تأثير مستخلص إنزيم الفوسفولايبيز والفطر المنتج له Aspergillus niger في بعض معايير المصورة الدموية لذكور الفئران المختبرية *Mus musculus*

محمد عجة عودة* ، خالد كاطع الفرطوسي** ، هدى عيسى الطائي**

* قسم الكيمياء / كلية العلوم / جامعة ذي قار / العراق

** قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة ذي قار / العراق

الخلاصـــــة:-

تخصصت هذه الدراسة لإنتاج مستخلص إنزيم الفوسفولايبيز من الفطر ***Aspergillus niger*** وملاحظة تأثيره وتأثير معلق الفطر ***A.niger*** في بعض معايير المصـــورة الدموية لذكور الفئران المختبرية . تم عزل الفطر ***A.niger*** من مريض مصـــاب بالتهاب جلدي ثم نمي الفطر مختبريا على الوســط الزرعي الصـــلب (SDA) وتم فحص قابليته على إنتاج إنزيم الفوسفولايبيز باستخدام طريقة الأطباق وبتوفر الظروف الملائمة لنمو الفطر وإنتاج الإنزيم من درجة حرارة ومواد مغذية واستخلص إنزيم الفوسفولايبيز بعد تنمية الفطر على الوسط الزرعي السائل و تم حقن ذكور الفئران المختبرية بطريقة الحقن بالخلب بالجرعتين 0.1 و 0.2 مل من المســتخلص الحاوي على الانزيم/ حيوان ولفترتين (7) يوم و (14) يوم من الحقن اليومي المســتمر كما تم حقن ذكور الفئران المختبرية بمعلق الفطر ***A.niger*** بنفس الجرع ولنفس الفترة بالنسبة للإنزيم وتم الحقن لمرة واحدة فقط .

أظهرت نتائج هذه الدراســة أن المعاملة بإنزيم الفوســفولايبيز المســتخلص من الفطر ***A.niger*** والمعاملة بمعلق الفطر ***A.niger*** تحدث انخفاض معنوي في المصـورة الدموية (عدد كريات الدم الحمر وحجم خلايا الدم المضـغوط و نسبة الهيموكلوبين وعدد كريات الدم البيض)

الكلمات المفتاحية : أنزيم الفوسفولابيز ، الفطر ***Aspergillus niger*** ، المعايير الدموية ، الفئران المختبرية

المقدمـــــة

يشير المصطلح Phospholipase إلى الإنزيمات ذات المجاميع غيرالمتجانسة والتي لها القدرة على التحلل المائي لواحد أو أكثر من الروابط ألا سترية Aster linkage في تركيب الكليسريدات المفسـفرة (اللبيدات المفسـفرة) Phosphoglycerides وكل إنزيم قادر على كسـر أصـرة أسـترية خـاصـــة بـه ، يتواجـد إنزيم الفوســفولايبيز بعـدة أنواع Phospholipase A_1, Phospholipase A_2, Phospholipase B, Phospholipase C and Phospholipase D . (Ansell&Hawthorne,1964)

تنتج الفطريات المرضـية إنزيم الفوسـفولايبيز الذي يمكنها من مهاجمة خلايا المضـيف ففي عام 1960 سـجل لأول مره إفراز إنزيم الفوسفولايبيز من قبل ***Candida albicans*** عن طريق تنمية الخميرة على وسط زرعي صلب

- البحث مستل من رسالة ماجستير

يحتوي مح البيض أو اللســـيثين(Costa *et al.*,1968) و درس كل من Price *et al.* (1982) و Chen *et al.*(1997) طريقة استخدام الأطباق لقياس فعالية إنزيم الفوسفولايبيز في الخميرة *Candida* وخمائر أخرى مثل *Cryptococcus neoformans* .

ولاحظ Birch *et al.*(1996) قدرة الفطر *Aspergillus fumigatus* على إنتاج إنزيم الفوسفولايبيز الخام ويعد الفطر من المســببات المرضــية المســؤولة عن أكثر من 90 % من الإصــابات المرضــية للإنســان والحيوانات لقدرتها على إنتاج إنزيم الفوسفولايبيز في درجة حرارة 37درجة مئوية بعد (5) ساعات من الحضن وبعد استخلاص المتكون وتحليله لوحظ العديد من الأيونات الموجبة الناتجة من تحلل الدهون المفسفرة و من هذه الأيونات استنتج الباحثون إن الفطر ينتج الإنزيم بأنواعه A_1،A_2،B ، C و D .

يعد الجنس *Aspergillus* من اكثر الأجناس الفطرية تأثيرا من الناحية ألامراضية للإنسان والحيوان و يضم هذا الجنس اكثر من 185 نوع من بينها *Aspergillus niger* يتواجد هذا النوع في الهواء والتربة والمواد العضوية المتفســـخة وينمو بشـــكل خيوط فطرية Hyphae التي تكون متفرعة ومقســـمة وتحوي انوية متعددة ويتكاثر *A.niger* لاجنسيا بالابواغ Spores ويسبب العديد من الأمراض منها أمراض الجهاز التنفسيaspergillosis Pulmonary التي تشـمل التهاب الرئتين والجيوب الأنفية والتهاب الأنسـجة المبطنة للأنف نتيجة لاسـتنشـاق الابواغ كما يعد من مسببات حالات الحساسية Allergy(Moor *et al.*2000)

المواد و طرائق العمل

المواد الحيوانات المختبرية

استخدمت في الدراسة الحالية ذكور الفئران المختبرية البيضاء *Mus musculus* L. سلالة Balb/c والتي تم الحصول عليها من جامعة البصرة وتم تربيتها في البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة ــ كلية التربية ــ جامعة ذي قار ، وتحت الظروف المثالية والمتمثلة بدرجة حرارة (20 ـــ 25) درجة مئوية وإضاءة (12 ساعة ضوء 12 ساعة ظلام) منتظمتين طيلة أيام التجربة.

