

دراسة حركية لتقييم تاثير الدوائين الدايزيبام والڤنتنايل على فعالية انزيم الكرياتين كاينيز.

أ.م.د. بري حبيب # ؛ ايمان هاشم ##؛ جنان حسين ##

# دكتوراه كيمياء حيائية؛ قسم الكيمياء، كلية العلوم للبنات ، جامعة بغداد

## ماجستير كيمياء حيائية؛ قسم الكيمياء، كلية العلوم للبنات ، جامعة بغداد

الخلاصه :

تمت دراسة تأثير العقاقير (الدايتريبيام والڤنتنايل) على فعالية أنزيم الكرياتين كاينيز (CK) أذ تم استخدام تراكيز مختلفة لكل من عقار الدايزيبام والڤنتنايل لمعرفة مدى تأثيرا على فعالية الانزيم , وقد بينت النتائج ان لعقار الدايتريبيام تأثير تشيطي عالي على فعالية انزيم الكرياتين كاينيز عند التركيز (  $10 \times 130^{-5}$  مولاري) بينما أظهر العقار الڤنتنايل تأثير تشيطي عند التركيز  $10 \times 46^{-8}$  (مولاري ) وقد تمت دراسة مركبات حالة الاستقرار حركيات أنزيم الكرياتين كاينيز عند تركيز ثابت لعقار الدايزيبام ( $10 \times 130^{-5}$  مولاري) وعقار الڤنتنايل ( $10 \times 46^{-8}$  مولاري) . كشفت النتائج حصول انخفاض بقيمتي السرعة القصوى Vmax ( 114.3 IU/L ) وثابت ميكالس منتن Km ( 0.03±2.05 ملي مولاري) مقارنة بقيمتي الاولية (بدون اضافة دواء) ( 0.3±2.13 ملي مولاري) Km و ( 133.3 IU/L ) Vmax بينما تزايدت قيمة ثابت ميكالس منتن لعقار الڤنتنايل ( 0.3±2.45 ملي مولاري ) وانخفضت قيمة السرعة القصوى . تبينت من هذه الدراسة ان لعقار الدايتريبيام فعل المثبط اللاتنافسي اللاعكسي بينما لعقار الڤنتنايل فعل المثبط المختلط لادينوسيت

ADP

الفوسفات

ثنائي

## المقدمة :

حركات الانزيمات هي دراسة للتفاعلات الكيميائية التي يتم تحفيزها من قبل الانزيمات، حيث يتم قياس سرعة التفاعل ودراسة تأثير تغيير ظروف مختلفة على سرعة التفاعل .عند دراسة حركات الانزيم يمكن التنبؤ بميكانيكية التفاعل الانزيمي، دوره في التفاعلات الايضية، كيف يمكن فعاليته التحفيزية، وكيف يمكن للدواء او السموم ان تثبط فعالية الانزيم[1]

أنزيم الكرياتين كايبيز ( EC 2.7.3.2 ) يحفز التحول العكسي للفوسفوكرياتين (PCr) وتحول الاديوسين ثنائي الفوسفات ADP الى الاديوسين ثلاثي الفوسفات ATP والكرياتين (Cr) . [1]

CpK

PC r+ MgADP +H

<sup>+</sup>Cr + MgATP

يقع الانزيم ضمن مجموعة الانزيمات المتناظرةالخلوية المتخصصة التضمنة dimeric ( MM.,MB.,BB.CK ) cytosolic CpK ويشكل رئيسي , الكرياتين كايبيز الثاني Octameric mitochondria CK (sMt CK), uMtCK الموجود في الماييتوكوندريا والتي تتفكك الى ثنائيات. أن تلك الانزيمات المتناظرة لل CK تتمكن بسهولة من تكوين الكرياتين Cr والفوسفوكرياتين PCr في نظام نقل الطاقة بمحول منظم والاحتفاظ بطاقة خلوية واحده , دورة . CK /PCr [2]

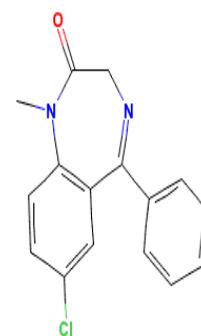
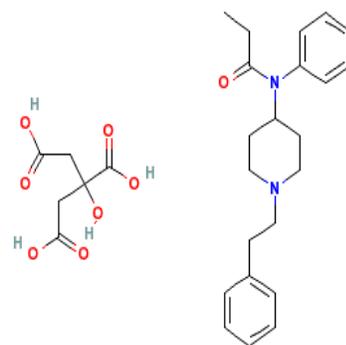
أن نظام CK يلعب دور المفتاح في أيض الطاقة للخلايا والانسجة مع متطلبات الطاقة العالية أو المتغيرة كما في العضلة أو الدماغ [2] .

