزيم البرولايديز مع الببتيد الثنائي (كلايسين - برولين) باعتبارهى مادة اساس للتفاعل(18) ليعطي الحامض الاميني البرولين و الكلايسين بشكل حر نتيجة لفعل الانزيم، ثم تقاس امتصاصية البرولين المتحررة بعد تفاعله مع النهايدرين عند الطول الموجي (515) نانومتر ويتم حساب فعالية الانزيم بالاعتماد على البرولين كمادة قياسية.

تعتمد الطريقة على استعمال المحاليل التالية:

■ محلول التخفيف المتكون من 1 ملي مول من كلوريد المنغنيز2Mncl المحضر في 6 ملي مول من محلول الترس المنظم Tris-HCl ذي الاس هيدروجيني 7.8-8.0.

■ محلول المادة الاساس Glycyl-L-Proline : اذ تم تحضير94 ملي مول/ لتر من المادة الاساس في(0.05) مول/ لتر من محلول الترس المنظم والحاوي على 1 ملي مول / لتر من 2Mncl والاس الهيدروجيني (7.8 – 0.8) .

■ محلول البرولين L-proline القياسي : تم تحضير محلول البرولينبتركيز 650 مايكرومول/ لتر مذابا في 0.45 مول/ لتر من محلول حامض الخليك ثلاثي الكلورTrichloro acetic acid-TCA .

■ كاشف شينارد Chinard´s : حضر الكاشف بمزج 120 مل من حامض الخليك الثلجي مع 80 مل من 6 مول/ لتر من حامض اورثو- حامض

الفسفوريك Ortho-phosphoric acid و25 غم من النهايدرين، يمزج المحلول جيدا عند درجة حرارة (70) م^0 في حمام مائي.

■ محلول أيقاف التفاعل : يتكون من 0.45 مول / لتر من TCA، تتم عملية الاذابة عند درجة (70)م^0 في حمام مائي قبل تحضير كاشف Chinard´s ،

تم الاعتماد على الخطوات التالية لتقدير فعالية الانزيم:

1-تم تخفيف المصل بمعدل ست مرات وذلك بأضافة250 مايكرو ليتر من محلول التخفيف لكل 50مايكرولتر من مصل الدم ثم حضن المزيج لمدة 24 ساعة عند 37 م^0، ثم إضافة 100مايكرولتر لعينات السيطرة .

2 -حضرت انابيب اختبار كما في الجدول الآتي :

المحاليل	الاختبار	السيطرة
محلول المادة الاساس	µl 100	.....
محلول مصل الدم المخفف	µl 100	µl 100

حضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة 37 مئوية ،ويتم ايقاف التفاعل بإضافة 1مل من محلول الايقاف، تطرد الانابيب مركزيا لمدة 5دقائق عند سرعة 2000 دورة/ دقيقة ، ويسحب 500مايكروليتر من المحلول الرائق من كلا الانبوبتين،وتحضر اربع انابيب سيطرة Control، الاختبار Test،قياسي Standardوالكفيء Blank كما في الجدول:

ت	المحاليل	السيطرة	الاختبار	قياسي	كفئ
1	كاشف شينارد	1ml	ml 1	ml 1	ml 1
2	حامض الخليك الثلجي	ml 1	ml 1	ml 1	ml 1
3	المحلول الرائق	ml 0.5	ml 0.5	.....	
4	محلول البرولين القياس	.....	.....	ml 0.5	.....
5	محلول ايقاف التفاعل	.....	.....	.....	ml 0.5

ليتطور اللون ويكتمل تكوين المعقد الملون يتم حضن الانابيب اعلاه لمدة 10دقائق عند 90 م^0 في حمام مائي، يتم قياس الامتصاصية عند515نانوميتر بواسطة جهاز المطياف الضوئي بعد تصفير الجهاز بالكفئ .

