

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 31 عينة مصل دم لأشخاص اصحاء كمجموعة سيطرة، تتراوح اعمارهم ما بين 22-55 سنة جمعت في الفترة من 2019 / 11 / 22 إلى 2020 / 2 / 5.

تم قياس فعالية انزيم البرولايديز، وقياس تركيز كلا من المألون 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 المألون ثنائي الالدهايد، ومستوى اليوريا فقد ارتفعا معنويا في امصال دم المصابين 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 والمألون 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 والمألون ثنائي الالدهايد الا ان العلاقة كانت موجبة مع اليوريا وسالبة مع ال-MDA.

الكلمة المفتاحية: البرولايديز، الكلوتاثيون، المألون 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 31 apparently 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 عملها يؤدي إلى اضطراب في السوائل الجسمية فتحدث حالات مرضية خطيرة حيث تقوم الكليتان بطرح الكثير من الفضلات كاليوريا Urea وحمض 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 أو ما يعرف بالفشل الكلوي Renal failure إلى حالات مرضية قبل الكلوية مثل 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، Glucolatonase، Superoxide dismutase، Aspartate Aminotransferase، Alanine Aminotransferase و Gamma- GlutamylTransferase مع ارتفاع فعالية انزيمات اخرى مثل polimine 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 ليتتج 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 هاماً في إعادة تدوير البرولين لصناعة الكولاجين ونمو الخلية، وربما بمثابة وسيلة ربط بين التغذية وهدم البروتين^(6،7). ويبدو أن نشاط البرولايديز قد يكون خطوة تحديد في تنظيم التخليق الحيوي للكولاجين، اذ يتشارك في نمو الخلايا وأيض الكولاجين، كما ان له دورا مهما في تجديد الخلايا بعد العمليات الجراحية من حيث دوره الفعّل في علاج الجروح والحدوش والالتهابات⁽⁸⁾.

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

قياس المتغيرات الكيموحيوية. التي شملت قياس فعالية انزيم البرولايديز، وتركيزات كلا من المألون ثنائي الالدهايد Malondialdehyde-MDA، الكلوتاثيون Glutathione-GSH و اليوريا Urea في امصال دم العينات قيد الدراسة.

- طرائق العمل:

تقدير فعالية أنزيم البرولايديز في مصّل الدم: تعتمد الطريقة على تفاعل انزيم البرولايديز مع الببتيد الثنائي (كلايسين - برولين) باعتبارهي مادة اساس للتفاعل (18) ليعطي الحامض الاميني البرولين و الكلايسين بشكل حر نتيجة لفعل الانزيم، ثم تقاس امتصاصية البرولين المتحررة بعد تفاعله مع الننهايدرين 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 المنغنيز MnCl₂ 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 تحضير 94 ملي مول/ لتر من المادة الاساس في (0.05) مول/ لتر من محلول الترس المنظم والحاوي على 1 ملي مول/ لتر من MnCl₂ والاس الهيدروجيني (7.8 - 0.8).

■ محلول البرولين L-proline القياسي : تم تحضير محلول البرولين بتركيز 650 مايكرومول/ لتر مذابا في 0.45 مول/ لتر من محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور Trichloro 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

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 البروليديز يعتبر علامة للإجهاد التأكسدي Oxidative stress في العديد من الأمراض، مثل امراض القلب Heart disease، السكري، واعتلال الأعصاب السكري، وأمراض الكبد المزمنة وهشاشة العظام⁽¹⁶⁻¹¹⁾، 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 و 31 عينة دم لأشخاص اصحاء كمجموعة سيطرة تتراوح اعمارهم ما بين 22-55 للفترة من 2019 /11/22 الى 2020 / 2 / 5. وذلك بسحب (5 سم³) من الدم الوريدي بواسطة محقنة طبية تستعمل لمرة واحدة فقط ووضع الدم في انابيب Gel 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 Eppendorf tube وحفظ عند درجة حرارة 20- م° لحين

تم الاعتماد على الخطوات التالية لتقدير فعالية الانزيم:
1- تم تخفيف المصل بمعدل ست مرات وذلك
بإضافة 250 مايكرو ليتر من محلول التخفيف لكل
50 مايكرو لتر من مصل الدم ثم حضن المزيج لمدة
24 ساعة عند 37 م⁰، ثم إضافة 100 مايكرو لتر
لعينات السيطرة .

