قياس الفعالية الانزيميه لانزيم الـ DHFR للاشخاص المتطوعين من المصابين بالعقم والسرطان[+]

DETERMATINTION OF ENZYME ACTIVITY, DHFR FROM VEENTEREINES WHICH ARE INFERTILE AND CANCER INFECTED

شيماء جمال احمد[*]

المستخلص

لقد تم قياس فعالية انزيم الـ Dihydrofolate Reductase (DHFR) في مصل دم (100) من الاشخاص المتطوعين و المراجعين للمختبرات الأهلية وقد تم تقسيمهم الى ثلاث مجموعات ، اذ كانت المجموعة الاولى تتضمن (15) ذكرا و (15) انثى يتناولون ادوية لعلاج السرطان (الميثوتركسيت ومشتقاته) ، المجموعة الثانية تشمل (15) ذكرا و (15) انثى يعانون من العقم لأكثر من (2-13) سنة و المشخص مسبقا من قبل الاطباء المختصين اما المجموعة الأخيرة فكانت تشمل السيطرة وهم (20) ذكراً و (20) انثى سليمين(الاصحاء).

وقد وجد ان فعالية الانزيم تكون اعلى في المجموعة الأولى من المجموعة الثانية ومقارنة بالسيطرة. تكمن اهمية هذا الأنزيم في كونه نظيرا لكثير من العقاقير الطبية مثل المثبريم و الميثوتركسيت المستخدم في كبت الجهاز المناعي لعلاج امراض السرطان ،المناعة الذاتية و داء الصدف فضلا عن ارتباطه بعامل الخصوبة.

Abstract

Dihydrofolate Reductase (DHFR) was determined in (100) samples of blood serum from veentereines and visitors for private laboratories which they were in three groups: the first one included (15) males and (15) females who got anticancer drugs (methoterxiate and its derivatives) , the second group was (15) males and (15)females who are infertile for (2-13) years (previously detected by physicians) and the last group was control which was (20) males and (20) females healthy.

It was found that the higher enzyme activity was in first group then the second group compromised with the control group. The importance of this enzyme is analog to many drugs such as methprim and methoterxate which are used for suppressor of immune response for treatment of cancer , autoimmune diseases and protasis inherence of its correlation with fertility factor .

المقدمة

يعد انزيم الDHFR اساسيا في عملية أيض ذرة الكاربون الواحدة أو نقلها للمساهمة في عملية بناء القواعد النتروجينيـــة المؤدية الى بناء الحامض النووي الـــDNA اذ يتحفز هـــذا الانزيم بوجود الانزيـــم المساعدNADPH و الذي يعمـــل على إختزال ثنائي الفوليت(DHF2) الى رباعي الفوليت(DHF4) ضمـــن مسار اختزال حامض الفوليك [١].

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٢/٩/١٢ تاريخ قبول النشر ٢٠٠٣/٣/١٢

[*] كلية الطب / جامعة بغداد

يوجد الانزيم في كافة الانسجة بنسبة محددة ولكن يكثر وجوده في الاعضاء المتجددة (المبايض / الخصى) وتزداد نسبته في الاشخاص المصابين بالاورام[2] .

إن احد المواد المستخدمة في العلاج الكيمياويChemotherapeutic agent هي مادة (MTX) Methotrexate الميثوتركسيت لانواع مختلفة من السرطان في الانسان وان هذه المادة هي نظير مشابه لفيتامين حامض الفوليك ويقتل هذا الدواء خلايا الورم بارتباطه الوثيق مع انزيم الـــ DHFR [3] في الموقع نفسه الذي ترتبط به الركيزة وهي ثنائي الفوليت (DHF_2) وان ارتباط الميثوتركسيت يمنع تحويل (DHF_2) الى رباعي الفوليت (DHF_4) في داخل الخلية [4] وهذا الاخير تحتاجه الخلية في فعاليتها الايضية لغرض توالدها[5] وبالذات لتكوين الجزيئات الاساسية التي تدخل في عملية تكوين الحامض النووي (DNA) وهي البيورين والبايريميدين علاوة على اهميته في تكوين البروتينات ، لذا لا تستطيع الخلية أن تنمو ومن ثم تموت [6].