في الحقيقة ، كل الحركات تعتبر ايون المغنيسيوم منشط لأشكال ATP , ADP ومعقد  $^{2+}ATP\_Mg$  . ان التركيز العالي لأيون المغنيسيوم  $^{2+}Mg$  يجعله مثبط و الكثير من الايونات الفلزية, مثل  $^{2+}Ca$  ,  $^{+}Mn$  ,  $^{2+}Cr$  ,  $^{2+}Zn$  تثبط فعالية الانزيم , مثل عمل خلايا اليود والكواشف الاخرى المرتبطة ب الثايول بينما مركب الثايول منشط لـ CK [3] [2] .في تأثير الدواء ان بعض الادوية يمكنها ان تزيد فعالية الكرياتين كايينز مثل الامبسلين , وبعض المخدرات , مضادات تخثر الدم , الاسبرين والكوكائين [4] [5] .

الفنتايل (شكل (1)) هو [\(N-phenyl-N-\(1-phenethyl-4-piperidiny\)propanamide](#) الصيغة الجزيئية له هي :  $C_{28}H_{36}N_2O_8$  وذو وزن جزيئي : 528.59404 [g/mol] وهو مركب محضر مضاد للـ  $\mu$ -opioid ويحضر بشكل سترات الفنتايل، وهو عادة لحالات الالم المزمنة وخصوصا في حالات مرض السرطان ، وكذلك يستخدم عن اجراء العمليات الجراحية في حالة التخدير الكامل. يمتلك الفنتايل قوة اكثر من المورفين بمئة مرة ، واقوى من البثدين بمقدار 50 مرة.. [6].

شكل (1) 1- دواء الفنتايل

2- دواء الدايزيبام



(2)

(1)

الدايزيبام (شكل (1)) ويسمى بالفاليوم ايضا وهو

7Chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2(1H)-one

يمتلك الصيغة الكيميائية  $C_{16}H_{13}ClN_2O$  ووزن جزيئي . [g/mol] 284.74022 يستخدم هذا

الدواء عادة لعلاج القلق، الارق، والتشنجات العضلية اللارادية ، الانسحاب عند مدمني الكحول

وغيرها من الحالات المرضية. ويمكن للفاليوم ان يستخدم في بعض العمليات مثل النواضير لتقليل

الاضراب والتوتر وفي بعض العمليات الجراحية لحث فقدان الذاكرة .الفاليوم يمتلك صفة مقلل لقلق،

خافض للضغط ، منوم، يعمل على استرخاء العضلات ، ويعمل على فقدان الذاكرة المؤقت.[7]

أن الهدف من هذه الدراسة هو معرفة تأثير عقار الفنتايل والديزيام على فعالية أنزيم ال  
CpK في امصال نساء اصحاء قبل سن اليأس وتقدير المعامل الحركي لل CK بوجود وغياب تلك  
العقاقير .

### المواد وطرائق العمل :

● عدة قياس فعالية أنزيم الكرياتين كائيز - مجهز من قبل شركة Spinreact (أسبانيا)

● العقاقير - مجهزة من مناشيء مختلفة.

أ.سترات الفنتايل (تركيز 0.0785 ملغم / 10 مل ماء (يكافىء 0.05 ملغم قاعدة )كلوريد  
الصوديوم من

.Janssen Pharmaceutica N.V.Janssen-N.V.Janssen Gila G (Belgium).

ب. الدايزييام (بتركيز 10 ملغم /2 مل ماء) . صيدلية ابن حيان IBN من شركة

R.Faysal. CO.HOMS-Syria

### ● العينات :

شملت العينات ثلاثين من نساء قبل سن اليأس تتراوح اعمارهن من (20 - 40) سنة. النساء غير  
مصابات بأي مرض ولايتناولن اية عقاقير .

