

EFFECT OF PARACETAMOL ON SALIVA α -AMYLASE

Othman R. Hameed Alsamarrai

Department of Chemistry, Faculty of Education/Samarra, Tikrit university

(K . J . Pharm . Sci)

(Received Sept. 2011, Accepted Nov. 2011)

Abstract

The effect of paracetamol on the activity of saliva α -amylase was carried out. We prepared three different concentrations solutions of paracetamol (300, 500, 750) mg/100ml. The effect of different volumes (5, 10, 20, 30, 50) μ l of paracetamol for each concentration were study. The results showed that paracetamol has inhibition effect on the activity of α -amylase enzyme and highest inhibition at 10 μ l of inhibitor, while the degree of inhibition for three different concentrations were (52.30, 54.34, 20.70) % respectively. Also, kinetic of enzyme showed k_m value 1.428 mmol/L, and V_{max} value 30303.03 mol.liter⁻¹.min⁻¹, the result showed that inhibition is uncompetitive type.

تأثير مادة الباراسيتامول على أنزيم α -أميليز اللعابي

عثمان رشيد حميد السامرائي

قسم الكيمياء، كلية التربية/ سامراء، جامعة تكريت

E-mail:othmansamarrai@yahoo.com

الخلاصة

تناول البحث دراسة تأثير الباراسيتامول بشكله النقي على فعالية α -أميليز اللعابي، حيث تم تحضير ثلاثة محاليل مختلفة التركيز من مادة الباراسيتامول وهي (300، 500، 750) ملغم/100مل ودرس تأثيرها على نشاط الأنزيم بإضافة حجوم مختلفة من المحاليل الثلاثة وهي (5، 10، 20، 30، 50) مايكرو لتر وأظهرت النتائج ان للباراسيتامول تأثير تثبيطي على نشاط الأنزيم وان أعلى تثبيط عندما يكون حجم المثبط مماثل لحجم اللعاب وهو 10 مايكرو لتر وكانت درجة التثبيط للتركيز الثلاثة هي (52.30، 54.34، 20.70)% على التوالي، كذلك تم دراسة حركية الأنزيم وكانت قيمة K_m 1.428 ملي مول/ لتر أما قيمة V_{max} فكانت 30303.03 مول/ لتر دقيقة وقد أظهرت النتائج ان التثبيط هو من النوع اللاتنافسي.

المقدمة

البرد والأنفلونزا إلا أن الجرعات المفرطة منه يحتمل أن تسبب تسمم كبدي⁽²⁴⁾. وتكون فعالية الباراسيتامول العلاجية كمسكن للألام مكافئة لفعالية الأسبرين ولكنه اقل في علاج الالتهابات إضافة لكونه قليل السمية وسريع الامتصاص من قبل الدم وقد وجد أن استخدامه لفترة طويلة وبكميات كبيرة يؤدي إلى الإصابة بأمراض الكلى المزمنة⁽²⁵⁾.

المواد وطرائق العمل

تم استخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية موديل GENESYS 10S أمريكي المنشأ، ميزان حساس ألماني المنشأ، اما مادة الباراسيتامول فقد تم تجهيزها من الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية في سامراء.

تم جمع عينات اللعاب من أشخاص ذوي أوزان مختلفة ولاعمار تتراوح بين 20-25 سنة ومن الذكور فقط. حيث تم مضمضة الفم بالماء عدة مرات لإزالة أي بقايا طعام، ثم وضعت العينات في أنابيب اختبار بلاستيكي تستعمل لمرة واحدة فقط وبعد الحصول على 1-2 مل من اللعاب حفظت العينات في درجة حرارة أقل من 0 م° عند عدم استخدامها مباشرة.

لقياس نشاط أنزيم α -أميليز اللعابي حيث تم استخدام العدة الجاهزة المجهزة من شركة cromatest الاسبانية وحسب الطريقة المذكورة في العدة الجاهزة اذ تعتمد هذه الطريقة على تحليل أنزيم α -أميليز للمادة الأساس-2-chloro-p-nitrophenole- α -D-maltotriose (CNP-2-chloronitrophenol G3) لتحليل المركب وتكوين كل من 2-chloronitrophenyle- α -D- maltoside و glucose و maltotriose^(27,26)، تم استخدام تراكيز مختلفة من مادة الباراسيتامول وهي (300، 500، 750) ملغم/100مل لدراسة