يتم حساب الفعالية بالاعتماد على المعادلة الآتية[17]:

$$\text{Prolidase Activity} = \frac{\text{abs of test - abs control}}{\text{abs of standard}} \times 2.4 \times [s]$$

تقدير تركيز المالون ثنائي الالديهايد في مصل الدم
Determination of concentration serum MDA

أ-مبدأ الطريقة Procedure:

تم تقدير تركيز المالون ثنائي الالديهايدMDA في مصل الدم الذي يمثل أحد النواتج الرئيسة للأكسدة الفوقية للدهون، وتعتمد الطريقة على التفاعل بين بيروكسيدات الدهون وبشكل رئيس MDA وبين حامض ثايوباربيوتريك– Thiobarbituric acid TBA ويتم التفاعل في وسط حامضي ويكّون ناتج الملون له اعلى امتصاصية عند532 نانوميتر) 19).

ب- المحاليل المستخدمة :

1- **محلول الثايوباربيتيورك** (TBA- solution) :

● محلول (A) ذو تركيز (0.05 M): حُضر بإذابة (0.2) غم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH في (50) مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى (100) مل من المحلول نفسه.

● محلول (B) : حضر بإذابة (0.6)غم من مادة الـ TBA في (50) مل من محلول A مع تسخين قليل في حمام مائي ثم أكمل الحجم الى (100)مل بالمحلول نفسه ، وحضر هذا المحلول أنياً قبل الاستعمال .

2 - **محلول حامض الخليك ثلاثي الكلوريد** : Trichloroacetic acid – TCA حضر المحلول بتركيزين :

التركيز الأول : (17.5) ٪ يحضر بإذابة (17.5) غم من TCA في (50) مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى(100) مل بالمذيب نفسه وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

التركيز الثاني : (70) ٪ يحضر بإذابة (70) غم من TCA في (80) مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى (100) مل بنفس المذيب وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

ج- طريقة العمل Procedure:

تم اعتماد الخطوات الآتية لتقدير MDA في مصل الدم:

Solutions	Sample	Blank
Serum	150 µl	.....
Distilled water	.....	150 µl
TCA(17.5٪)	1ml	1ml
تم مزج الانابيب الحاوية على المحاليل جيداً ثم حضنت في حمام مائي عند درجة حرارة 100 ْم لمدة 15 دقيقة وتركت لتبرد ثم اضيف :		
TBA(0.6٪)	1ml	1ml
TCA(70٪)	1ml	1ml

حضنت الأنابيب عند 37 مْ لمدة 20 دقيقة ثم فصل الرائق باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة وقُرأت الامتصاصية للمحلول الرائق عند الطول الموجي532 نانوميتر.

د- الحسابات **Calculation**:

تم حساب تركيز:- MDA في مصل دم النساء الحوامل قيد الدراسة بحسب العلاقة الآتية :

$$\text{Conc of MDA}(\mu\text{mol /L}) = \frac{(A)}{Eo * L} * D$$

A = الامتصاصية .

D = معامل التخفيف .

L= مسار الضوء (سم).

E = 1.56 105 x (لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$).

معدل التخفيف (D) = حجوم المحاليل المُستخدمة في أنبوب العينة / حجم العينة

8.3-تقدير تركيز كلوتاثايون GSH في مصل الدم
Determination of serum glutathione concentration

أ-مبدأ الطريقة Procedure :

تم استعمال الطريقة المحورة [20] في تقدير الكلوتاثايون المختزل في مصل الدم إذ تعتمد هذه الطريقة على استعمال كاشف إلمان Elman's reagent الحاوي على Dithio 5أ5 acid bis-2-Nitrobenzoic، الذي يتفاعل بشدة مع الكلوتاثايون ويختزل مجموعة السلفاهيدراللكلوتاثايون لينتج معقد أصفر اللون له أقصى امتصاصية عند الطول الموجي 412 نانوميتر وإن تركيز الناتج المتكون يعتمد على تركيز الكلوتاثيون الموجود في المصل.

المحاليل المستخدمة:-

1 - **محلول الترسيب المحتوي على حامض السلفوسالسيليك Sulfosalicylic acid solution**:

حضر بإذابة 4 غم من حامض السلفوسالسيليك في 50 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

2 - **محلول الفوسفات المنظم** Phosphate buffer solutionز(pH =8): حضر محلول الفوسفات بمزج المحلولين A،B وضبط الأس الهيدروجيني عند (pH 8) بوساطة بضع قطرات من محلول (A).