### نماذج الدم

تم جمع الدم (5 مل) من كل عينة بطريقة الوخز الوريدي في انبوبة اختبار ثم وضعت بجهاز النبذ المركزي وبسرعة 3000 دورة / دقيقة (1500 xg) لمدة خمس دقائق بعد السماح لتخثر الدم عند درجة حرارة الغرفة .

تم جمع المصل وحفظ بالمجمدة عند درجة -20 °م حتى اجراء الاختبار علما ان جمع النماذج المستخدمة في هذه الدراسة كانت طازجة تسحب في يوم اجراء التجربة . (ومن الجدير بالذكر ان استقرارية الانزيم في المصل تستمر لمدة سبعة ايام عند درجة 2-8 °م بعيدا عن الضوء . وتصبح فعالية انزيم الكرياتين كايينز 10% اقل بعد اليوم الاول عند درجة 2-5 °م او بعد ساعة بدرجة 15-25 °م [4] .

#### طرائق العمل :

#### ●تأثير العقاقير على فعالية الـ CK :

تم انجاز التجارب عند تركيز ثابت من فوسفات الكرياتين و ADP (3 ملي مولاري) و (2 ملي مولاري) على التوالي لمدى من تراكيز العقاقير:

●الدايزيبام ( $10^{-5} \times 210, 170, 130, 87, 43$  مولاري) .

● الفنتايل ( $11 \times 10^{-8}, 58, 46, 34, 23, 11$  مولاري) .

وقد بلغ الحجم النهائي للتفاعل 1.04 مل عند pH=7 لكل عقار وقيست الامتصاصية الاولى في الدقيقة الاولى وبعد مرور ثلاث دقائق عند الطول الموجي 340 نانوميتر وبدرجة 37 °م .

## الحسابات:

تم احتساب الفرق بالامتصاصية ومعدل حاصل الفرق لكل دقيقة

$$\text{IU/L} = 8095 \times \Delta \text{ A/min}$$

• تقدير قيمة الـ  $K_m$  و  $V_{max}$  لـ CK :

• بغياب العقاقير:

تم تقدير قيم  $K_m$  و  $V_{max}$  لـ CK لفوسفوكرياتين في مصول النساء الاصحاء قبل سن اليأس بوجود تراكيز متزايدة من فوسفات الكرياتين (2.0, 2.05, 2.1, 2.2, 1.0, 1.5, 2.25, 2.0 ملي مولاري) وكانت الفعالية العظمى عند التراكيز 2 مولاري وعند pH=7 وقد قيست سرعة التفاعل الاولية من خلال الزيادة في الامتصاصية عند الطول الموجي 340 نانوميتر.

• بوجود تركيز ثابت لكلا العقارين (الدايزيبام  $10^{-5} \times 130$  مولاري والفتنتايل  $46 \times 10^{-8}$  مولاري).

قيست الـ  $K_m$  و  $V_{max}$  لـ CK لفوسفوكرياتين في مصول النساء الاصحاء قبل سن اليأس بوجود تراكيز متزايدة من الفوسفو كرياتين (2.05, 2.1, 2.15, 2.2, 2.25, 2.0, 1.5, 1.0, 2.0 مولاري) وتم تقدير الفعالية العظمى في هذا الاختبار عند التركيز الامثل للمادة الاساس (2 ملي مولاري) وبتركيز ثابت من الدايزيبام  $10^{-5} \times 130$  مولاري والفتنتايل  $1046 \times 10^{-8}$  مولاري. اعطت تراكيز العقار فعالية عالية للـ  $C_pK$ . قيست السرعة الاولية للتفاعل من خلال الزيادة في الامتصاصية عند الطول الموجي 340 نانوميتر وبمصاحبة  $NADP^+$  المختزل.

النتائج والمناقشة :

قيست الفعالية لانزيم الكرياتين كايينز من خلال حفيزه للتفاعل ( التحول العكسي لمجموعة الفاسفات من الفوسفوكرياتين الى ADP ) ليحفز التفاعل الاخير بانزيم الهكسوكاينيز ( HK ) لينتج كلوكوز -6-فوسفيت ديهيدروجينيز (G6PD).

