مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية - سلسلة العلوم الأساسية المجلد (18) العدد (5) 1996
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research -Basic Science Series Vol. (18) No (5) 1996

تحديد الشروط المثلى لقياس فعالية أنزيم الكرياتين كيناز المعزول من النسيج العضلي للضفادع

الدكتور نبيل طعمة*

(قبل للنشر في 1995/6/1)

❑ الملخّص ❑

أجريت دراسة لطريقة قياس لونية من أجل تحديد الشروط المثالية لقياس فعالية الكرياتين كيناز. تسمح هذه الطريقة بتسجيل فعالية أنزيمية تصل لـ 0.005-0.051U لأنزيم الكرياتين كيناز في العينة.

* أستاذ مساعد في قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية - سلسلة العلوم الأساسية المجلد (18) العدد (5) 1996
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research –Basic Science Series Vol. (18) No (5) 1996

Determination the Optimized Conditions for Measuring the Activity of Creatine Kinase Isolated from Muscular Textile of Frogs

Dr. Nabeel TAAME*

(Accepted 1/6/1995)

❐ ABSTRACT ❐

An optimized calorimetric method of determination of creatine kinase activity is described. The method allows the registration of activity up to 0.005-0.05IU of the enzyme Creatine kinase.

* Associate Professor, Chemistry Department, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة:

لقد ظهرت في السنوات الأخيرة أبحاث مختلفة تدرس الكرياتين كيناز Creatine Kinase (CK) في مجالات مثل علم الأنزيمات، التقانة الحيوية، والطب السريري. وفي إحصائية تجارية أجريت من قبل لانغ وفورزبورغ[1] تبين أنه في العام 1980 فقط أجري في العالم نحو مئة مليون قياس لفعالية أنزيم كرياتين كيناز CK ونحو مليون تحليل للنظائر الأنزيمية MM. MB. BB. (iso enzyme) العائدة لهذا الأنزيم الشيء الذي يبين أهمية هذا الأنزيم من الناحية العملية.

يحفز الكرياتين كيناز (ATP: كرياتين N-- فوسفوترانس فراز، (CK)(EC: 2.7.3.2 تفاعل نقل عكوسي لمجموعة الفوسفات بين الكرياتين فوسفات وADP لتشكيل ATP والكرياتين، فيؤدي بذلك دوراً هاماً في تخزين الطاقة المتحولة بصورة عكوسية بهيئة كرياتين فوسفات كما ويؤمن CK في الشروط الفيزيولوجية مستوى ثابت من ATP في الخلية ويحافظ عليه:

$$\text{Creatine} + \text{ATP} \underset{}{\overset{CK}{\rightleftharpoons}} \text{Creatine phosphate} + \text{ADP}$$

يفضل العديد من الباحثين استعمال التفاعل الخلفي (تفاعل نزع الفوسفات من الكرياتين فوسفات) في الدراسات التي تخص الحركية ودراسة الاتزان، ويجري الكشف عن الكرياتين في ناتج التفاعل. بينما يفضل اوليفر[2] استعمال التفاعل الأمامي من أجل تحديد فاعلية الأنزيم في مصل الدم والسوائل الحيوية الأخرى. ولهذه الغاية يضيف للعملية التفاعلات التالية:

$$\text{ATP} + \text{glucose} \xrightarrow{E_1} \text{ADP} + \text{glucose} - 6 - \text{phsophate}$$

$$\text{glucose} - 6 - \text{phosphate} + \text{NAD}^+(\text{P}) \underset{}{\overset{E_2}{\rightleftharpoons}} 6 - \text{phosphogluconate} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$$

حيث تشير E_1 إلى انزيم هكسوكيناز وتشير E_2 إلى غلوكوز -6- فوسفات ديهيدروجيناز.