- محلول (A) (0.6M) : حضر بإذابة8.16 غم من فوسفات البوتاسيوم أحادية القاعدةKH_2PO_4 في (50)مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى (100) مل .
- محلول (B)(0.08M): حضر بإذابة 0.568 غم من فوسفات الصوديوم ثنائية القاعدة Na_2HPO_4 في 50)) مل من الماء المقطر ثم يكمل الحجم الى (100)مل .

3 - **محلول كاشف إلمان** : حضر بتركيز (0.1) ملي مول بإذابة (0.004)غم من مادة DTNB في (50)مل من محلول الفوسفات المنظم pH (8) ثم اكمل الحجم الى (100)مل من المحلول المنظم وحضر مباشرة قبل الاستعمال ووضع في قنينة معتمة لحماية المحلول من الضوء .

4 - **محلول الخزين القياسي (1) ملي مولاري** : حضر بإذابة (0.384) غم من الكلوتاثايون في (6.25) مل محلول الفوسفيت المنظم (0.2) مولاري كمحلول خزين ثم حضرت التراكيز الآتية : (5 ،10 ، 15 ،20).

طريقة العمل Procedure :-

تم تقدير كلوتاثايون المختزل في مصل الدم بالاعتماد على الخطوات الآتية:

Blank	Sample	Solutions
.....	150 µl	Serum
150 µl	.....	Distilled water
150 µl	150 µl	Precipitation solved
اضيفت المحاليل في الانابيب ومزجت جيدا ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة /دقيقة لمدة5 دقائق ثم اخذ من :		
.....	µl 150	Supernatant solved
4.5ml	4.5ml	Elman reagent

مزجت محتويات الانابيب جيدا بوساطة المازج وخلال 3 ثواني ، تم قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 412 نانوميتربعد تصفير الجهاز على محلول الكفئ .

الحسابات Calculation:-

تم حساب تركيز الكلوتاثايون المختزل في مصل دم النساء الحوامل قيد الدراسة اعتمادا على المعادلة التالية :

$$\text{Conc. of GSH . (µmol/l)} = \frac{(A)}{Eo \times L} * 10^6$$

A = الامتصاصية.

E = 13600 (لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$).

L = طول الخلية 1 سم.

قياس اليوريا في الدم:

تم قياسها حسب مبدأ الطريقة الانزيمية لعدة الفحص الجاهزة المجهزة من شركة Biomaghreb هي كالاتي:-

أ. مبدأ الطريقة :

تتفاعل اليوريا مع الماء بوجود انزيم اليوريز Urease لتكون الامونيا وغاز ثاني اوكسيد الكربون ثم يتم تقدير الامونيا الناتجة من تتفاعل Salicylate و Hypochlorite لتكون 2,2 – Dicarboxy Indophenol الاخضر اللون ، وتم قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 590 نانو متر.

ب. **المحاليل المستعملة** :

تم استعمال المحاليل التالية لتقدير تركيز اليوريا:

1 – محلول الفوسفات المنظم Phosphate bufferSolution: ويتكون من محلول الفوسفات المنظم ذي الأس الهيدروجيني pH= 6.7 وبتركيز 60 ملي مول / لتر.

2 – الكاشف الملون Color Solution : ويتكون من الفوسفات المنظم pH 6.7 بتركيز 60 ملي مول / لتر ، و سالسيلات الصوديوم بتركيز 60 ملي مول / لتر ، و EDTA بتركيز 2 مليمول/ لتر ، ونايتروبروسيد الصوديوم بتركيز 32ملي مول / لتر، واليوريز بتركيز 3000وحدة دولية/ لتر.

3 – **المحلول القياسي Standard Solution**: ويتكون من اليوريا القياسية بتركيز 50 ملغم/ 100 سم^3.

4 – **لمحلـول القاعـدي Alkaline Solution**:
ويتكـون مـن هايبوكلـورات الصوديـوم بتركيـز 40 ملي مول/ لـتر ، وهيدروكسيد الصوديـوم بتركيز 150 ملي مـول/ لـتر ويتـم تخفيـف 10سـم^3 مـن المحلـول القاعـدي ب 90 سـم^3 مـن المـاء المقطـر في قنينـة حجميـة سـعة 100 سـم^3 وتحفـظ لحـين الاسـتعمال.

5 – **محلـول العمـل WorkingSolution**:
يتكـون مـن إذابـة الكاشـف الملـون في محلـول الفوسـفات المنظـم.