اكدت الدراسات الحديثة على انه يمكن استخدام قياس فعالية هذا الانزيم و اعتباره كتقنية او نظام متكامل للكشف عن المطفرات و المسرطنات الكيميائية [7] و الفيزيائية و خاصة تاثير الجرع الواطئة من الاشعاع [8] فضلا عن اعتباره موشرا وراثيا وارتباطه بعامل الخصوبة عند تعريض الحيوانات المختبرية الى جرع مختلفة من الاشعاع (معلومات تحت النشر).

لذلك كان الهدف من البحث هو اجراء دراسة لمقارنة فعالية الانزيم في الاشخاص الذين يتناولون المثيوتركسيت (او مشتقاته) و الاشخاص الذين يعانون من العقم.

<u>طرائق العمل</u>

1.تم الحصول على العينات من الاشخاص المتطوعين اذ تم سحب(5) مليلتر من الدم ومن ثم ترك للحصول على مصل الدم وملء استمارة استبيان خاصة اعدت لهذا الغرض.

2.تم قياس فعالية الانزيم حسب طريقة [9](Haurani وهي طريقة لونية اذ تقرا الامتصاصية الضوئية على الطول الموجي (340) نانوميترباستخدام جهاز المطياف ،وتعرف وحدة الفعالية:انها تغير بمقدار (0.01) في الامتصاصية الضوئية للمادة الNADPHفي درجة حرارة الغرفة،وتم تطبيق القانون التالي لاستخراج القراءة:

$$\text{الفعالية(وحدة/مليلتر)} = \frac{\text{التغير في الامتصاصية}^{o}\ A}{\text{التغير في الزمن}} \times \frac{\text{الحجم الكلى للتفاعل}}{\text{حجم الانز يم X الممر الضوئي X الامتصاصية المولارية}}$$

حيث ان الممر الضوئي=1

الامتصاصية المولارية=0.01

3.التحليل الاحصائي: تم تحليل نتائج البيانات الاحصائية وفقا للتصميم العشوائي التام في تجربة عاملة استخدام لذلك التحليل البرنامج الاحصائي الباحث (S A S) ولتحليل الفروقات المعنوية بين المتوسطات فقد أستخدم أختبار دانكن المتعدد الحدود [10].

النتائج والمناقشة

لقد تم قياس فعالية انزيم ال DHFR في المجموعات الثلاثة و كما هي موضحة في الجدول رقم (١) اذ لوحظ انه لا توجد فروقات معنوية على مستوى احتمالية $P \geq 0.05$ بين الذكور و الاناث في مجموعة السيطرة ولكنه لوحظ ان هنالك فروقات معنوية على مستوى احتمالية $P \geq 0.05$ بين الاشخاص الذين يتناولون ادوية لعلاج السرطان و الاشخاص الذين يعانون من العقم مقارنة بالاشخاص الاصحاء و كما يظهرها الشكل رقم (١) .

وان ما تم الحصول عليه في هذا البحث يتفق مع نتائج اخرى تم الحصول عليها اذ كانت الفعالية الانزيمية في بلازما السائل المنوي للاشخاص المصابين بالعقم اعلى من الفعالية الانزيمية في بلازما السائل المنوي للاشخاص الاصحاء .

لقد وجد من خلال دراسات الزرع النسيجي في الانسان أن تركيز انزيم الـــ DHFR للخطوط الخلوية النامية خارج جسم الكائن الحي اعلى بحوالي 100-200 مرة من تركيز الانزيم في الخلايا للانسان او الخلايا التي يحصل عليها من مواقع الورم نفسه [11].