وزعت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية ذات أغطية معدنية مشبكة أبعادها (13 × 20 × 26) سم والمصنعة من ألشركة العراقية للتقنيات الحياتيةIraqi Biotechnology Company العراق ـــــ بغداد. واستعملت نشارة الخشـب لفرش أرضـية الأقفاص مع مراعاة تبديلها أسـبوعيا وتزويد الحيوانات بالماء والعليقة بصـورة حرة *ad libitum* (Terry *et al.*,1996) .

طرائق العمل

العزلة الفطرية

تم الحصول على العزلات الفطرية السريرية من العيادة الاستشارية الجلدية في مستشفى الرفاعي العام / محافظة ذي قار / العراق . حيث جمعت (15) عزلة فطرية من مرضى ذكور وإناث (بأعمار مختلفة) مصابين بالتهاب جلدي .

تنمية وتنشيط العزلات الفطرية

لغرض تنشـــيط نمو هذه العزلات مختبرياً نميت على الوســـط الزرعي الصـــلب (SDA Sabaurauds Dextrose Agar) والمحضر من كلوكوز (30 غرام / لتر) و ببتون (10غرام /لتر) وخلاصـــة الخميرة (10 غرام /لتر) ومســـحوق الاكار (20 غرام / لتر) . بعد تعقيم الوســـط بالموصـــدة بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند/ انج^2 ولمدة 20 دقيقة، ثم صب الوسط الزرعي في أطباق بتري معقمة، بعدها زرعت العينة الأصلية وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة 37 درجة مئوية ولمدة 72 ساعة (Birch *et al.*,1996).

الكشف عن إنزيم الفوسفولايبيز

تم ألكشف عن إنزيم الفوسفولايبيز في الوسط الزرعي الصلب باستخدام طريقة Price *et al.* (1982) وكما يأتي:-

أضيف (20) غرام من الاكار المغذي إلى لتر من الماء المقطر ثم أضيف (1) مولاري من كلوريد الصوديوم NaCl و(0.05) مولاري من كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ مع 8% من مح البيض المعقم والمعزول من البيض الطازج لكي يستخدم بوصفه مادة خاضعة Substrate في الكشف عن إنزيم الفوسفولايبيز.

عزل مح البيض عن إلالبومين في حاوية معقمة وجفف في الفرن بدرجة حرارة 40 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة ، أخذت المادة الجافة وثم مزج مع الماء المقطر المعقم بوســـاطة الخلاط ثم اجري لها فصـــل بجهاز النبذ المركزي (3000 دورة/ دقيقة) ولمدة (15) دقيقة ، أخذت المادة الطافية Supernatant وخففت بالماء المقطر المعقم ثم أضيفت إلى الوسط الزرعي المعقم فيpH = 7. صب الوسط في أطباق معقمة وترك ليجف في ظروف معقمة ثم تم اخذ جزء من العزلة التي تم تنميتها على الوسط الزرعي الصلب (الفقرة 2. 2. 1. 1) باستعمال ثاقب فليني (قطره 5 مليمتر) ووضـــع في منتصـــف الطبق ثم وضـــع الطبق في الحاضـــنة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 72 ساعة .

الحصول على المستخلص الحاوي على إنزيم الفوسفولايبيز

تمت تنمية الفطر على الوســـط الزرعي الســـائل والمحضـــر حســـب طريقة Memon *et al.*(1983) من كلوكوز (16.5 غرام /لتر) و مثيونين (1 غرام /لتر) و KH_2PO_4 (1.7 غرام /لتر) و $MgSO_4.7H_2O$ (130ملغرام /لتر) وKCl (340 ملغرام /لتر) و $FeCL_3.6H_2O$ (2.5 غرام /لتر) و$MnSO_4.4H_2O$ (2.5 غرام/لتر) و Na_2HPO_4 (4.5 غرام/لتر) و بايوتين(Vitamin H) (6 ملغرام / لتر) وبعد تعقيم الوســـط أضـيف جزء من المسـتعمرة الفطرية الذي يحتوي على كونيدات الفطر بتركيز(5×10^6 خلية / مليلتر) ثم أضـيف (5) مل من محلول اللسيثين كمادة أساس إلى الوسط الزرعي المحضر و حضن الوسط في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة (7) أيام . بعدها رشـــحت محتويات الدورق الحاوي على الفطر النامي بواســـطة ورق الترشـــيح نوع Millipore filter paper (حجم 0.45 مايكروميتر). واخذ الراشح الذي يحتوي على إنزيم الفوسفولايبيز وحفظ في درجة حرارة (- 20) درجة مئوية لحين استخدامه في إجراء التجارب اللاحقة أو اختبار الفعالية .

اختبـــار فعاليـــــة الإنزيـــــــم

استخلاص اللسيثين من مح البيض

تعتمد هذه الطريقة على اســتخلاص الدهون بواســطة مذيب دهني ومن ثم تبخير المذيب من المســتخلص والذي تنفصــل عنه الدهون المفســفرة (اللســيثين) يترســب بالأســيتون بينما تبقى الكليســريدات والكولســترول ذائبة في الأسيتون.

يفصل مح البيض بواسطة ماصة معقمة ثم يضاف إليه (50) مليلتر من الايثانول و(25) مليلتر ايثر ، يخلط المزيج ويترك لبضعة دقائق ثم يرشح المزيج ويؤخذ الراشح الذي تم استخلاص الدهون المكونة منه لمح البيض ، بعد ذلك بخر الراشح لدرجة الجفاف في حمام مائي ويذوب المتبقي عن التجفيف في (10) مليلتر من الايثر . يضاف محلول الايثر إلى (30) مليلتر من الأسيتون مع الخلط المستمر أثناء الاضافة ومع ملاحظة تكون راسب ابيض هو اللسيثين يرشح الخليط ويجمع المتبقي على ورقة الترشيح وهو اللسيثين الذي يكون بشكل لزج (الظاهر وآخرون ،1982).