ج. طريقة العمل:
تـم قيـاس تركيـز اليوريـا بالاعتـماد عـلى الخطـوات المدرجـة في الجـدول التـالي، كـما وتـم قيـاس كل تركيـز مـن محاليـل اليوريـا القياسـية بواقـع خمسـة مكـررات.

Reagents	Blank	Standard	Sample
Standard Solution	–	10 µl	–
Serum	–	–	10 µl
Phosphate buffer Solution	1 ml	1 ml	1 ml
تمزج الانابيب عند درجة حرارة 37° ملمدة خمس دقائق			
Working Solution	1 ml	1 ml	1 ml
تمزج الانابيب جيدا وتحضن عند درجة حرارة 37° مثم يتم قياس الامتصاصية عند 590 نانومتر بواسطة المطياف الضوئي مقابل الكفئ.			

د– الحسابات:
تـم حسـاب تركيـز اليوريـا في العينـات قيـد الدراسـة باسـتعمال المعادلـة التاليـة:–

يوريـا الـدم (ملغم/ 100سـم^3) = قـراءة النموذج\ قـراءة القيـاسي × 50*

* تركيز المحلول القياسي.

– التحليل الاحصائي:
حللـت النتائـج احصائيـا باسـتخدام البرنامـج الاحصائـي SPSS لتحديـد المعـدل والانحـراف المعيـاري وتـم تحديـد الفروقـات بـين المجموعتـين باسـتخدام اختبـار T– test عنـد مسـتوى معنويـة (P≤0.05) ، كـما تـم حسـاب معامـل الارتبـاط Correlation Coefficient لايجـاد العلاقـة بـين فعاليـة انزيـم البرولايديـز والمعطيـات الاخـرى قيـد الدراسـة.

النتائج والمناقشة: Results and discussion
تـم قيـاس فعاليـة انزيـم البرولايديـز ومسـتويات كلا مـن الكلوتاثيـون ،المالـون ثنائـي الالدهايـد واليوريـا في امصـال دم المصابـين بالفشـل الكلـوي و مجموعـة الاصحـاء كمجموعة سـيطرة، اظهـرت نتائج الدراسـة الحاليـة ان متوسـط ± الانحـراف المعيـاري لفعاليـة انزيـم البرلايديـز كانـت 42.015±12.46 وحـدة دوليـة / لـتر في أمصـال دم المـرضى في حـين كانـت 29.67±158.175 وحـدة دوليـة / لـتر في امصـال دم الاصحـاء وكـما في الجـدول (1).

جدول (1):

متوسط ± الانحراف المعياري لفعالية البرولايديز وتراكيز كلا من الكلوتاثيون ، المالون ثنائي الالدهايد واليوريا في امصال المصابين بالفشل الكلوي والاصحاء

Parameters	Mean±SD		P-Value
	Control (31)	Patients (33)	
Prolidase IU /L	158.175±29.67	42.015±12.46	0.005
GSH (mmol /L)	7.368±1.25	4.5±1.8	0.005
MDA (mmol /L)	1.29±.67	4.17±1.717	0.005
Urea (mg /dl)	18.74±4.125	46.56±11.45	0.005

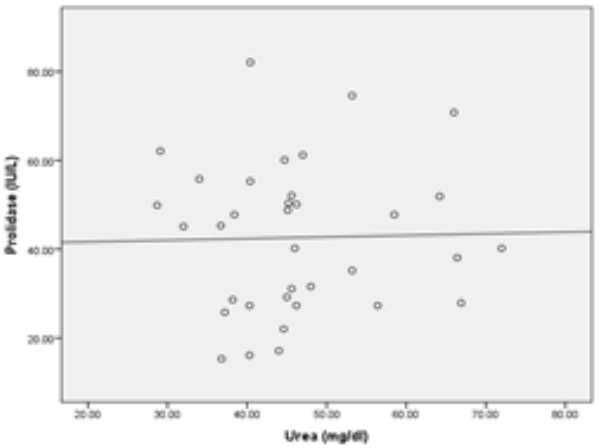
كما يظهر من الجدول اعلاه ان متوسط± الانحراف المعياري لتركيز الكلوتاثيون بلغ 4.5±1.8 ملي مول/ لتر في امصال دم المرضى في حين كان 7.368±1.25 ملي مول/ لتر لدى مجموعة السيطرة، اما الـ MDA فقد كان 4.17±1.717 ملي مول/ لتر لدى المرضى و ±67.1.29 ملي مول/ لتر في امصال دم الاصحاء كمجموعة سيطرة، واليويا كانت 46.56±11.45 ملغم/ 100سم^3 لدى المرضى مقارنة بـ 18.74±4.125ملغم/ 100سم^3 لدى الاصحاء.