وفي الاونة الاخيرة كشف عن وجود بعض انواع السرطان لها القدرة على مقاومة هذا الدواء ، بعد أن كانت حساسة له في السابق مما دعا الباحثين الى دراسة الميكانيكية المحتملة لنشوء المقاومة لهذا الدواء في الخلايا الحيوانية المزروعة خارج وداخل الجسم الحي وحالياً توجد ثلاث ميكانيكيات على الاقل لها نفس اكتساب الخلايا المقاومة لمادة (MTX) ومن هذه الميكانيكيات هي :

الميكانيكية الاولى : هي حصول تغير في انزيم الـــ DHFR وهذا ناتج عن حدوث طفرة في الحامض النووي (DNA) لمورث الخلية مما يؤدي الى فقدان كفاءة (MTX) للارتباط بالانزيم المعني وفي هذه الحالة يستمر الانزيم بعمله بشكل طبيعي [12].

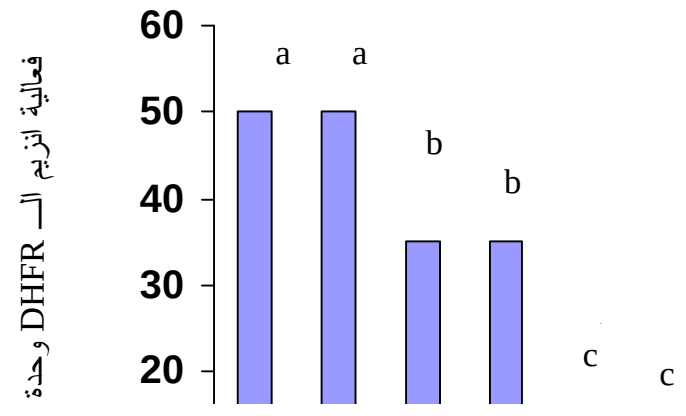
الميكانيكية الثانية : هي احتمال حصول تغيير (ربما نتيجة الطفرة الوراثية) في الغلاف البروتيني السطحي للخلية وهو مكان انتقال (MTX) من المحيط الى داخل الخلية مما يؤدي الى عدم نفاذية مرور الدواء الى الخلية ومن ثم استمرارية عمل انزيم الـــ DHFR بشكله الطبيعي [13].

الميكانيكية الثالثة : هي حصول زيادة كبيرة وهائلة في كمية انزيم الـــ DHFR المنتج في الخلية بحيث تعوض عن كمية الانزيم الذي يثبط عمله عند اضافة تراكيز من مادة (MTX) الى وسط النمو ، وهذه الكمية ستكون حرة او مستقلة ولها الاستعداد للارتباط مع المادة الركيزة ومن ثم تقوم بتحويل الداي هايدروفوليت (DHF_2) الى التتراهايدروفوليت (DHF_4)[14].

قد تكون احدى هذه الميكانيكيات هي السبب في زيادة فعالية انزيم ال DHFR في الاشخاص الذين يتناولون الميثوتركسيت مقارنة بالاشخاص المصابين بالعقم ،وهنالك بحوث مستقبلية سوف يتم اجراءها لبيان أي نوع من هذه المكانيكيات التي سببت الزيادة.

جدول -1- فعالية انزيم ال DHFR في الاشخاص المتطوعين.

	فعالية انزيم الDHFR في المجموعة الاولى (الذين يتناولون آدوية لعلاج السرطان) وحدة/مليلتر		فعالية انزيم الDHFR في المجموعة الثانية (الذين يعانون من العقم) وحدة/مليلتر		فعالية انزيم الDHFR في المجموعة الثالثة السيطرة (الاصحاء) وحدة/مليلتر	
	الذكور	الاناث خ٣٦٣ث ٤	الذكور	الاناث	الذكور	الاناث
1	37.8	38.6	21.5	26.1	5.3	13.25
2	40.1	39.7	26.6	22.2	5.2	10.6
3	41.5	40.3	29.6	23.8	8.82	5.3
4	45	42.2	35.1	30.2	3.85	14.2
5	43.2	50	22.3	33.3	7.5	10.8
6	42.1	49	25	28.2	5.5	11.9
7	40	41.4	27.1	25.5	8.85	13.5
8	43.4	42.8	33.3	30.1	7.06	12.87
9	50	47.1	26.5	35	11.2	10.6
10	49	48.7	20.5	33.4	13.4	11.4
11	38.2	42.8	34.1	32.3	9.97	9.98
12	43	41.7	30.2	27.3	7.75	5.7
13	48	45.1	28.4	26.4	3.9	12.25
14	45	36.4	32.2	29.3	6.64	10.8
15	48.2	39	23.8	34.2	8.82	7.08
16					7.03	8.82
17					10.6	4.2
18					13.25	3.8
19					13.5	4.7
20					12.72	5.7
المجموع	654.5	644.8	396.15	437.3	113.7	160.2
المتوسط للفعالية وحدة/مل	43.63	42.99	26.41	29.15	7.58	10.68
متوسط الفعالية للذكور والاناث	43.31		27.78		9.13	