اختبار الامتصاصية

اســتخدمت طريقة *Sharon et al.*(1996) لفحص فعالية إنزيم الفوســفولايبيز في تحلل الدهون المفســفرة باســتخدام جهازالمطياف الضــوئي حيث تم اخذ (0.1) مليلتر من المســتخلص الحاوي على إنزيم الفوســفولايبيز و مفاعلته مع المادة الأســاس (اللســيثين) (0.1 مليغرام) وأضــيف أليها (2) مليلتر من المحلول المنظم (ملح ســترات الصــوديوم وحامض الســتريك0.1مولاري). حضــن المزيج لمدة ســاعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ثم قيســت الامتصاصية عند طول موجي 590 نانومتر بالمقارنة مع مزيج السيطرة Control (اللسيثين والمحلول المنظم).

فحص الإنزيم Enzyme assay

استخدمت طريقة *Sharon et al.*(1996) لتقدير نشاط إنزيم الفوسفولايبيز و كالأتي:-

يؤخذ (0.1) مليلتر من المستخلص الحاوي على الإنزيم ويذاب في (0.1) مليلتر من المحلول المنظم (pH =6.7) مع (2.5) مليلتر من محلول اللسيثين (1%) (وزن / حجم). حضن المزيج لمدة (30) دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ، ثم أوقف التفاعل بواسطة (1) مليلتر من محلول كلوروفورم : ميثانول (1:2) (حجم:حجم).استخلصت نواتج التفاعل بطريقة Bligh& Dyer(1959) التي تتلخص بالآتي :-

يضــاف إلى المزيج (3.75) مليلتر من خليط كلوروفورم : ميثانول(1:2) (حجم:حجم) ثم حرك المزيج في قمع الفصــل لمدة (10-15) دقيقة ،أضــيف (1.25) مل من الكلوروفورم مع التحريك دقيقة واحدة ثم أضــيف (1.25) مليلتر ماء مقطر مع التحريك لدقيقة أخرى . ثم وضــع المزيج في جهاز النبذ المركزي (3000دورة/دقيقة) ولمدة (15) دقيقة . اهملت الطبقة العليا وجمعت الطبقة الســفلى في حاوية معقمة ، ثم بخر المزيج قليلا في حمام مائي وذوب المســتخلص الدهني المتبقي في كمية قليلة من كلوروفورم : ميثانول (1:2) بحيث يكون جاهز للتحليل لمعرفة الأحماض الدهنية المتحررة . استخدمت تقنية TLC (Thin Layer Chromatography) وباستخدام المذيب المتكون من :-

كلوروفورم : أسيتون : ميثانول : حامض الخليك : ماء مقطر

15 ml : 30 ml : 30 ml : 120 ml : 90 ml

بعد ترحيل النواتج اســتخدمت أحماض دهنية قياســية للترحيل تحت نفس الظروف للمقارنة واســتخدم صــبغة اليود لتوضيح نواتج التفاعل .(Banno *et al.*, 1985)

تحضير معلق الفطر *A.niger*

يؤخذ جزء من المستعمرة الفطرية باستعمال ثاقب فليني قطره (5 مليمتر) وتوضع في (100 مليلتر) ماء مقطر معقم ليتم الحصول على التركيز(5×10^{6} بوغ / مليلتر) ويتم حساب عدد الابواغ كالآتي :-

تؤخذ قطره من المحلول (الماء المقطر المعقم + المستعمرة الفطرية) وتوضع على سلايد العد Haemocytometer ويتم حساب الابواغ الموجودة في عشر مربعات وسطية تؤخذ بشكل عشوائي ضمن المربع الوسطي الكبير (يفضل أن تؤخذ المربعات العشر بشكل قطري) (Sharon *et al.*,1996) وحسب القانون التالي :-

$$\frac{\text{عدد الابواغ المحسوبة}}{0.004} = \frac{\text{التركيز}}{1000 \text{ مايكرولتر}}$$

0.004 حجم المربع الوسطي مقاس بـ (مايكروميتر).

1000 مايكرولتر = 1 مليلتر .

تأثير إنزيم الفوسفولايبيز ومعلق الفطر *A.niger* في بعض معايير المصورة الدموية

استخدم في هذه التجربة (120) من ذكور الفئران المختبرية بعمر(8-10) أسبوع ووزن (25-30) غم و قسمت إلى تجربتين وكما يلي :-

1- التجربة ألاولى (التي حقنت فيها الحيوانات بالمستخلص الحاوي على الإنزيم والذي تم الحصول عليه من الفطر*A.niger* وكان الحقن يومي طيلة فترة التجربة) .

2- التجربة الثانية (التي حقنت فيها الحيوانات بمعلق الفطر *A.niger* وكان الحقن في اليوم الأول للتجربة فقط) .

وقسمت حيوانات كل تجربة إلى مرحلتين الأولى لمدة (7) أيام والأخرى لمدة (14) يوم وكل مرحلة تشمل ثلاثة مجاميع (كل مجموعة تضم 10 حيوانات) وكما يلي :-

1- المجموعة الأولى (مجموعة السيطرة Control) / تم حقن الحيوانات بالمحلول الفسيولوجي NaCl (0.9%) بمقدار (0.1/ مليلتر/ حيوان) .

2- المجموعة الثانية / تم حقن الحيوانات بالمستخلص الحاوي على الإنزيم والذي تم الحصول عليه من الفطر *A.niger* أو بمعلق الفطر *A.niger* حسب نوع التجربة بمقدار(0.1/ مليلتر/ حيوان) .