ينتمي أنزيم α -أميليز - α (1-4)-[glucose-4-glucanohydrolase] (α -Ams) EC: 3.2.1.1، الى صنف أنزيمات التحلل المائي⁽¹⁾ وبالتحديد إلى صنف -endo- (glucosidases) فهو يعمل على تحليل النشأ والكلايكونجين من خلال مهاجمة أصرة $\alpha(1 \rightarrow 4)$ الكلايكونسيديية بطريقة عشوائية في أي مكان على امتداد سلسلة البولي كلوكان لإنتاج سلاسل قصيرة من السكريات قليلة الوحدات مثل الدكستران وسكريات اصغر^(3,2)، يفرز أنزيم α - أميليز من قبل البنكرياس والغدد اللعابية ويسمى الاميليز البنكرياسي (P-isoamylase) أما الاميليز اللعابي فيسمى (S-isoamylase)^(5,4).

يوجد أنزيم α -أميليز في الكثير من سوائل الجسم اذ يوجد في كل من مصل الدم والحليب والمبايض وقنوات فالوب وفي العضلات المخططة والرئتين والأنسجة الدهنية⁽⁶⁻⁸⁾، ويشكل أساسي في اللعاب والعصارة البنكرياسية⁽⁹⁾.

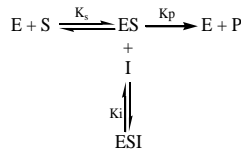
إن ارتفاع مستوى نشاط أنزيم α -أميليز يعد علامة تشخيصية مهمة للعديد من الامراض⁽¹⁰⁻¹²⁾ حيث يرتفع نشاط الأنزيم عند حدوث التهاب البنكرياس الحاد والمزمن⁽¹³⁻¹⁵⁾، وسرطان الرئة^(16,17)، وفي العدة البكتيرية⁽¹⁸⁾، وفي المرضى المصابين بالالتهاب الرئوي⁽¹⁹⁾، وعند الإصابة بمرض ارتفاع الاجسام الكيتونية⁽²⁰⁾ وفي مرضى السكري⁽¹⁸⁻²⁰⁾، و يتراوح المدى الطبيعي لنشاط الانزيم في الدم (80-180) وحدة دولية/100مل⁽²¹⁾.

الباراسيتامول أو الاس-يتامينوفين (Acetaminophen) هو عبارة عن مركب فينولي معوض (بارا- أمينو فينول أو N-اسيتايل بارا أمينو فينول) (N-Acetyl-p-amino phenol) صيغته الجزيئية هي $C_8H_9NO_2$ ^(22,23). يدخل الباراسيتامول كمكون أساسي في العديد من وصفات

تحلل النشويات وامتصاص الكلوكوز من قبل الأمعاء إلى الدم.

تم اجراء دراسة حركية لمعرفة تأثير تراكيز مختلفة من المادة الاساس على نشاط الانزيم وحساب ثابت ميكاليس- منتن (K_m) والسرعة القصوى (V_{max}) من خلال استخدام معادلة لينو فر- بيرك $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}$ وقد أظهرت النتائج أن قيمة الـ K_m كانت 1.428 ملي مول/ لتر اما قيمة V_{max} فكانت 30303.03 مول/ لتر دقيقة وكما في الشكل(4).

ولمعرفة نوع التثبيط لمادة الباراسيتامول تم استخدام تراكيز مختلفة من المثبط بوجود تراكيز مختلفة من المادة الأساس وباستخدام (10) مايكرو لتر كحجم أمثل لاضافة المثبط وقد أظهرت النتائج عند دراسة التثبيط انخفاض قيمة K_m و V_{max} ، إذ تم حساب قيمة K_m و V_{max} بالاعتماد على معادلة لينو فر- بيرك، حيث نلاحظ ظهور قيمة جديدة لكل من K_m و V_{max} كما مبين في الجدول(2)، مما يدل على ان التثبيط من النوع اللاتنافسي (Uncompetitive) وكما موضح في الأشكال (6،5،7)، في هذا النوع من التثبيط لا يرتبط المثبط مع الأنزيم الحر وإنما يرتبط بصورة عكسية مع المعقد E-S مكون المعقد ESI غير النشط الذي لا يؤدي إلى تكوين ناتج وكما موضح بالمعادلة أدناه(29).



في هذا النوع من التثبيط تقل قيمة V_{max} وقيمة K_m وينتج النقصان هذا بسبب التفاعل $ES + I \leftrightarrow ESI$ الذي يستعمل بعض ES مسبباً استمرارية تفاعل السربط $E + S \leftrightarrow ES$ إلى اليمين(29).