ثم اقترح روزالكي[3] تعديلاً على هذه الطريقة بإضافة AMP لتثبيط أنزيم الميوكيناز وأضاف كلوريد السيستئين لتنشيط CK. وفي هذه الحالة تحدد كمية NAD(P)H المتشكلة والتي تمتلك طيف امتصاص مميز في المجال فوق البنفسجي (يقع الامتصاص الأعظمي في طول الموجة القريب من 340nm وفي 334nm و365nm أيضاً). ثم أظهر أن استخدام تراكيز متكافئة من ديثيوثريتول Dithiothreitol (DTT) أو من الغلوتاتيون مع الأنزيم تكون كافية من أجل تنشيط CK عوضاً عن كلوريد السيستئين. فيما بعد توجه الانتباه إلى إيجاد كاشف سلفهيدريلي Sulfhydryl agent مناسب

لاستخدامه كمنشط. وظهرت عدة بحوث في هذا المجال استخدم فيها ديثيوتريتول[4] وN-استيل السيستئين[5] وثيوغليسرول[6] وغيرها من البحوث التي أبدت فعالية المركبات السلفهيدريلية في تنشيط الأنزيم CK.

وتأتي أهمية أنزيم CK من الناحية العملية في التحاليل السريرية. إذ لوحظ في بعض الحالات المرضية، ارتفاع فعالية CK في مصل الدم مما سمح باستخدام هذا الأنزيم كاختبار لتشخيص تلك الأمراض أمثال احتشاء العضلة القلبية الحاد، الهزال العضلي (ديوشن Duchenne) وغيرها.

وفي قياس فعالية CK تبقى طريقة Ennor الطيفية في تحديد فعالية CK هي الطريقة الأكثر شيوعاً[7،8،9،10] على الرغم من التعديلات الجارية على هذه الطريقة والتي تطرقت لها الأعمال[11،12].

وتعتمد هذه الطريقة على تحديد الكرياتين المتشكل في التفاعل الأنزيمي الخلفي لجملة الكرياتين كيناز وذلك بمفاعلته مع α-النفتول ودي أستيل. غير أن كافة الشروط المطبقة لتحديد فعالية CK ليست شروط قياسية (مثلى) لعمل الأنزيم مثل حجم الخليط التفاعلي، إشباع الوسط التفاعلي بالركائز، تكوين المحلول الموقي ودرجة حموضته pH الأمر الذي يؤدي إلى اختلاط في النتائج المقاسة وارتياب في دقتها.

في هذا البحث جرى تحديد الشروط المثالية لعمل أنزيم CK الذي جرى عزله من النسيج العضلي للضفادع واعتماد هذه الشروط لدى تعيين فعاليته بالطريقة الطيفية.

مبدأ الطريقة الطيفية:

يتشكل الكرياتين في التفاعل الخلفي لجملة أنزيم CK. ويعطي الكرياتين في الوسط القلوي وبوجود α-النفتول وثنائي الاسيتيل وبمساهمة أكسجين الهواء مركباً معقداً ذا لون زهري. وتتناسب شدة التلون مع كمية المعقد المتشكل وبالتالي مع فعالية أنزيم CK.

الكواشف المستخدمة:

1- محلول موقي من تريس-مالينك (Tris-Maleic acid) تركيزه 100mM ودرجة حموضته pH = 6.5.

2- محلول ADP بتركيز 8mM، ويحضر بإذابة الكمية اللازمة في محلول خلات المغنيزيوم تركيزه 48mM في 100mM من المحلول الموقي تريس-مالينك pH = 6.5 (تستعمل عدة قطرات من محلول 1M NaOH لضبط درجة حموضة الوسط pH = 6.5.

3- محلول كرياتين فوسفات 160mM، ويحضر في المحلول الموقي 100mM تريس-مالينك pH = 6.5.

4- المزيج القلوي وهو محلول مائي يحتوي على 16% من Na_2CO_3 و 6% من NaOH.

5- محلول α-النفتول تركيزه 1%، تذاب الكمية الضرورية منه في المزيج القلوي (وتحفظ بعيدة عن الضوء).

6- محلول ثنائي الاسيتيل تركيزه 0.025%.

7- محلول قياسي للكرياتين 10mg في 100ml من المحلول الموقي 100mM تريس-مالينك pH = 6.5 (من أجل إنشاء المنحني القياسي: كمية الكرياتين مقابل الامتصاص الطيفي في طول الموجة λ=535nm).