3- المجموعة الثالثة / تم حقن الحيوانات بالمســتخلص الحاوي على الإنزيم والذي تم الحصــول عليه من الفطر *A.niger* أو بمعلق الفطر *A.niger* حسب نوع التجربة بمقدار (0.2/ مليلتر/ حيوان).

تم في هذه التجربة ســحب الدم من قلب كل حيوان مباشــرة بعد تخديرها بمادة الايثر وتشــريحها. وتم حفظ الدم في أنابيب مزودة بمادة مانعه للتخثر EDTA ومن ثم إجراء القياسات الدموية ، والتي تشمل:-

حساب عدد كريات الدم الحمراء Red Blood Cells Count(R. B. C.)

اســـتخدم في هذه التجربة جهاز عد كريات الدم الحمراء Haemocytometer ومحلول التخفيف (محلول هايم – Haym's fluid) المكون حســب طريقة Lewis *et al.*(2001) من ســترات الصــوديوم (30 غرام /لتر) و محلول الفورمالين (10مل / لتر) والذي يعطي بريقا لكريات الدم الحمراء في حقل المجهر الضـوئي . وتم حسـاب الكريات في خمسة مربعات (الأربعة الطرفية والمربع الوسطي) للمربع الوسطي الكبير من شريحة جهاز عد كريات الدم حسب المعادلة الآتية :-

عدد كريات الدم الحمراء (كرية / ملم^3 دم)=عدد الكريات في المربعات الخمسة × 10^4

قياس حجم الدم المضغوط Packet Cell Volume(P.C.V.)

استخدم جهاز الهيماتوكريت الدقيق Microhaematocrite في هذه التجربة . تم فصل الدم في الأنابيب الشعرية المحتوية على الهيبارين بواسطة جهاز النبذ المركزي الخاص Haematocrite centrifuge بسرعة (16500 دورة/دقيقة) ولمدة (5) دقائق وحساب حجم الدم المضـغوط باسـتخدام مسـطرة خاصـة Haematocrite read . (Baker & Sliverton ,1976)

قياس نسبة الهيموكلوبين (Hb)

تم تقدير كمية الهيموكلوبين وذلك بقســمة حجم خلايا الدم المضــغوط على (3.3) بوصــف إن الهيموكلوبين يمثل 3/1 حجم كرية الدم الحمراء (WHO , 1989) .

حساب كريات الدم البيضاء White Blood Cell count(W.B.C.)

اســـتخدم في هذه التجربة جهاز عد كريات الدم الحمراء Haemocytometer ومحلول التخفيف(محلول تركي- Turkey's solution) والمكون من حامض الخليك الثلجي (15مل/ لتر) و صـبغة Gention (10 غرام /لتر) . وتم حسـاب الكريات البيضـاء في المربعات الأربعة الكبيرة الطرفية (Lewis *et al.*,2001)، يحسـب عدد كريات الدم البيضاء في المليمتر المكعب الواحد من الدم حسب المعادلة الآتية :-

عدد كريات الدم البيضاء (كرية / ملم ^{3} دم) =عدد الكريات في المربعات الأربعة × 50

التحليل الاحصائي

تم استخدام برنامج Spss باستخدام اختبار تحليل التباين الاحادي ANOVA-I وتحت مستوى احتمال $p<0.01$.

النتائج Result

العزلة الفطرية :-

بعد تنمية العزلات التي تم جمعها أخذت العزلة الأكثر إنتاجاً للإنزيم ولوحظ أن المستعمرات الفطرية النامية على الوسط الزرعي الصلب (SDA) تكون بيضاء اللون في بداية النمو و لكن سرعان ما تصبح المستعمرات سوداء اللون مع تقدم عمر المستعمرة. وتم تشخيص العزلة الفطرية النامية بأنها مستعمرات عائده للفطر *Aspergillus niger* (صورة-1-)

الكشف الأولي عن إنزيم الفوسفولايبيز :-

توضح الصورة(2) قابلية العزلة *A. niger* على إفراز إنزيم الفوسفولايبيز باستخدام مح البيض كمادة خاضعة في الوسط الزرعي الصلب من خلال تكوين منطقة شفافة Clear zone حول المستعمرة الفطرية النامية والتي تدل على إفراز الأنزيم (Vidotto *et al* .,1998).

الكشف عن فعالية إنزيم الفوسفولايبيز

اختبار الامتصاصية

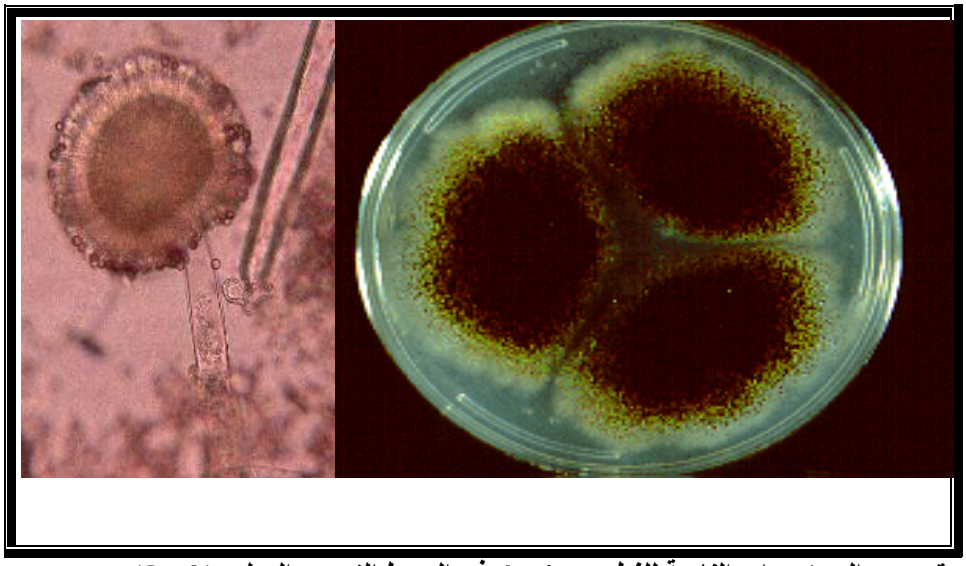
تم اختبار فعالية إنزيم الفوسفولايبيز في تحلل الدهون المفسفرة باستخدام اللسيثين (المستخلص من مح البيض) كمادة خاضعة وذلك بقياس الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي. وكانت الامتصاصية كآلاتي :-