تأثير مادة الباراسيتامول على فعالية الأنزيم وللدراسة الحركية.

ولغرض الدراسات الحركية للأنزيم فقد تم تحضير تراكيز مختلفة للمادة الأساس (Substrate) حيث تم حساب التركيز الأمثل الذي تصل عنده سرعة التفاعل قيمتها العظمى، كذلك درس تثبيط مادة الباراسيتامول لأنزيم α -أميليز عن طريق تثبيط حجم مادة الباراسيتامول المضاف وهو (10 مايكرو لتر) للتركيز الثلاثة المحضرة (300، 500، 750) ملغم/100مل على التوالي وبعدها تم قياس نشاط أنزيم α -أميليز بوجود مادة الباراسيتامول المثبطة عند كل تركيز من المادة الأساس، بعدها تم حساب النسبة المئوية للتثبيط.

النتائج والمناقشة

تم دراسة تأثير حجوم مختلفة من مادة الباراسيتامول (5،10،20،30،50) مايكرو لتر من كل تركيز من تراكيز الباراسيتامول قيد الدراسة، وقد أظهرت النتائج أن لمادة الباراسيتامول تأثير تثبيطي على نشاط أنزيم α -أميليز اللعابي وكما موضح في الأشكال (1،2،3). كما وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط (درجة التثبيط) من خلال المعادلة التالية(28):

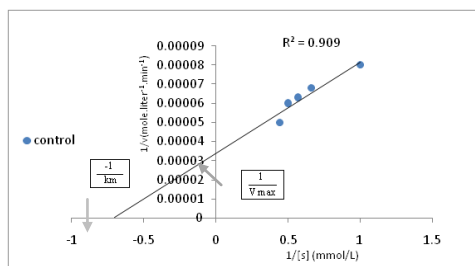
$$\% \text{ للتثبيط} = \frac{\text{فعالية الانزيم بدون المثبط} - \text{فعالية الانزيم مع المثبط}}{\text{فعالية الانزيم بدون المثبط}} \times 100$$

وقد أظهرت النتائج أن أعلى تثبيط عندما يكون حجم المثبط مماثل لحجم الأنزيم المستخدم في قياس النشاط والبالغ (10 مايكرو لتر) وكما مبين في الجدول (1).

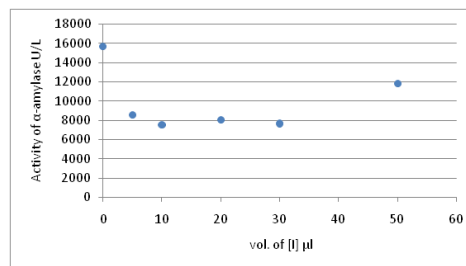
من هذا نستنتج انه يمكن استخدام الباراسيتامول ضمن أدوية إنقاص الوزن لإمكانيتها العالية لتثبيط نشاط أنزيم α -أميليز اللعابي وضمن أدوية علاج السكري للإمكانية العالية للباراسيتامول لتثبيط أنزيم α -أميليز اللعابي والبنكرياسي وبالتالي التقليل من

جدول (1) العلاقة بين حجم المثبط ودرجة التثبيط

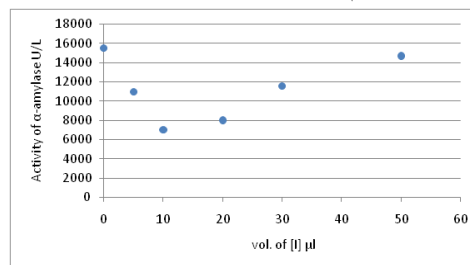
| تركيز المثبط | حجم المثبط | درجة التثبيط % |
|--------------|------------|----------------|
| 300mg/ml | $\mu 51$ | 45.35 |
| | $\mu 101$ | 52.30 |
| | $\mu 201$ | 48.79 |
| | $\mu 301$ | 50.88 |
| | $\mu 501$ | 24.64 |
| 500mg/ml | $\mu 51$ | 29.18 |
| | $\mu 101$ | 54.43 |
| | $\mu 201$ | 48.13 |
| | $\mu 301$ | 25.31 |
| | $\mu 501$ | 5.11 |
| 750mg/ml | $\mu 51$ | 8.80 |
| | $\mu 101$ | 20.70 |
| | $\mu 201$ | 2.92 |
| | $\mu 301$ | 0.33 |
| | $\mu 501$ | 12.3 |