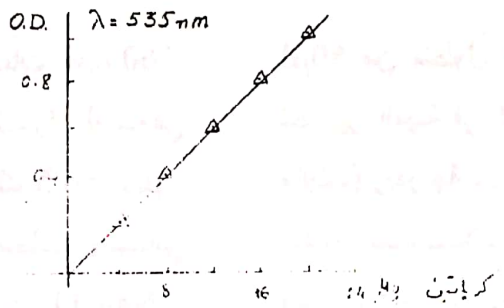
الطريقة المتبعة في تحديد الفعالية:

نضع في أنبوب اختبار صغير (بحجم 4ml) 50µl من محلول Mg.ADP ونضيف إليها 50µl من محلول الكرياتين فوسفات ثم 50µl من المحلول الموقي تريس-مالينك. يحضن هذا المزيج لمدة خمس دقائق بدرجة 30°C. نبدأ التفاعل الأنزيمي بإضافة 50µl من محلول الكرياتين كيناز* (جرى تحضير العينة في المحلول الموقي تريس-مالينك) وبدرجة حرارة 30°C ويستمر التفاعل لمدة ثلاث دقائق (وفي حال الضرورة يمكن زيادة زمن الحضن لمدة خمس دقائق). يوقف التفاعل بإضافة 200µl من المحلول القلوي لـ α-النفتول ويخلط المزيج.. وبعدها يضاف 200µl من محلول ثنائي الاستيل وتخلط المحتويات. وتحفظ العينات بعيدة عن الضوء من أجل إتمام تفاعل تشكل المعقد مع الكرياتين لمدة 30-45 دقيقة بعدها يكمل حجم العينة إلى 2ml بإضافة الماء المقطر قبل قياس الكثافة الضوئية في طول الموجة λ=535nm مقابل العينة الشاهدة التي جرى تحضيرها بالشروط السابقة نفسها دون إضافة المحلول الأنزيمي إليها.

تم حساب كمية الكرياتين المتحررة عن تفاعل CK بواسطة المنحني القياسي (الشكل 1).

---

* جرى عزل وتنقية أنزيم الكرياتين كيناز من النسج العضلية للضفدع وفق الطريقة المتبعة في المرجع[13].



الشكل (1) المنحني القياسي لتحديد محتوى الكرياتين يمثل محول السينات محتوى الكرياتين في العينة µg. يمثل محور العينات الكثافة الضوئية للمحلول في طول الموجة λ=535nm.

ومن العلاقة التالية جرى حساب الفعالية النوعية لـــCK:

$$\text{الفعالية النوعية} = \frac{m_c}{131.t.m_E}$$

حيث:

m_c– كتلة الكرياتين في العينة، وقد حددت بواسطة المنحني القياسي وواحداتها µg.

m_E– كتلة الأنزيم CK المستخدمة في العينة وواحداتها mg.

t– الزمن الذي استغرقه التفاعل الأنزيمي مقدراً بـــmin (وهو في حالتنا ثلاث دقائق).

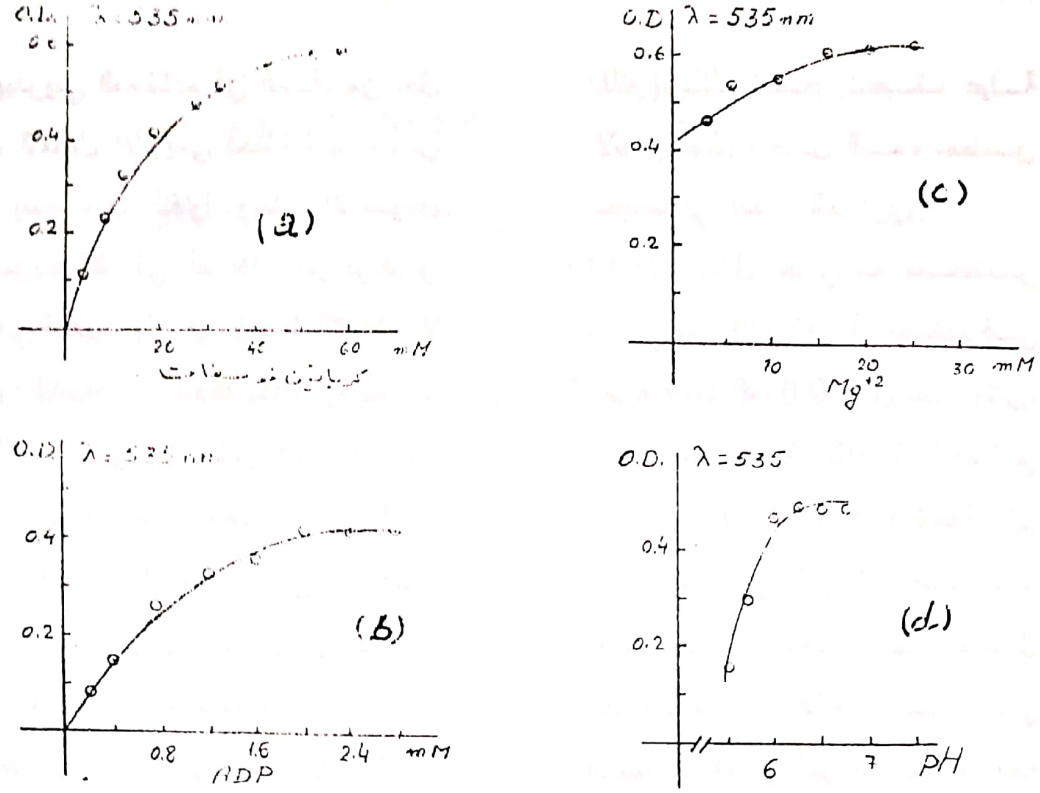
الرقم 131 هو الكتلة الجزيئية للكرياتين.