يتضح من النتائج اعلاه ان فعالية انزيم البرولايديز ينخفض معنويا لدى المرضى المصابين بالفشل الكلوي مقارنة بالاصحاء وعند مستوى احتمالي $P \leq 0.05$، وقد يعزى سبب الانخفاض في فعالية الانزيم الى الخلل الحاصل في نسيج الكلية نتيجة المرض، اذ تعتبر الكلية مصدرا مهما وغنيا بانزيمالبرولايديز وهذا يتفق مع نتائج العديد من الدراسات(21-23). تختلف نتائج الدراسة الحالية مع نتائج Akhilesh (17) الذين اشار الى ارتفاع فعالية الانزيم لدى مرضى السكري المصابين بالاعتلالات كلوية متقدمة، وقد يعزى سبب الاختلاف الى ان المرضى في الدراسة الحالية قد خضعوا الى الديلزة الكلوية وهذا ممكن ان يؤثر على فعالية العديد من الانزيمات. كما واشار Erbagci وجماعته (12) الى ان فعالية الانزيم تزداد مع ازدياد الاجهاد التاكسدي.

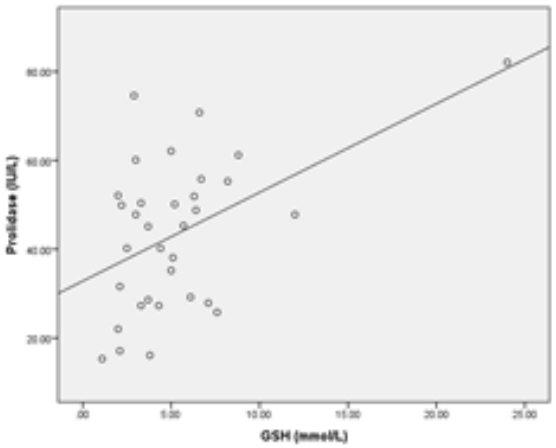
ان انخفاض تركيز الكلوتاثيون وارتفاع مستوى الـ MDA معنويا وعند مستوى احتمالي $P \leq 0.05$ يعتبر مؤشرا واضحا لحدوث حالة الاجهاد التأكسدي والتي تترافق غالبا مع الاصابة بالفشل الكلوي نتيجة للضرر الحاصل لخلايا نسيد الكلى، حيث ان زيادة الجذور الحرة وخاصة اصناف الاوكسجين الفعالة Reactive oxygen spesies-ROS وانخفاض مستوى مضادات الاكسدة Antioxidant مثل الكلوتاثيون الذي يعتبر خط الصد الاول ضد الاجهاد التاكسدي ودوره الهام في اقتناص الجذور الحرة (24و25)، مسببا انخفاض مستويالكلوتاثيون نتيجة استهلاكه، وتحوله من الشكل المختزل الفعال GSH الى الشكل المؤكسد غير الفعال GSSG (26).

ان الارتفاع المعنوي الحاصل في مستوى اليوريا لدى المرضيوعند مستوى احتمالي $P \leq 0.05$ مقارنة بالاصحاء والمتحصل عليه من خلال نتائج الدراسة الحالية يتوافق مع نتائج Vanholder وجماعته(27) الذين اعتبروا ان اليوريا احدى مؤشرات الاحتجاز البولي في مرض التهاب الكلى المزمن وان ارتفاع مستوى اليوربا في الدم هو احد اهم العلامات على مرض التهاب الكلى المزمن والفشل الكلوي واحد طرق اختبار كفاءة الكلية.كما وتتفق النتائج مع كل من Makiko واخرون(28) ، وWalser واخرون(29).