شكل (4) يبين قيمة K_m و V_{max} في لعاب الأشخاص الأصحاء حسب معادلة لينو فر - بيركجدول (2) قيم K_m و V_{max} بوجود وعدم وجود مادة الباراسيتامول المثبطة بالاعتماد على معادلة لينو فر - بيرك

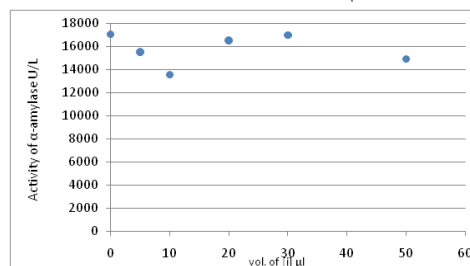
| Conc. of [I] | K_m (mmol/L) | V_{max} (mole.liter ⁻¹ .min ⁻¹) | K_{mi} (mmol/L) | V_{maxi} (mole.liter ⁻¹ .min ⁻¹) |
|--------------|----------------|--|-------------------|---|
| control | 1.428 | 30303.03 | --- | --- |
| 300 | 1.428 | 30303.03 | 0.843 | 17857.142 |
| 500 | 1.428 | 30303.03 | 0.840 | 16393 |
| 750 | 1.428 | 30303.03 | 0.842 | 16949.152 |



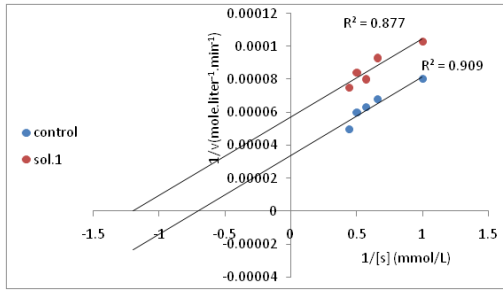
شكل (1) تأثير مادة الباراسيتامول المثبط (بتركيز 300 ملغم/100مل) على نشاط الأنزيم بإضافة حجوم مختلفة



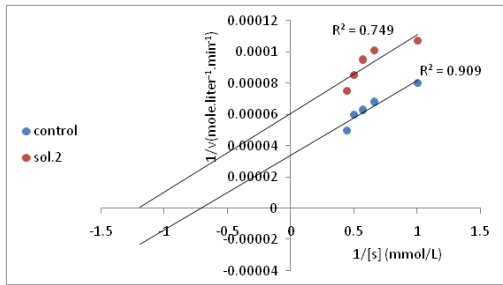
شكل (2) تأثير مادة الباراسيتامول المثبط (بتركيز 500 ملغم/100مل) على نشاط الأنزيم بإضافة حجوم مختلفة



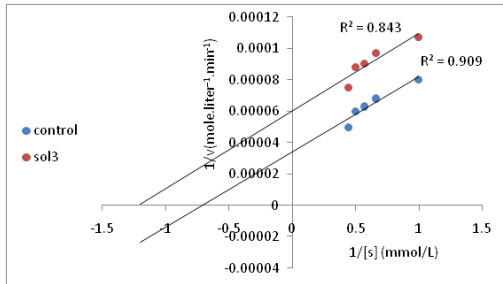
شكل (3) تأثير مادة الباراسيتامول المثبط (بتركيز 750 ملغم/100مل) على نشاط الأنزيم بإضافة حجوم مختلفة



شكل (5) قيمة ثابت ميكاليس- منتن عند إضافة المحلول الأول لمادة الباراسيتامول (بتركيز 300 ملغم/100مل) حسب معادلة لينو فر- بيرك



شكل (6) قيمة ثابت ميكاليس- منتن عند إضافة المحلول الثاني لمادة الباراسيتامول (بتركيز 500 ملغم/100مل) حسب معادلة لينو فر- بيرك



شكل (7) قيمة ثابت ميكاليس- منتن عند إضافة المحلول الثالث لمادة الباراسيتامول (بتركيز 750 ملغم/100مل) حسب معادلة لينو فر- بيرك