### شكل(2) : تأثير عقار الدايزيبام على فعالية انزيم CpK

يظهر الشكل (2) التناقص بفعالية الـ CK عند التركيز  $43 \times 10^{-5}$  مولاري لعقار الدايزيبام بمقدار 28.33 IU/L والذي يقارب 5.3 مرات بفرق معنوي ( $P > 0.05$ ) وبنقصان غير معنوي ، 141.66 IU/L عند التركيز  $130 \times 10^{-5}$  مولاري لعقار الدايزيبام بمقدار 1.5 مرة مقارنة بالسيطرة السالبة 149 IU/L. هذه النتيجة لا تتفق مع الدراسة التي قام بها Prashant [8] التي سجلت زيادة بمستوى فعالية الـ CK وكانت 174.9-835 IU/L ولم تتفق مع دراسة Holtman [9] التي اظهرت الفعالية للـ CK والتي بلغت 9743 IU/L بعد اعطاء تركيز عالي 15 ملغم /يوم من عقار الدايزيبام . لم تحصل على مصادر تسجل حالات نقصان في فعالية الـ CK بوجود تركيز منخفض للدايزيبام.

### شكل (3) تأثير عقار الفنتانيل على فعالية انزيم CpK

اظهرت النتائج في الشكل -3- تأثير عقار الفنتانيل على فعالية CK في الامصال اذ حصل تثبيط في الفعالية لجميع التراكيز عند اضافة الفنتانيل الى مزيج التفاعل . وقد حصل

تثبيط عالي لفعالية الـ CK (36.42 IU/L) أي بمقدار 4.09 مرات وباحتمالية ( $P > 0.05$ ) عند تركيز  $23 \times 10^{-5}$  مولاري من عقار الفنتنايل وحصل تثبيط قليل بالفعالية (97.14 IU/L) بمقدار 1.53 مره باحتمالية ( $P > 0.05$ ) عند تركيز  $46 \times 10^{-8}$  مولاري لعقار الفنتنايل مقارنة بفعالية الانزيم لغياب الدواء (149 IU/L) ان هذه النتيجة , لاتتفق مع الدراسة التي قام بها Suzanne [10] الذي سجل فعالية طبيعية لانزيم الـ CK عند اعطاء 100 ميكروغرام من عقار الفنتنايل بعد مزجه مه عفاير مخدرة اخرى لمريض وقد تبين ارتفاع بفعالية الـ CK بمقدار ثلاثة مرات عن القيم القياسية 326 IU/L [10] .

المقارنة بين التأثير التثبيطي كل من عقاري الدايزيام والفنتنايل تظهر ان اعلى تاثير (5.3 مرة ) يظهر عند تركيز  $10 \times 10^{-5}$  مولاري من الدايزيام، و (3.5) مرة عند اضافة  $1023 \times 10^{-10}$  مولاري من الفنتنايل. من جهة اخرى اظهر الانزيم اقل تثبيط (1.065 مرة) عند اضافة  $10130 \times 10^{-5}$  مولاري من الدايزيام ، و(1.53مرة) عند اضافة  $1046 \times 10^{-10}$  مولاري من الفنتنايل.

●تقدير الـ Km و Vmax لفعالية الـ CK بوجود وغياب التركيز ثابت للعقاقير :

يخضع انزيم الكرياتين كايبيز لمعادلة ميكلس منتت الحركية [11]. يشير الشكل -4- الى محطط لسرعة التفاعل (V) كداله لتركيز فوسفات الكرياتين المادة الاساس [5] .

شكل (4) منحنى ميكاليس - منتن للـ Cpk

وقد اظهرت النتائج حدوث تنشيط بفعالية الـ CK عند تركيز 2.15 ملي مولاري لفسفوكرياتين وتنشيط عند التركيز 2.25 ملي مولاري للمادة الاساس . تم تقدير قيم السرعة القصوى  $V_{max}$  وثابت ميكالس Km من خلال استخدام مخطط لينويفر-بورك كما ملاحظ في الشكل -5- والجدول -1-

جدول (1) قيم الـ  $V_{max}$  و Km لانزيم Cpk بغياب ووجود عقاري الدايزيبام والفنتانيل

	$V_{max}$ IU/L	Km mM
<b>Control</b>	<b>133.3</b>	<b>2.13±0.3</b>
<b>Diazepam</b>	<b>114.3</b>	<b>2.15±0.03</b>
<b>Fentanyl</b>	<b>70.0</b>	<b>2.45±0.3</b>