2- حضرت انابيب اختبار كما في الجدول الآتي :

الفسفوريك Ortho-phosphoric acid و 25
غم من الننهايدرين، يمزج المحلول جيدا عند
درجة حرارة (70) م⁰ في حمام مائي.

■ محلول أيقاف التفاعل : يتكون من 0.45
مول / لتر من TCA، تتم عملية الاذابة عند درجة
(70) م⁰ في حمام مائي قبل تحضير كاشف
Chinard's ،

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

500 مايكرو ليتر من المحلول الرائق من كلا
الانوبوتين، وتحضر اربع انابيب سيطرة Control،
الاختبار Test، قياسي Standard والكفيء
Blank كما في الجدول:

حضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة
37 مئوية، ويتم ايقاف التفاعل بإضافة 1 مل
من محلول الايقاف، تطرد الانابيب مركزيا لمدة
5 دقائق عند سرعة 2000 دورة/ دقيقة، ويسحب

ت	المحاليل	السيطرة	الاختبار	قياسي	كفيء
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

يتم حساب الفعالية بالاعتماد على المعادلة
الآتية⁽¹⁷⁾:

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

ليتطور اللون ويكتمل تكوين المعقد الملون يتم
حضن الانابيب اعلاه لمدة 10 دقائق عند 90 م⁰ في
حمام مائي، يتم قياس الامتصاصية عند 515 نانوميتر
بواسطة جهاز المطياف الضوئي بعد تصفير الجهاز
بالكفيء .

● محلول (B) : حضر بإذابة (0.6) غم من مادة ال 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 مصلى الدم:

تقدير تركيز المألون ثنائي الالديهيد في مصلى الدم

Determination of concentration serum MDA

أ- مبدأ الطريقة Procedure:

تم تقدير تركيز المألون ثنائي الالديهيد MDA في مصلى الدم الذي يمثل أحد النواتج الرئيسية للأكسدة الفوقية للدهون، وتعتمد الطريقة على التفاعل بين بيروكسيدات الدهون وبشكل رئيس MDA وبين حامض ثايوباربيوتريك - Thiobarbituric acid - TBA ويتم التفاعل في وسط حامضي ويكوّن ناتج الملون له اعلى امتصاصية عند 532 نانوميتر (19).

ب- المحاليل المستخدمة :

1- محلول الثايوباربيوتريك (TBA- solution) :

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

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

وُقِرأت الامتصاصية للمحلول الرائق عند الطول الموجي 532 نانوميتر.

حضنت الأنابيب عند 37 م لمدة 20 دقيقة ثم فصل الرائق باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة

د- الحسابات **Calculation**:

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

$$\text{Conc of MDA}(\mu\text{mol /L}) = \frac{(A)}{E_0 * L} * D$$

A = الامتصاصية .

D = معامل التخفيف .

L = مسار الضوء (سم) .

$$E = 1.56 * 10^5 \text{ (لتر. مول}^{-1} \text{ . سم}^{-1}\text{)} .$$

حجوم المحاليل المستخدمة

في أنبوب العينة

$$\text{معدل التخفيف (D) = } \frac{\text{حجم العينة}}{\text{حجم العينة}}$$

حجم العينة

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

أ-مبدأ الطريقة **Procedure** :

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

المحاليل المستخدمة:-

1 - محلول الترسيب المحتوي على حامض السلفوساليسيليك **Sulfosalicylic acid solution**:
حضر بإذابة 4 غم من حامض السلفوساليسيليك في 50 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

2 - محلول الفوسفات المنظم Phosphate buffer solution (pH = 8):
حضر محلول الفوسفات بمزج المحلولين A، B وضبط الأس الهيدروجيني عند (pH 8) بواسطة بضع قطرات من محلول (A).
● محلول (A) (0.6M): حضر بإذابة 8.16 غم من فوسفات البوتاسيوم أحادية القاعدة KH₂PO₄ 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 Na₂HPO₄ 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 الفوسفات المنظم (0.2) مولاري كمحلول خزين ثم حضرت التراكيز الآتية : (5، 10، 15، 20) .