اعتمد في الحساب واحدة الفعالية وهي تلك الكمية من أنزيم CK التي تحفز التفاعل بين ADP والكرياتين فوسفات لتشكيل واحد ميكرومول من الكرياتين خلال دقيقة واحدة وبدرجة حرارة 30°C و6.5 = pH. يتوافق ذلك مع الواحدة الدولية للفعالية الأنزيمية IU. يُشار إلى الفعالية الأنزيمية النوعية بأنها الفعالية الأنزيمية IU الناتجة عن واحد ميلي غرام من البروتين أو من المستحضر الأنزيمي.

النتائج والمناقشة:

لقد تم الحصول على الشروط المثالية للتفاعل الجاري بصورة تجريبية باستعمال مستحضر أنزيمي للكرياتين كيناز المعزول من النسج العضلية للضفادع. إن 200µl من المزيج التفاعلي (مجموع الحجوم التي استعملت بما فيها عينة الأنزيم) تحتوي على تركيز من ADP يعادل 2mM، ومن خلات المغنيزيوم–12mM ومن الكرياتين فوسفات–40mM ومن المحلول الموقي تريس–ماليئك pH = 6.5–100mM.

ونورد في الشكل (2) المنحنيات التي تبين تابيعة سرعة التفاعل الأنزيمي لتراكيز الركائز وpH الوسط وتركيز شوارد المغنيزيوم.



الشكل (2) تابعية سرعة تفاعل أنزيم الكرياتين كيناز على تراكيز الركائز وpH الوسط.
يمثل محور السينات تركيز الركائز في الوسط (mM)، أو درجة pH الوسط. ويمثل محور العينات الكثافة الضوئية. يبين المنحني a- الكرياتين فوسفات، b- ADP، c- Mg^{+2}، d- pH الوسط.

تتطابق الشروط المبينة لتحديد فعالية أنزيم CK بالطريقة الطيفية مع الشروط القياسية المقترحة من قبل روزالكي المعتمدة على مبدأ قياس كمية ATP المتشكلة خلال التفاعل وذلك عن طريق استهلاكها من خلال جمل أنزيمية مترافقة – جملة الهكسوكيناز وجملة غلوكوز –6– فلوسفات ديهيدروجيناز[14].

تعود أهمية الطريقة الطيفية التي استخدمت في هذا العمل لتحديد فعالية CK إلى بساطتها العلمية ودقتها العالية إذ أنها لا تعتمد على وجود أنزيمات كيناز أو ديهيدروجيناز أخرى في تحقيقها. غير أنه يوجد بعض العقبات وخاصة في تلك الحالات التي يستخدم فيها منشطات للأنزيم CK من نوع الكواشف السلفهيدريلية في الوسط التفاعلي. إذ يؤدي إدخال مثل هذه الكواشف إلى عرقلة تشكل المعقد الملون بين الكرياتين وثنائي الاسيتيل في الوسط القاعدي، وبالتالي، يلاحظ ضعف في ظهور التلون الزهري للمزيج التفاعلي، على الرغم من الفعالية التي قد يبديها الأنزيم في الوسط التفاعلي. هذا ما يلاحظ لدى استعمال هذه الطريقة في المجال السريري. لذا ينصح باستعمال محلول بارا–كلور ميركوري بنزوآت الصوديوم بتركيز نهائي يعادل ضعف تركيز الكاشف