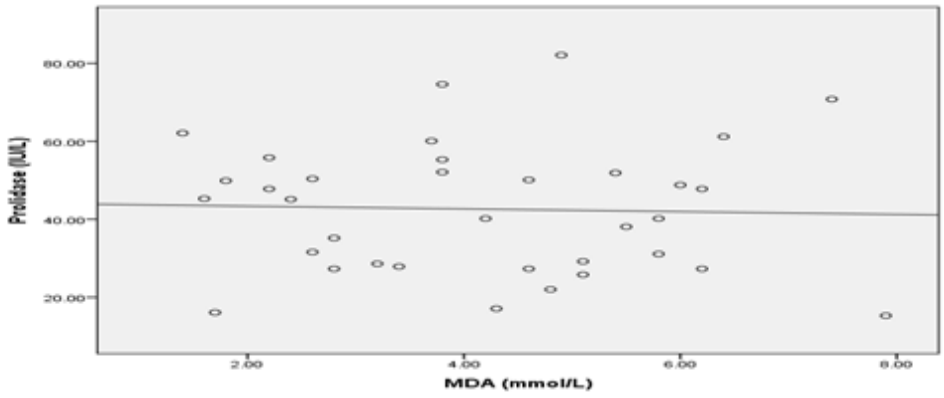
تم دراسة علاقة الارتباط بين فعالية انزيم البرولايديز وتركيز كلا من الكلوتاثيون والمالون ثنائي الالدهايد واليوريا، وقد اظهرت النتائج وجود علاقة ارتباط معنوية موجبةبين فعالية انزيم البرولايديز وتركيز الكلوتاثيون وكانت قيمة معامل الارتباط r=0.483 وكما في الشكل (1)، في حين كانت علاقة الارتباط ضعيفة وغير معنوية بين فعالية الانزيم وتركيز اليوريا والمالون ثنائي الالدهايد الا ان العلاقة كانت موجبة مع اليوريا وسالبة مع الـ MDA وكما في الشكلين (2 و3) على الترتب، لم تشر الادبيات الى دراسة علاقة الارتباط بين فعالية انزيم البرولايديز والمعطيات قيد الدراسة لدى مرضى الفشل الكلوي.



شكل(1) علاقة الارتباط بين انزيم البرولايديز والكلوتاثيون في مجموعة المرضى.



شكل(2) علاقة الارتباط بين انزيم البرولايديز واليوريا في مجموعة المرضى

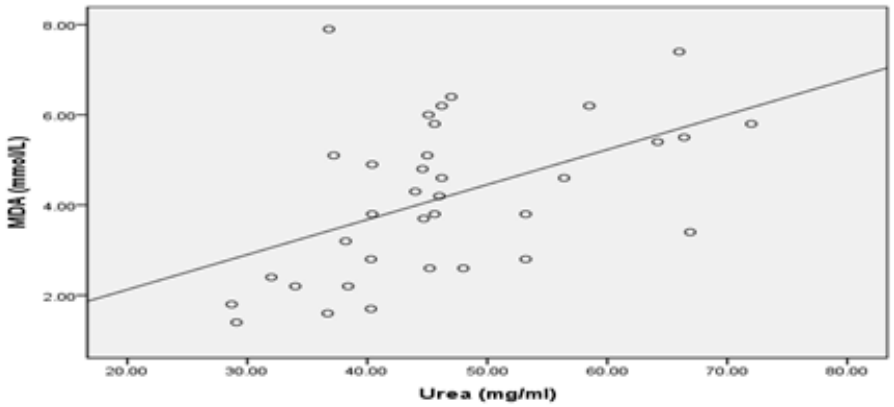


شكل(3) علاقة الارتباط بين انزيم البرولايديز والمالون ثنائي الالدهايد في مجموعة المرضى.

ويوضح الجدول (2) قيم علاقات الارتباط والاحتمالية بين المعطيات قيد الدراسة، ويظهر الجدول ان علاقة الارتباط المعنوية كانت بين تركيز اليوريا والمالون ثنائي الالدهايد اذ كانت قيمة معامل الارتباط r=0.496 وكما في الشكل (4)، في حين كانت جميع العلاقات الاخرى غير معنوية، وهذه النتائج تتفق مع نتائج Reshma وجماعته (30) الذين اشاروا الى وجود علاقة ارتباط معنوية بين تراكيز اليوريا والمالون ثنائي الالدهايد لدى المرضى المصابين باعتلالات كلوية.