ان هذه النتائج لاتتفق مع الدراسة التي قام بها Steponov [12] والتي سجلت قيمة Km 2.00 ملي مولاري للـ CK ودراسة Michael [13] والتي اظهرت قيمة Km بمقدار  $0.12 \pm 0.9$  ملي مولاري عند pH=7 لانزيم CK الطافر لتكوين Pcr  $\leftrightarrow$  cr ودراسة Arezki Azzi [14] التي اظهرت قيمة Km بمقدار  $0.04 \pm 0.86$  ملي مولاري عند pH=7 . وقد اظهرت النتائج المعروضه في الشكل (5- اعلى فعالية بوجود عقار الدايزيبام بتركيز  $41 \times 10^{-5}$  مولاري ) عند تركيز 2.25 ملي مولاري لفسفوكرياتين Pcr ومن جانب آخر أعطى عقار الفنتانيل عند التركيز ( $46 \times 10^{-6}$  مولاري) اعلى فعالية عند تركيز  $2 \times 10^{-5}$  ملي مولاري كما ملاحظ في الشكل (6- ) .

## شكل (5) منحنى ميكاليس منتن لل CpK بوجود الدايزيام

## شكل (6) منحنى ميكاليس لل CpK بوجود الفنتايل

أشارت النتائج المعروضة في (الجدول 1) انخفاض في قيم  $V_{max}$  و  $K_m$  لعقار الدايزيام. وقد أظهرت هذه النتيجة فعل الدايزيام كمنشط لاتنافسي و تزايد في قيم الـ  $K_m$  وتناقص بقيم  $V_{max}$  لعقار الفنتايل للتحويل  $P_{cr} \rightarrow cr$  وهذا يدل على ان للفنتايل فعل المثبط المختلط [14].

من الواضح ان الانزيمات التي لها تثبيط لاتنافسي عكسي تمتلك اثنين او اكثر من المادة الاساس . اللاتنافسي يرتبط عند موقعواضح من الموقع الفعال للمادة الاساس ويرتبط بالمعقد ES فقط [14]

لقد انخفضت قيمة الـ  $V_{max}$  عند وجود المثبط اللاتنافسي كذلك انخفضت قيمة  $K_m$  ايضاً لانه يتطلب من تركيز المادة الاساس ان تصل الى واحد ونصف السرعة القصوى  $V_{max}$  من خلال المعامل  $O_e$  [14]. أن المثبط المختلط يرتبط ايضاً عند موضع واضح من الموقع الفعال للمادة الاساس لكنه يرتبط أما بالانزيم E او بمعقد انزيم - مادة اساس ES [14].

في التراكيز العالية للمادة الاساس تصل السعة الاولية للانزيم الى السرعة القصوى، لهذا فان المثبط الانتافسي يقلل من قيمة السرعة القصوى المقاسة. قيمة ال Km الظهريه تقل ايضا بسبب

كون المادة الاساس لتصل الى نصف السرعة القصوى تقل بمقدار معامل  $\alpha$  [14]

اذا ارتبط المثبط بشكل طبيعي بالموقع فوق يمتلىء ب  $S_1$  (Pcr) ويكون فعله في الاحتمارات كمثبط لاتنافسي بحيث تكون  $S_1$  (Pcr) مختلفة [15]. تم في هذا البحث ملاحظة ان لعقار الدايزيام فعل المثبط اللاتنافسي ولم يلاحظ ذلك في عقار القنتايل .

يؤثر المثبط المختلط على كل من Km و Vmax [15]. من الملاحظ ان الانزيمات اللاتنافسية والانزيمات ذات التنشيط المختلط فقط تمتلك اثنين او اكثر من المواد الاساس (ADP و Pcr) كما في بحثنا هذا .

اذا ارتبط المثبط بالموقع الفعال بشكل طبيعي وأمتلاً ب  $S_2$  [ADP]. فيكون فعله كمثبط مختلط او لاتنافسي ل  $S_1$  (Pcr). من الملاحظ ان نماذج التنشيط يعتمد على حالة الارتباط ل  $S_1$  (Pcr) و  $S_2$  [ADP] وهي مرتبة او عشوائية وهذا يتطلب تحويل مواد الاساس في التفاعل الى نواتج يمكن تقديرها عند مغادرتها للموقع الفعال [15]. يتضمن التفاعل تحول مجموعة الفوسفات من جزيئة واحدة الى انواع اخرى كما في ميكانيكية كرة الطاولة BiBi [15]. ان تفاعلات انزيم الكرياتين كايبيز وهو نوع من الانزيمات المركبة وكما موضح في الشكل -10- .