انبيب الاختبار	الامتصاصية بطول موجي 590 نانومتر
الأنبوب الأول (المحلول المنظم + اللسيثين)	1.45
الأنبوب الثاني (المحلول المنظم + اللسيثين + الإنزيم)	0.69

الأنبوب الثالث (مستخلص إنزيم الفوسفولايبيز)	0.11

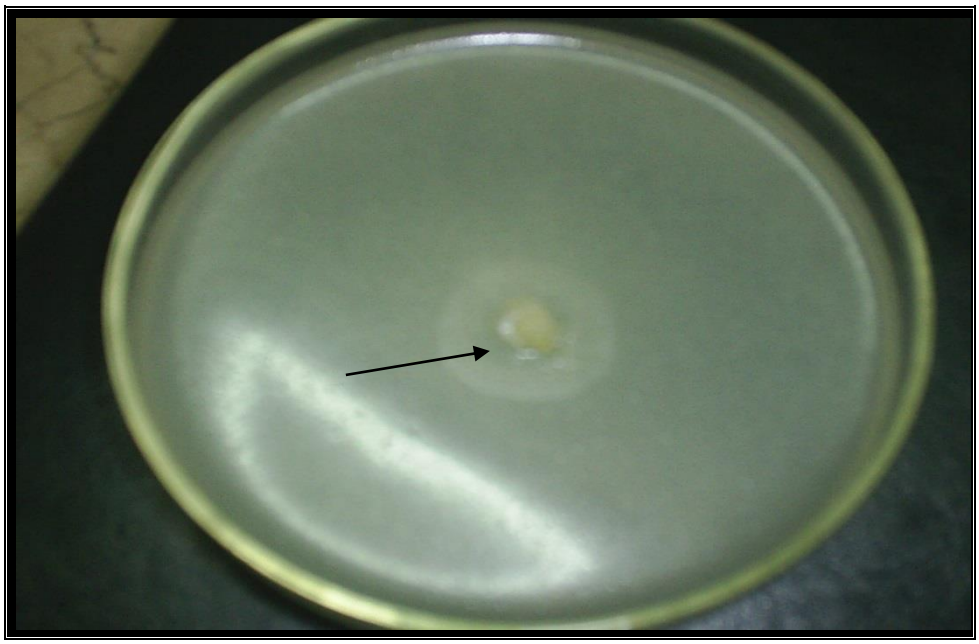
اختبار الفصل بكروماتوكرافيا بالطبقة الرقيقة

تم فحص فعالية إنزيم الفوسفولايبيز المستخلص باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) باستخدام اللسـيثين كمادة خاضـعة للتفاعل و اسـتخلاص النواتج بطريقة Bligh&Dyer(1959) وبعد إجراء تقنية TLC للمادة المســتخلصـــة و مقارنتها مع أحماض دهنية قياســية ظهر إن قيمة R_f (عامل الاعاقة) للمادة المستخلصة مقاربة إلى القيمة نفسها للحامض الدهني Palmatic acid . (صورة – 3 -)

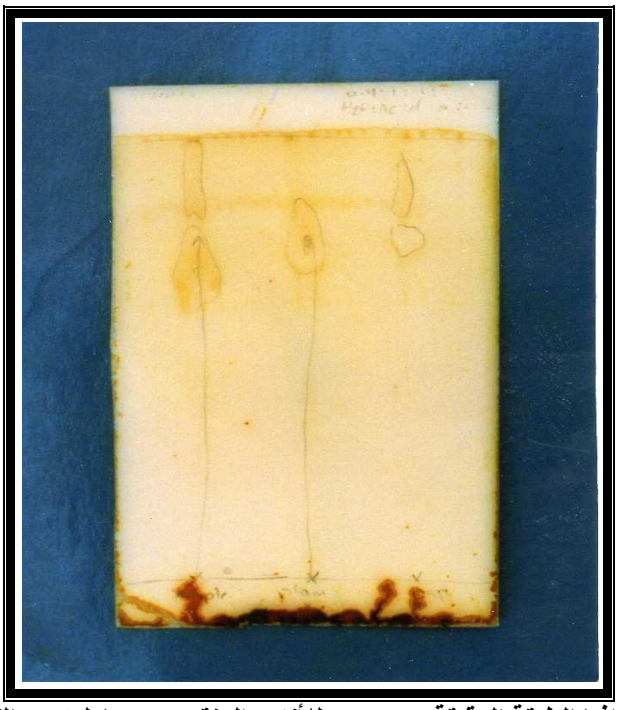


صورة – 1 – المستعمرات النامية للفطر *A.niger* في الوسط الزرعي الصلب (SDA)

a- المستعمرات b- حامل الكونيدة



صورة ـ 2 ـ الفعالية الإنزيمية للفطر *A. niger* باستخدام الوسط الخاص بأنزيم الفوسفولايبيز



صورة ـ 3 ـ تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) للأنزيم المنقى بعد معاملته مع اللسيثين و استخلاص النواتج