جدول (2): قيم علاقات الارتباط بين المعطيات قيد الدراسة

Correlations					
		GSH	Prolidase	Urea	MDA
GSH	Pearson Correlation	1	.483**	−.051	.056
	Sig. (2-tailed)		.004	.780	.756
	N	33	33	33	33
Proli-dase	Pearson Correlation	.483**	1	.007	−.040
	Sig. (2-tailed)	.004		.970	.826
	N	33	33	33	33
Urea	Pearson Correlation	−.051	.007	1	.496**
	Sig. (2-tailed)	.780	.970		.003
	N	33	33	33	33
MDA	Pearson Correlation	.056	−.040	.496**	1
	Sig. (2-tailed)	.756	.826	.003	
	N	33	33	33	33
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).					



شكل(4) علاقة الارتباط بين اليوريا والمالون ثنائي الالدهايد في مجموعة المرضى.

الاستنتاجات:

نستنتج من خلال الدراسة الحالية:

1 – نتيجة الاصابة بالفشل الكلوي تنخفض فعالية انزيم البرولايديز مع زيادة مستوى الاجهاد التاكسدي.

2 – وجود علاقة ارتباط معنوية بين فعالية انزيم البرولايديز وخط الدفاع الاول ضد الجذور الحرة والمتمثل بالكلوتاثايون في امصال دم المرضى.

التوصيات:

من خلال الدراسة الحالية نوصي بمايلي:

1 – دراسة حركية لفعالية انزيم البرولايديز لدى المرضى المصابين بالفشل الكلوي.

2 – دراسة العلاقة بين فعالية انزيم البرولايديز ومختلف الامراض الكلوية المزمنة.

References

1-Nicki R,C, Brian R. W. and Stuart H. R. 'Davidson's Principles and Practice of Medicine' 21t h ed. Churchill Livingstone. 2010 pp, 462.

2- Ganong (2016). «Renal Function & Micturition». Review of Medical Physiology, 25th ed. McGraw-Hill Education. p. 677. ISBN 978 - 0 - 07-184897 - 8.

3- R. E. Gilbert and M. E. Cooper, "The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury?" Kidney International, vol. 56, no. 5, pp.1627-1637, 1999.

4. Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette and Edmundo Pessoa de Almeida Lopes. Liver enzymes serum levels in patients with chronic kidney disease on hemodialysis: a comprehensive review. Clinics (Sao Paulo) .2014.

5-Tareqc Y. Ahmed and Lana A. Mansur. some enzymatic activity in serum with chronic renal failure.WJPPS 2016;5(4): 423 - 430.

6- M. Bergmann and J. S. Fruton, "On proteolytic enzymes, XII,regarding the specificity of aminopeptidase and carboxypeptidase,a new type of enzyme in the intestinal tract," The Journalof Biological Chemistry, vol. 117, pp. 189-202, 1937.

7- A. Surazynski,W. Miltyk, J. Palka, and J. M. Phang, "Prolidasedependentregulation of collagen biosynthesis," Amino Acids,vol. 35, no. 4, pp. 731-738, 2008.

8- J. A. Palka and J. M. Phang, "Prolidase activity in fibroblasts isregulated by interaction of extracellular matrix with cell surfaceintegrin receptors," Journal of Cellular Biochemistry, vol. 67, pp.166-175, 1997.

9- G. Zanaboni, K. M. Dyne, A. Rossi, V. Monafo, and G. Cetta,"Prolidase deficiency: biochemical study of erythrocyte andskin fibroblast prolidase activity in Italian patients.," Haematologica, vol. 79, no,1, pp.13 - 18, 1994.

10-Pałka JA. The role of prolidase as an enzyme participating in the metabolism of collagen.RoczAkad Med Bialymst. 1996; 41(2): 149 - 60.

Nephropathy and End Stage Renal Disease:A Correlative Study with Glucose and Creatinine. Biochemistry Research International, vol. Article ID 291458, 7 pages.

18- En, V.; Uluca, U.; Ece. AN., et al.(2014). Serum prolidase activity andoxidant antioxidant status in children with chronic hepatitis B virus infection. Ita. J. of Pedi. ,Nov. 40 (1).