السلفهيدريلي المستخدم في العينة، من أجل إيقاف التفاعل الأنزيمي لحظة انتهائه ومن بعدها يضاف α-النفتول وثنائي الاسيتيل إلى المزيج التفاعلي. أما إذا كان تركيز الكاشف السفهيدريلي في الوسط التفاعلي لا يتجاوز 0.5mM، عندها يكفي أن نضيف هذه الكمية إلى الكرياتين في الوسط التفاعلي أثناء تحضير العينات ولدى إنشاء المنحني القياسي للكرياتين، وفي هذه الحالة ليس من الضروري استعمال بارا-كلور ميركوري بنزوآت الصوديوم.

من الضروري أن نعير انتباهاً كافياً أثناء العمل بهذه الطريقة المقترحة إلى:

1- نوعية المستحضرات الكيميائية المستخدمة وخاصة الكرياتين فوسفات، إذ أن وجود آثار من الكرياتين في هذا الكاشف يؤدي إلى انخفاض في دقة القياس الجاري، كما أن الكثافة الضوئية للعينة الشاهدة يجب أن لا تتجاوز 0.5 (واحدة ضوئية).

2- تفقد محاليل أنزيم CK المخففة كثيراً فعاليتها الأنزيمية بسرعة (خلال عدة دقائق). لذلك ننصح بتخفيف عينة الأنزيم مباشرة قبل البدء بحضن العينات في المثبت الحراري.

3- إذا كان العمل يجري مع مستحضر أنزيمي نقي فإنه يكفي أن نستخدم في العينة 0.05-0.1µg من البروتين، لأن تابعية سرعة التفاعل الجاري بالنسبة لتركيز أنزيم CK خطية حتى حدود معينة من التركيز، بعدها يبدأ الانحراف عن الخطية نتيجة لعوامل عديدة منها عدم كفاية الركائز في الوسط أو انغلاق المراكز الفعالة نتيجة تجمع الجزئيات. ولأجل الابتعاد عن ذلك نسعى دوماً أن تكون القياسات في المجال من المنحني حيث التابعية الخطية متحققة.

وعلى الرغم من هذه التحذيرات يمكن القول إن هذه التعديلات التي أدخلت على طريقة تحديد فعالية CK بالطريقة الطيفية تسمح لنا بقياس فعالية الأنزيم CK تقع في المجال 0.005-0.05IU في العينة الواحدة في تفاعل مدته ثلاث دقائق.

REFERENCES المراجع

[1]- Lang H., würzburg U.; (1982) Clin, Chem, Vol. 28, p. 1439-1447.
[2]- Oliver I.T.; (1955) Biochem. J., Vol. 61 P. 116-122.
[3]- Rosalki S.B.; (1967) J. Lab. Clin. Med., Vol. 69 p. 696-705.
[4]- Warren.; Clin. Chem. Vol. 18, (1974) p. 473-477.
[5]- Szasr G., Gruber W. & Bernt E.; (1976) Clin Chem. Vol. 22 p. 650-656.
[6]- Morin L.G.; (1977) Clin Chem., Vol. 23 p. 1569-1573.
[7]- Ennor A.H.; Stocken L.A.; (1953) Biochem. J., Vol. 55 p. 310-314.
[8]- Ennor A.H.; Rosenberg H.; (1954) Biochem. J., Vol. 57 p. 203-212.
[9]- Bais R., Edwards J.B.; (1982) C.R.C. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. Vol. 16p. 291-335.
[10]- Gale A.N., Murphy E.A.; (1979) J. Chron. Deseases (Gr. Brit.) Vol. 32 p. 639-651.
[11]- Haghes B.P; (1962) Clin. Chem. Acta., Vol. 7 p. 597-603.
[12]- Lyzlova S.N., Dandua A.K., Ashmarin I.P., et al. (1968) J., Evol. Biochimia & Biophi. Vol. 4 p. 3-9. In (Russ).
[13]- Taame N., Thésis. Ph.D. "1979 Saint Petersburg State University, Russia.
[14]- Desjarlais F., Marin L.G., Daigneaulat R.; (1980) Clin. Biochem. Vol. 13 p. 116-121.