اليمين ــ حامض الستيارك Stearic acid R_f = 0.82

الوسط ــ حامض البالمتك Palmatic acid R_f =0.77

اليسار ــ العينة Sample R_f = 0.75

تأثير إنزيم الفوسـفولايبيز المسـتخلص من الفطر *A.niger* في بعض معايير المصـورة الدموية لذكورالفئران المختبرية

المرحلة الأولى :-

أظهرت نتائج الدراسـة الحالية انخفاض معنوي لمعايير المصـورة الدموية (R.B.C. و P.C.V. و Hb و W.B.C.) لحيوانات المجموعتين الثانية و الثالثة المعاملتين بـ(0.1 و 0.2) مليلتر من مستخلص الحاوي على إنزيم الفوسـفولايبيز على التوالي عند مقارنتها مع المجموعة الأولى (السـيطرة)عند مسـتوى الاحتمال ($P<0.01$) ماعدا عدد كريات الدم الحمر للمجموعة الثانية التي حصـل فيها انخفاض دون مسـتوى المعنوية . وأظهرت النتائج حصول انخفاض في معايير المصورة الدموية (R.B.C. و P.C.V. و Hb و W.B.C.) للمجموعة الثالثة عند مقارنتها مع المجموعة الثانية وكان الانخفاض دون مستوى المعنوية عند مستوى الاحتمال أعلاه ، (جدول –1-).

جدول (1) تأثير إنزيم الفوسفولايبيز المستخلص من الفطر *A.niger* في بعض معايير المصورة الدموية لذكور الفئران المختبرية (المرحلة الأولى) .

مجاميع الاختبار	المصورة الدموية			
	عدد كريات الدم الحمر $\times 10^6$ / ملم^3	حجم الدم المضغوط %	تركيز الهيموكلوبين %	عدد كريات الدم البيض $\times 10^3$ / ملم^3
مجموعةالأولى(السيطرة) 0. ملNaCl/حيوان/يوم	6.350 ± 0.21	38.0 ± 0.51	12.6 ± 0.33	4.720 ± 0.05
المجموعة الثانية 0. ملPL.E/حيوان/يوم	5.507 ± 0.16	*34.6 ± 0.77	*11.5 ± 0.27	*3.445 ± 0.09
المجموعة الثالثة 0. ملPL.E/حيوان/يوم	*4.636 ± 0.49	*33.5 ± 0.65	*11.0 ± 0.23	*3.01 ± 0.10

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي (عدد الحيوانات 10 في كل مجموعة)

* اختلاف معنوي ($P<0.01$) عن مجموعة السيطرة.

PL.E /المستخلص الحاوي على إنزيم الفوسفولايبيز الذي تم الحصول عليه من الفطر *A.niger* .

المرحلة الثانية :-

يوضـح جدول (2) نتائج التحليل الإحصـائي التي أكدت حصـول انخفاض معنوي في معايير المصـورة الدموية (R.B.C. و P.C.V. و Hb و W.B.C.) للمجموعة الثالثة المعاملة بـ(0.2) مليلتر من إنزيم الفوسفولايبيزعند مقارنتها مع المجموعتين (مجموعة السيطرة و المجموعة الثانية المعاملة بـ 0.1 مليلتر من المستخلص الحاوي على إنزيم الفوسـفولايبيز) عند مسـتوى الاحتمال ($P<0.01$) وأظهرت النتائج حصـول انخفاض معنوي للمعايير (R.B.C. و W.B.C.) للمجموعة الثانية مقارنة مع مجموعة السيطرة عند مستوى الاحتمال أعلاه .

جدول (2) تأثير إنزيم الفوسفولايبيز المستخلص من الفطر *A.niger* في بعض معايير المصورة الدموية لذكور الفئران المختبرية (المرحلة الثانية)

مجاميع الاختبار	المصورة الدموية			
	عدد كريات الدم الحمر $\times 10^6$ / ملم^3	حجم الدم المضغوط %	تركيز الهيموكلوبين %	عدد كريات الدم البيض $\times 10^3$ / ملم^3
مجموعةالأولى(السيطرة) 0. مل NaCl/حيوان/يوم	6.050 ± 0.18	37.0 ± 0.61	12.0 ± 0.28	4.74 ± 0.09
المجموعة الثانية 0. مل PL.E/حيوان/يوم	*5.44 ± 0.12	36.0 ± 0.42	11.6 ± 0.22	*3.66 ± 0.06
المجموعة الثالثة 0. مل PL.E/حيوان/يوم	*a3.68 ± 0.34	*a32.3 ± 0.53	*a10.0 ± 0.29	*a2.78 ± 0.10

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي (عدد الحيوانات 10 في كل مجموعة)

* اختلاف معنوي ($P<0.01$) عن مجموعة السيطرة.

a اختلاف معنوي ($P<0.01$) عن المجموعة الثانية .

PL.E /المستخلص الحاوي على إنزيم الفوسفولايبيز الذي تم الحصول عليه من الفطر *A.niger* .

تأثير معلق الفطر *A.niger* المنتج لإنزيم الفوسفولايبيز في بعض معايير المصورة الدموية لذكور الفئران المختبرية

المرحلة الأولى :-

بينت نتائج الدراسة الحالية حصول انخفاض في معايير المصورة الدموية (R.B.C. و P.C.V. و Hb و W.B.C.) للمجموعة الثانية المعاملة بـ(0.1) مليلتر من معلق الفطر *A.niger* وكان انخفاض كل من(P.C.V. و W.B.C.) انخفاضاً معنوياً مقارنة مع مجموعة السيطرة عند مستوى الاحتمال ($P<0.01$) . كما لوحظ حصول انخفاض معنوي في معايير المصورة الدموية (R.B.C. و P.C.V. و Hb و W.B.C.) للمجموعة الثالثة

المعاملة بـ(0.2) مليلتر من معلق الفطر *A.niger* مقارنة مع مجموعة السيطرة وانخفاض معنوي لعدد كريات الدم البيض للمجموعة الثالثة مقارنة مع المجموعة الثانية عند مستوى الاحتمال أعلاه ، (جدول –3-) .