19-El-Missiry, M.A. ;Fayed , T. ;El-sawy ,M . R and El-sayed , a . a .(2007).Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress andtissue in jury Ecotoxicology and Environmental safety; 66: 278 - 286.

20- Sedlak, J. and Lindsay, R. H.(1968) Analytical biochemistry.; P: 192. (Cited by Al-Zamyle2001).

21-EvrenkayaTR, AtasoyuEM, KaraM., Unver S., Gultepe M.. The role of prolidase activity in the diagnosis of uremic bone disease. Ren Fail. 2006; 28: 271-274.

22- Gejyo F., Kishore BK, Arakawa M.. Prolidase and prolinase activities in the erythrocytes of patients with chronic uremia. Nephron. 1983; 35: 58 - 61.

23- Liu G., Nakayama K., Awata S., Tang S., Kitaoka N., Manabe M., Kodama H.. Prolidaseisoenzymes in the rat: their organ distribution, developmental change and specific inhibitors. Pediatr Res. 2007; 62: 54-59.

24-Neiva T.J., Benedetti A.L., Tanaka S.M., Santos J.I. and Amico E.A. (2002). "Determination of serum aluminum,

11-Al-Gaff ,N. S. and Hameed, R. R. A correlation study of between prolidase activity and oxidative stress and anti-oxidant in patients with heart disease. journal of Modren Science & Heritage 2016; 4(3): 353 - 364.

12-E.Uzar,Y.Tamam,O. Evliyaoglu et al., "Serumprolidase activityand oxidative status in patients with diabetic neuropathy,"Neurological Sciences, vol. 33, no. 4, pp. 875-880, 2012.

13- I. Myara, A. Myara, M. Mangeot, M. Fabre, C. Charpentier, andA. Lemonnier, "Plasma prolidase activity: a possible index ofcollagen catabolism in chronic liver disease," Clinical Chemistry,
vol. 30, no. 2, pp. 211-215, 1984.

14- A. B. Erbagci, M. Araz, A. Erbaˇgci, M. Tarakc¸ioˇglu, and E.S. Namiduru, "Serum prolidase activity as a marker of osteoporosisin type 2 diabetes mellitus," Clinical Biochemistry, vol.35, no. 4, pp. 263-268, 2002.

15- M. Savas, E. Yeni, H. Celik et al., "The association of serumprolidaseactivity and erectile dysfunction," Journal of Andrology,vol. 31, no. 2, pp. 146 - 154, 2010.

16- S. Kumari, A. K. Verma, S. Rungta, R. Mitra, R. Srivastava, andN. Kumar, "Serum prolidase activity, oxidant and anti-oxidant

17- Akhilesh Kumar Verma, Subhash Chandra, Rana Gopal Singh, Tej Bali Singh, Shalabh Srivastava, and Ragini Srivastava. Serum Prolidase Activity and Oxidative Stress in Diabetic

platelet aggregation and lipid peroxidation in hemodialyzed patients". Braz. J. Med. Biol. Res., 35(3): 345 - 350.

25- Weinstein T., Chagnac A., Korzets A., Boaz M., Malachi T. and Gafter U. (2000). "Hemolysis in hemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress". Nephrol. Dial. Transplant., 15: 883 - 887.

26- Fisher, C.; J. ''Lipid hydroperoxide (LOOH) of the fatty acid Organoselenium compounds as Glutathione peroxidase mimics'' . B - 180 medical Laboratories free radical and radiation biology program, the university of Iowa 2003; 77: 222.

27-Vanholder R, Gryp T, and Glorieux G. Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research). Nephrol Dial Transplant. 2018 Jan 1; 33(1): 4 - 12.

28- Makiko Seki, Masaru Nakayama, TeppeiSakoh, et al. Blood urea nitrogen is independently associated with renal outcomes in Japanese patients with stage 3-5 chronic kidney disease: a prospective observa- tional study BMC Nephrology volume20, Articlenumber: 115 (2019).

29- WalserM.Urea metabolism in chronic renal failure. J Clin Invest. 1974 May; 53(5): 1385 - 92.

30- Reshma,S.; Kavitha, A. K.; Soundarya, A. K.; Sushith, P. M. and Madan, G. R. Oxidative stress markers in chronic kidney disease patients with hearing loss.Int. J. Biom. Res.2017; 8(5): 259 -262.