المصادر

1. WJ. Marshall, "**Clinical Chemistry**", 3rd ed. Great Britain. Mosby (1997).
2. J. Roby and D. French, "**J. Biol. Chem.**", 245, p.3917-3927(1987).
3. N.W. Tietz, "**Fundamentals of Clinical Chemistry**". 3rd ed. W.B. Saunders Company (1987).
4. G. Beckett, S. Walker, P. Rae and P. Ashby, "**Lecture notes Clinical Biochemistry**". 7th ed. Blak well publishing p.123-144 (2005).
5. الحديدي سيد، الكيمياء المرضية الجهازية. شعاع للنشر والعلوم، الطبعة الأولى سوريا. ص22 (1996).
6. J. Hsiu, E. Fischer and E. Stein, "**Biochemistry**", 3:p.61-66(1964).
7. J. Wakim, M. Robinson, J. Thoma; The active site of porcine pancreatic alpha-amylase, factors contributing to catalysis Carbohydrates. "**Res.**",10: p.487-503(1969).
8. P. Bossuyt , B. Van den Bogaert, S. Scharpe, and Y. Maercke; Relation of age to isoenzyme patten and total active of amylase in serum. "**Clin. Chem.**", 27: p.451-454(1981).
9. L. Kaplin, A. Pesce, "**Methods in Clinical Chemistry**". USA. C.U. Mosby company, (1987).
10. G. Geerling , K. Honnicke , C. Schroder, et al.; Quality of Salivary tears following autologous submandibular gland transplation for severedry. "**Graefes Arch. Exp. Ophthalmol**", 238:p.45-52(2000).
11. H. Bergmeyer, J. Beergmeyer and M. Grabl, "**Methods of enzymatic analysis**". vol. 1. Fundamentals. 3rd ed. Federal Republic Verlag chem.. Gmb H. Weinheim, (1983).
12. S. Cummings and C. Fraser; Total amylase and pancreatic isoamylase in serum and urine : considerations from datd an biological variation. "**Ann. Clin. Biochem.**",26: p.335-340(1989).
13. S.Kuczynska J. Wojcicka and E. Romejko; Biochemical studies of the amniotic fluid in arterial hypertension in relation to intrauterine growth retardation. "**Ginekol. Pol.**",60: p.266-270 (1989).
14. R.J. Henry and N. Chiamori; Study of the Saccharogenic Method for the Determination of Serum and Urine Amylase. "**Clin. Chem.**", 6: p.434-452(1960).
15. P. Derek, P. Lehane, G. Lum, et al.; Amylase active in serum and urine: comparison of results by the amyloclastic, dyed-starch, and nephelometric techniques. "**Clin. Chem.**", 23: p.1061-1065(1977).
16. M. Krajcirova, A. Cemok, A. Ksanicka, et al., Hyperamylasemia and pancreatic diseases in children. "**Cesk. Pediatr.**", 48: p.648-650(1993).
17. WG. Holzel; Intra-individual variation of analysis in serum from patients with chronic liver disesases. "**Clin. Chem.**", 33: p.1133-1136(1987).
18. I. Zakrezewska, A. Korcz, R. Gajda; Changes of alpha-amylase active in serum and urine of patients with various histological types of lung cancer. "**Pnru. Aler. Pol.**", 60: p. 42-47(1992).
19. A.A. Okolo, A. Okorodudu, R.H. Glew and J.A. Omene ; Decreased serum alpha-amylase levels in infected Nigerian newborn infants. "**Biol. Neonate.**", 53: p.138-143(1988).
20. R. Gaida, I. Zakrzewska, M. Pietrynczak; Active granulocytic alpha-amylase in patients with

21. pneumonia Pneumonl - "**Alergol-Pol.**", 62: p. 250-253(1994).
22. I. Ognev and S. Kolodii; Determination of alpha-amylase active in the blood serum. "**Lab. Delo.**", 3: p.139-143(1981).
23. D.T. Sawyer , W.R. Heinemann and J.M. Beebe; **Chemistry Experiments for instrument Method** , 3th ed, John Wiley and Sons, New York, p.330(1984).
24. D.A. Skoog, & D.M. West; "**Fundamentals of Analytical Chemistry**", 4th ed, Saunders college publishing Co, (1988).
25. Remington; "**The Sciences and Practice of Pharmacy**", 19th ed, vol.1, (1995).
26. S.T. Schultz, H.S. Klonoff-Cohen, D.L. Wingard, N.A. Akshoomoff, C.A. Macera, Ming J ; Acetaminophen(paracetamol) use, measles-mumps-rubella vaccination, and autistic disorder: The results of apparent survey. "**The international journal of research and practice**", vol.12: No.3, p.293-307(2008).
27. E.S. Winn-Deen, H. David, G.Y. Sigler, R. Chavez, "**Clin. Chem.**", 34:(2005).
28. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC.) "**Clin. Chem. Lab. Med.**", 36: 185 (1998).
29. Young DS. "**Effects of drugs on clinical Laboratory tests**", 4th ed. AACC. Press, (1995).
30. P.C. Champe and R.A. Harvey, "**Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry**", 2nd ed., 54-57(1994).