طريقة العمل **Procedure** :-

تم تقدير كلوتاثايون المختزل في مصبل 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 لمدة 5 دقائق ثم اخذ من :		
.....	µl 150	Supernatant solved
4.5ml	4.5ml	Elman reagent

الكربون ثم يتم تقدير الامونيا الناتجة من تفاعل Hypochlorite و Salicylate لتكون 2,2 - Dicarboxy Indophenol الاخضر اللون، وتم قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 590 نانو ميتر.

ب. المحاليل المستعملة :

تم استعمال المحاليل التالية لتقدير تركيز اليوريا:

1 - محلول الفوسفات المنظم Phosphate buffer Solution: 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 ساليكات الصوديوم بتركيز 60 ملي مول / لتر، و EDTA بتركيز 2 مليمول / لتر، ونايتروبروسيد الصوديوم بتركيز 32 ملي مول / لتر، واليوريز بتركيز 3000 وحدة دولية / لتر.

3 - المحلول القياسي Standard Solution: ويتكون من اليوريا القياسية بتركيز 50 ملغم / 100 سم³.

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

الحسابات Calculation:-

تم حساب تركيز الكلوتاثاينون المختزل في مصلى دم النساء الحوامل قيد الدراسة اعتمادا على المعادلة التالية :

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

A = الامتصاصية.

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

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

5 - محلول العمل Working Solution:

يتكون من إذابة الكاشف الملون في محلول الفوسفات المنظم.

ج. طريقة العمل:

تم قياس تركيز اليوريا بالاعتماد على الخطوات المدرجة في الجدول التالي، كما وتم قياس كل تركيز من محاليل اليوريا القياسية بواقع خمسة مكررات.

4 - لمحلول القاعدي Alkaline Solution:

ويتكون من هاييوكلورات الصوديوم بتركيز 40 ملي مول/ لتر، وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 150 ملي مول/ لتر ويتم تخفيف 10 سم³ من المحلول القاعدي ب 90 سم³ من الماء المقطر في قينة حجمية سعة 100 سم³ وتحفظ لحين الاستعمال.

Reagents	Blank	Standard	Sample
Standard Solution	-	10 µl	-
Serum	-	-	10 µl
Phosphate buffer Solution	1 ml	1 ml	1 ml
تمزج الاناييب عند درجة حرارة 37 ^o م لمدة خمس دقائق			
Working Solution	1 ml	1 ml	1 ml
تمزج الاناييب جيدا وتحضن عند درجة حرارة 37 ^o م ثم يتم قياس الامتصاصية عند 590 نانومتر بواسطة المطياف الضوئي مقابل الكفى.			

فعالية انزيم البرولايديز والمعطيات الاخرى قيد الدراسة.

Results and discussion: النتائج والمناقشة:

تم قياس فعالية انزيم البرولايديز ومستويات كلا من الكلوتاثيون، المألون ثنائي الالدهايد واليوريا في امصال دم المصابين بالفشل الكلوي و مجموعة الاصحاء كمجموعة سيطرة، اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان متوسط \pm الانحراف المعياري لفعالية انزيم البرولايديز كانت 42.015 ± 12.46 وحدة دولية / لتر في أمصال دم المرضى في حين كانت 29.67 ± 158.175 وحدة دولية / لتر في امصال دم الاصحاء وكما في الجدول (1).

د- الحسابات:

تم حساب تركيز اليوريا في العينات قيد الدراسة باستعمال المعادلة التالية:-

يوريا الدم (ملغم / 100 سم³) = قراءة النموذج / قراءة القياسي * 50 *
* تركيز المحلول القياسي.

- التحليل الاحصائي:

حللت النتائج احصائيا باستخدام البرنامج الاحصائي SPSS لتحديد المعدل والانحراف المعياري وتم تحديد الفروقات بين المجموعتين باستخدام اختبار T- test عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$) ، كما تم حساب معامل الارتباط Correlation Coefficient لايجاد العلاقة بين

جدول (1):

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

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

بالاعتلالات كلوية متقدمة، وقد يعزى سبب الاختلاف الى ان المرضى في الدراسة الحالية قد خضعوا الى الديليزة الكلوية وهذا ممكن ان يؤثر على فعالية العديد من الانزيمات. كما اشار 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 التاكسدي والتي تترافق غالبا مع الاصابة بالفشل الكلوي نتيجة للضرر الحاصل لخلايا نسيج 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 (24 و25)، مسيبا انخفاض مستوي الكلوتاثيون نتيجة استهلاكه، وتحوله من الشكل المختزل الفعال GSH الى الشكل المؤكسد غير الفعال GSSG (26).