Cr

ADP

ATP

PCr



شكل (7) ميكانيكية ال . ping-pong BI-BI تفاعل انزيم الكرياتين كاينيز

كذلك العقاقير يمكن ان ترتبط بالانزيم عندما تتحول بشكل (F) (CK - P) او عندما ترتبط

مجموعة الفوسفات وهذا بشكل يثبط تكون ال ATP .

## الاستنتاجات

- مما تقدم نستنتج ان عقاري الدايزيام و الفنتنايل اثرت على فعالية انزيم الكرياتين كاينيز.
- في مدى من تراكيز كلاً من العقارين ادت الى تثبيط فعالية الـ CK وان تاثير التثبيط غير معتمد على التركيز بالنسبة للدواء.
- بمقارنة المعامل الحركي لا في وجود وغياب العقاقير فتبين ان الدايزيام فعل المثبط اللاتنافسي بينما للفنتنايل فعل المثبط المحتلط .
- ان التثبيط لكلاً من الدايزيام والفنتنايل مقرونأ بـ ATP من خلال تحول  $Cr \leftrightarrow Pcr$  .

## الشكر والتقدير:

الى رئاسة قسم الكيمياء في كلية العلوم للبنات -جامعة بغداد الموقرة لسماعها بالجراء البحث، د.يحيى المحترم للتشجيع الذي لقيناه من حضرته للارتقاء بالمستوى العلمي والى جميع اللذين اسهموا اتمام هذا البحث .

## References

- Wrighton, Mark S.; Ebbing, Darrell D. (1993). *General chemistry* (4th ed.). Boston: Houghton Mifflin

- Michael, E., Mortin, S., theo, W. and Uwe, S. (2000). *J. Biol. chem.*, 275(35); 27094–27099.
- Schlattner, U., Forstner, M., Eder, M., Stachowiak, O., Fritz-wolf, K., and Wallimann, T. (1998) *Mol. Cell. Biochem.*, 184, 125–140.
- Carl, A., Edward, R. (1999) "Tietz text Book of clinical Chemistry 3<sup>ed</sup>. ed. W.B. Saunders company, Philadelphia PP; 657–666.
- Morin, L.G. (1977) Creatine Kinase ; Stability, Inactivation, Reactivation. *Clin. Chem.*, 23, 646–652.
- Stanley TH. (1992) "The history and development of the fentanyl series.". *J Pain Symptom Manage.* 7 (3): S3–7
- Robert K Stoelting MD & Simon C Hillier MBChB, FRCA (2009) *Handbook of Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*, 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins
- Prashant, G., MD. Kathleen, N. Franco-Brosion, MD. (2001). *Clinical Practice Exam.*, 84, 60–62.

- Holtmann, M., Meyer, A. E., Pitzer, M. H. Schmidt, (2003) *Pharmacopsychiaty*, 36:317–318.
- Suzanne. L., Shilpa., K., Eric, G., (2006) *Can. J. Anesth.* 53:5. PP:482–486.
- Abramov, A., Durst, R., Scbenker, J. (1996) Elevation of Scrum creatine Phosphokinase and its MB isoenzyme during normal labor and early puerperium: *Acta obstet Gynecol Scanel.*, 75:255–260.
- Stepanov, V., Mateop. Gillet, B., Beloeil, J. C., Jechem, P. and Hoerter, J. A. (1997). *Am. J. Physiol. cell Physiol.*, 273(4):C 1397–C 1408.
- Michael., J. and Cleand., W. (1973) *J–Bio. Chem.* 248(24):8418–8423.
- Arezki, A., Clark, W., Ross., E. and Michael, S. Chapman. (2004) *Protein Science.*, 13:575–585.
- David L. N., and Michael M. C (2000) “Lehninger Principles of Biochemistry “3<sup>rd</sup> ed. worth publishers New York. Chap 8, P, 243.