جدول (3) تأثير معلق الفطر*A.niger* المنتج لإنزيم الفوسفولايبيز في بعض معايير المصورة الدموية لذكور الفئران المختبرية (المرحلة الأولى)

مجاميع الاختبار	المصورة الدموية			
	دد كريات الدم حمر $\times 10^6$ / ملم^3	حجم الدم المضغوط %	تركيز الهيموكلوبين %	عدد كريات الدم البيض $\times 10^3$ / ملم^3
المجموعةالأولى(السيطرة) 0.1 مل NaCl/ حيوان	6.35 ± 0.25	38.0 ± 0.90	12.3 ± 0.39	4.73 ± 0.08
المجموعة الثانية 0.1 مل معلق الفطر/ حيوان	5.31 ± 0.15	*34.0 ± 0.56	11.0 ± 0.39	*3.50 ± 0.07
المجموعة الثالثة 0.2 مل معلق الفطر/ حيوان	*4.62 ± 0.51	*32.0 ± 0.53	*10.3 ± 0.21	*a2.71 ± 0.06

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي (عدد الحيوانات 10 في كل مجموعة)

* اختلاف معنوي ($P<0.01$) عن مجموعة السيطرة.

a اختلاف معنوي ($P<0.01$) عن المجموعة الثانية .

المرحلة الثانية :-

يوضـــح جدول(4) حصـــول انخفاض معنوي في (R.B.C. و W.B.C.) للمجموعتين الثانية و الثالثة المعاملتين بـــ(0.1 و0.2) مليلتر من معلق الفطر *A.niger* على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة عند مستوى الاحتمال ($P<0.01$) كما لوحظ حصـــول انخفاض دون مســـتوى المعنوية ($P<0.01$) في(P.C.V. وHb) للمجموعتين (الثانية و الثالثة) مقارنة مع مجموعة السيطرة. ولا توجد فروق معنوية بين المجموعتين الثانية والثالثة .

جدول (4) تأثير معلق الفطر *A.niger* المنتج لإنزيم الفوسفولايبيز في بعض معايير المصورة الدموية لذكور الفئران المختبرية (المرحلة الثانية)

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي (عدد الحيوانات 10 في كل مجموعة)

مجاميع الاختبار	المصورة الدموية			
	عدد كريات الدم الحمر $\times 10^6$ / ملم^3	حجم الدم المضغوط %	تركيز الهيموكلوبين %	عدد كريات الدم البيض $\times 10^3$ / ملم^3
المجموعةالأولى(السيطرة) 0.1 ملNaCl/حيوان	7.16 ± 0.32	39.0 ± 0.76	12.66 ± 0.47	4.76 ± 0.08
المجموعة الثانية 0.1 مل معلق الفطر/حيوان	*4.98 ± 0.54	38.0 ± 0.81	12.33 ± 0.31	*3.65 ± 0.08
المجموعة الثالثة 0.2 مل معلق الفطر/حيوان	*4.54 ± 0.35	37.0 ± 0.89	12.00 ± 0.31	*3.46 ± 0.09

* اختلاف معنوي ($P<0.01$) عن مجموعة السيطرة.

المناقشة Discussion

الكشف الأولي عن إنزيم الفوسفولايبيز على الوسط الزرعي الصلب

عند تنمية الفطر *A. niger* في الوسـط الزرعي الحاوي على مح البيض لوحظ تكون منطقة شـفافة حول المسـتعمرة الفطرية و التي تدل على أفرز إنزيم الفوسـفولايبيز من قبل الفطر *A.niger* وتحلل اللسـيثين و تحرر

الأحماض الدهنية وهذه النتيجة تتفق مع دراسات سابقة حول قدرة الفطر *A.niger* على إنتاج إنزيم الفوسفولايبيز باستخدام اللسيثين كمادة خاضعة للتفاعل (Birch *et al.*,1996; Koul *et al.*,1998) .

الكشف عن فعالية إنزيم الفوسفولايبيز

أظهرت نتائج اختبار الامتصاصية باستخدام جهاز مطياف الامتصاص الضوئي انخفاض قيمة الامتصاصية عند مفاعلة إنزيم الفوسفولايبيز مع مادة اللسيثين مقارنة مع قيمة الامتصاصية لمادة اللسيثين ، وهذا يدل على تحلل مادة اللسيثين عند مفاعلتها مع إنزيم الفوسفولايبيز وحسب قانون ببر لامبرت للامتصاصية (John , 2001) .

وهذا ما يدعمه تطبيق TLC للمواد الناتجه عن التفاعل حيث تم الحصول على بقعة لها R_f مقاربا لتلك الخاصة بالحامض الدهني البالمتيك .(عودة،2005).

تأثير المستخلص الحاوي على إنزيم الفوسفولايبيز و الفطر *A.niger* المنتج له في بعض معايير المصورة الدموية لذكور الفئران المختبرية

بينت نتائج دراسة تأثير إنزيم الفوسفولايبيز والفطر المنتج له *A.niger* في بعض معايير المصورة الدموية لذكورالفئران المختبرية حصول انخفاض معنوي في معايير المصورة الدموية (R.B.C. و P.C.V. و Hb و W.B.C.) لذكور الفئران المختبرية المعاملة بمستخلص إنزيم الفوسفولايبيز الذي تم الحصول عليه من الفطر *A.niger* وكذلك في ذكور الفئران المختبرية المعاملة بمعلق الفطر *A.niger* مقارنة مع مجموعة السيطرة .