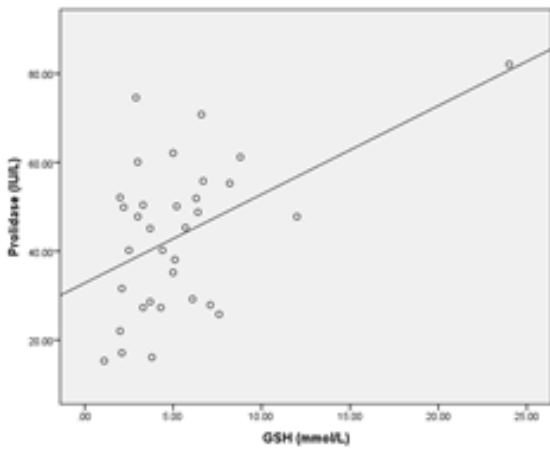
كما يظهر من الجدول اعلاه ان متوسط \pm الانحراف المعياري لتركيز الكلوتاثيون بلغ 1.8 \pm 4.5 ملي مول/ لتر في امصال دم المرضى في حين كان 1.25 \pm 7.368 ملي مول/ لتر لدى مجموعة السيطرة، اما الـ MDA فقد كان 1.717 \pm 4.17 ملي مول/ لتر لدى المرضى و 67.1.29 \pm ملي مول/ لتر في امصال دم الاصحاء كمجموعة سيطرة، واليوريا كانت 11.45 \pm 46.56 ملغم/ 100 سم³ لدى المرضى مقارنة بـ 4.125 \pm 18.74 ملغم/ 100 سم³ 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 بانزيم البرولايديز 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

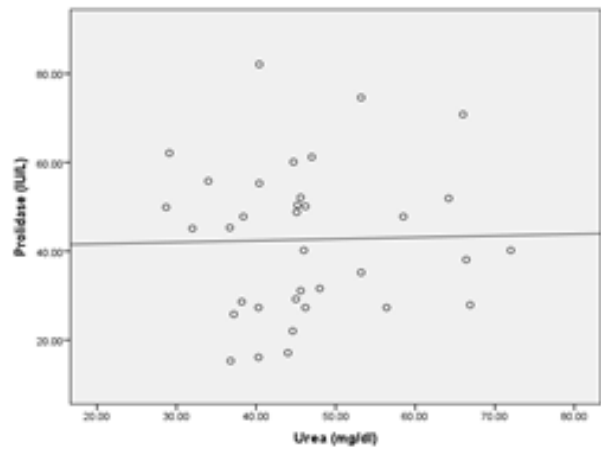
البرولايديز وتركيز كلا من الكلوتاثيون والمالون ثنائي الالدهايد واليوريا، وقد اظهرت النتائج وجود علاقة ارتباط معنوية موجبة بين فعالية انزيم البرولايديز وتركيز الكلوتاثيون وكانت قيمة معامل الارتباط $r=0.483$ وكما في الشكل (1)، في حين كانت علاقة الارتباط ضعيفة وغير معنوية بين فعالية الانزيم وتركيز اليوريا والمالون ثنائي الالدهايد الا ان العلاقة كانت موجبة مع اليوريا وسالبة مع الـ MDA وكما في الشكلين (2 و 3) على الترتب، لم تشر الاديبيات الى دراسة علاقة الارتباط بين فعالية انزيم البرولايديز والمعطيات قيد الدراسة لدى مرضى الفشل الكلوي.

ان الارتفاع المعنوي الحاصل في مستوى اليوريا لدى المرضى عند 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 احدي مؤشرات الاحتجاز البولي في مرض التهاب الكلى المزمن وان ارتفاع مستوى اليوريا 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).