شكل -١- الفعالية الانزيمية لأنزيم الـــــ DHFR في الاشخاص المتطوعين

- الاحرف الانكليزية المتشابهة تعني عدم وجود فروقات معنوية .
- مستوى الاحتمالية $P \geq 0.05$.

المصادر

1- Gready, J.E "Dihydrofolate reductase :the current story ." *Nature* .282 : 674-675. .(1979).

2-Kamen, B "Folate and antifolate pharma cology." *Seminars in Oncology* 24(5): 18. .(1997).

3-Haber, D.A.; Breverly, S.M.; Kiely, M.L. & Schimke, R.T. " Properties of an altered DHFR encoded by amplified genes in Cultured mouse Fibroblasts." *J.Biol. Chem.* 256: 9501-9510. (1981).

4- Blakley, R.L "Crystalline dehyropleroyl glutamine acid." *Nature.* 188: 231-232. (1969).

5-Delcamp, T.J.; Susten,S.S.; Blankenship, D.T.; freishmein, J.H"Purification and characterization of DHFR from MTX-resistant human lymphoblastoid cells." *Biochemistry.* 22: 639-645. .(1983).

6- Werkhelser, W.I " Specific binding of 4-amino analogues by folic acid reducates." *J.Biol Chem.* 236: 888-893. .(1961).

٧- الشامي ،جنان حسين مرتضى ، . الكشف عن المواد المطفرة و المسرطنة في مياه الشرب باستخدام التحلـــيلات الوراثية الخلوية و الانزيمية . رسالة ماجستير.كلية التربية للبنات.جامعة بغداد ٢٠٠٠

٨- Shubber,E.K.;Jafar,Z.M.T.;Nada,S.M.&Karam, A.M. "Induction of chromosmal anomalies and gene amplification in human cells by anti-cancer drugs."Nucleus.41:120-127. (1998).

9- Haurani, F.I.; Kardinal, C.G. & Biermann, W.A. " Thymidylate Synthetase and DHFR stimulated human Lymphocyte. " J. cell. Physiol. 95: 49-56. (1978).

١٠- الراوي ، خاشع محمود وعبدالعزيز ، محمد خلف الله . . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . مطبعة جامعـــة الموصل . الموصل.1980 .

11- Funange, V.L.; Myoda, T.T. & Mouse, P.A. " Assignment of the human dihydrofolate reducates gene to the q11-q22 region of chromosome 5." Biology. 4: 2101.(1984).

12- Jackson, R.C. & Niethammer, D." Acquaired MTX-resistance in Lymphoblasts resuhlting from altered kinetic properties of DHFR ." Europ. J. Can. 13: 567-575.(1977).
13- Sitronak, F.M.; Kurita, S. & hutchison, D.J. " On the nature of transport alteration determining resistance to MTX in the L 1210 Leukemia." Can, Res. 28: 75-80.(1968).
14- Bostock, C.J., Clark, E.M.; Harding, N.G.L.; Mounts, P.M.; Tyler-Smith, C.; Van-Heyninger, V. & Walker, P.M.B. "The development of resistance to MTX in a mouse melanoma cell line. 1-characterization of the DHFR and Chromosomes in sensitive and resistant cells." Chromosoma. 74: 153-177. (1979).