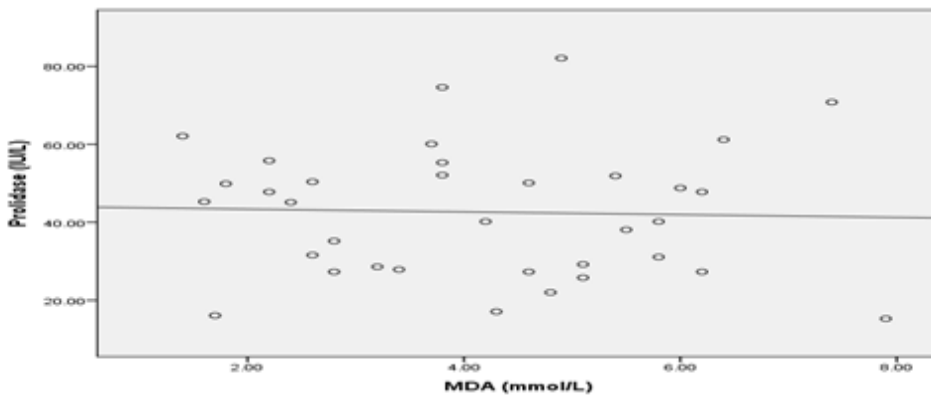
تم دراسة علاقة الارتباط بين فعالية انزيم



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



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



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

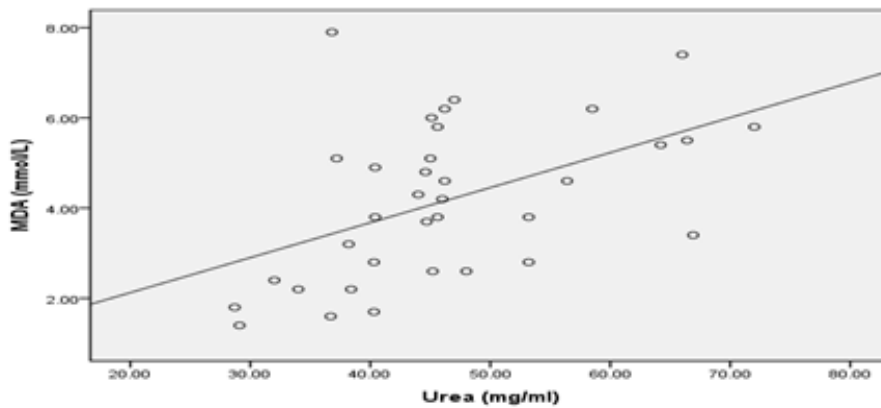
الشكل (4)، في حين كانت جميع العلاقات الاخرى غير معنوية، وهذه النتائج تتفق مع نتائج Reshma وجماعته (30) الذين اشاروا الى وجود علاقة ارتباط معنوية بين تراكيز اليوريا والمالون ثنائي الالدهايد لدى المرضى المصابين باعتلالات كلوية.

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

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
Prolidase	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.

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-Tareq 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 Journal of Biological Chemistry, vol. 117, pp. 189-202, 1937.
- 7- A. Surazynski, W. Miltyk, J. Palka, and J. M. Phang, "Prolidase dependent regulation 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 is regulated by interaction of extracellular matrix with cell surface integrin receptors," Journal of Cellular Biochemistry, vol. 67, pp. 166-175, 1997.
- 9- G. Zanaboni, K. M. Dyne, A. Rossi, V. Monafò, and G. Cetta, "Prolidase deficiency: biochemical study of erythrocyte and skin 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. Roczniki Akad Med Białymst. 1996; 41(2): 149 - 60.

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 بالكلوتاتايون 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' 21st 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.

- 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 and oxidant 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 and tissue injury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 66: 278 - 286.
- 20- Sedlak, J. and Lindsay, R. H. (1968) *Analytical biochemistry*; P: 192. (Cited by Al-Zamly 2001).
- 21- Evrenkaya TR, Atasoyu EM, Kara M., 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.. Prolidase isoenzymes 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 antioxidant in patients with heart disease. *Journal of Modern Science & Heritage* 2016; 4(3): 353 - 364.
- 12- E. Uzar, Y. Tamam, O. Evliyaoglu et al., "Serum prolidase activity and 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, and A. Lemonnier, "Plasma prolidase activity: a possible index of collagen catabolism in chronic liver disease," *Clinical Chemistry*, vol. 30, no. 2, pp. 211-215, 1984.
- 14- A. B. Erbagci, M. Araz, A. Erbağci, M. Tarakçioğlu, and E.S. Namiduru, "Serum prolidase activity as a marker of osteoporosis in 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 serum prolidase activity 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, and N. 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, Teppei Sakoh, et al. Blood urea nitrogen is independently associated with renal outcomes in Japanese patients with stage 3-5 chronic kidney disease: a prospective observational study BMC Nephrology volume 20, Article number: 115 (2019).
- 29- Walser M. 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.