ويعود هذا الانخفاض إلى تأثير إنزيم الفوسفولايبيز و الفطر *A.niger* على الخلايا الدموية بصورة مباشرة عن طريق تحلل أغشية الخلايا الدموية ، أو بصورة غير مباشرة عن طريق التأثير على إنتاج الهرمونات المسؤولة عن إنتاج الخلايا الدموية (Vishwanath *et al.*, 1996).

إن الخلايا الدموية كبقية الخلايا الجسمية الأخرى تحاط بأغشية بلازمية ذات نسبة عالية من الدهون المفسفرة (Michael,2005) وتعتبر الدهون المفسفرة النسيج الهدف لفعالية إنزيم الفوسفولايبيز فقد أشار Fourcade *et al.*(1995) ان زيادة مستوى المركب Lysophosphotidyl acid (LPA) يعود إلى تحلل المركب Phosphotidylinosetol(PI) المتواجد على أسطح كريات الدم الحمر كجزء من الدهون المفسفرة المكونة للأغشية ، ويزداد مستوى المركب (LPA) في حالات الالتهابات الحادة الناتجة عن زيادة تركيز الفوسفولايبيز ويعمل هذا المركب بإخلال عبور المواد عبر الأغشية للخلايا الدموية مسببا انتفاخ الخلايا الدموية ومن ثم انفجارها . (Nikole *et al.*,2006)

لاحظ Walsh *et al.*(1983) تحلل أغشية كريات الدم البيض (العدلة Neutrophils) بتأثير إنزيم الفوسفولايبيز و الذي يسبب خللاً في نظام أغشيتها وبالتالي تحطمها حيث يعمل إنزيم الفوسفولايبيز على تحرر حامض الاراكيدونك Arachedonic acid(AA) من دهون أغشية كريات الدم البيض كاستجابة لمختلف أنواع الالتهابات (Duane&Waite,1992). كما لاحظ Billah&Lapetina (1982) و Bills *et al.*(1976) أن لإنزيم الفوسفولايبيز القدرة على تحلل مركب Phosphotidylinosetol(PI) لأغشية الصفيحات الدموية وتكوين مركب Lysophosphotidylinosetol .

أما السـبب غيرا لمباشـر فيتمثل بتأثير إنزيم الفوسـفولايبيز والفطر*A.niger*على الهرمونات المسـؤولة عن إنتاج الخلايا الدموية و المتمثلة بهرمون الاريثروبويتين من الكلية والذي يعد المحفز الاســاس لانتاج كريات الدم فقد أكد Zaidi *et al.*(1978) إن لإنزيم الفوسفولايبيز تأثيراً على الكلية يتمثل بتحلل أغشية المايتوكوندريا مسببا نقصاً في الوظائف الكلوية .

كما بين فطاير (2000) أن إنتاج الخلايا الدموية يحدث تحت تأثير تحفيز عامل الاريثروبويتين الذي يفرز من الكلية Renal Erythropoitin Factor (R.E.F.) ويرتبط مع مـادة الكلوبيولين التي تفرز من الكبـد ليكون Erythropoitin Stimulating Factor (E.S.F.) والذي يحمله الدم إلى نخاع العظم ويحفز خلايا الســاق على إنتاج الكريات الدموية وان عجز وحدات العمل الكلوي عن إفراز هذا الهرمون يؤدي إلى حصــول فقر الدم الكلوي Renal Anemia .

المصادر

المصادر العربية :-

- الظاهر ، اسماعيل محمد ؛ حسن ، فريال . (1982) . الكيمياء التحليلية العملي . قسم الكيمياء . كلية العلوم . جامعة الموصل . العراق .
- عوده ، محمد عجه . (2005) . عزل و تنقية إنزيم الفوسفولايبيز من العزلة السريرية للفطر *Aspergillus flaves* ودراسة بعض خصائص الإنزيم . رسالة دكتوراه غير منشورة ، كلية التربية ، جامعة البصرة . العراق .
- فطاير ، عبد الرحيم . (2000) . علم وظائف الدم . دار وائل للطباعة والنشر . عمان . الأردن .

المصادر الأجنبية :-

- **Ansell , V.E. and Hawthorne ,J.N. (1964).Catabolism. In G.B. Ansell and J. N. Hawthorne (ed) , Phospholipids . Elsevier publishing co. Amsterdam, the Netherlands. , P.152-147**
- **Baker ,F.T. and Sliverton ,R.E. (1976).Introduction to medical laboratory technology , *5th ed. London ,ISBN*.,408:519-532.**
- **Banno , Y. ; Yamada , T. and Nozawa , T. (1985) . Secreted phospholipase of the dimorphic fungus , *Candida albicans* separation of three enzyme and some biological properties. *Sabouraudia. Mycology* ,23:47-54.**

- **Billah ,M.M. and Lapetina ,E.G. (1982). Formation of lysophosphotidylinositol in platelets stimulated with thrombin or ionosphere .*J.Biol.Chem*.,257:5196-5200.**
- **Bills ,T.K.;Smith ,J.B. and Silver ,M.J.(1976). Metabolism of arachidonic acid by human platelets . *Biochem . biophys .Acta* ., 424:303-314.**
- **Birch ,M.;Robson ,G. ; Law ,D.L. and Denning ,D.W. (1996). Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus* . *Infect.Immun*., 64:751-755.**
- **Bligh .E.C. and dyer ,W.J. (1959) .A rapid method of total lipid extraction and purification .Can. *J. Biochem physiol* ., 37:911-917.**
- **Chen , S. ; Wright , L.C. Santangelo , R.T. ; Muller , M. ; Moran , V.R. ;Kuchel ,P.W. and Sorrell ,T.C.(1997). Identification of extracellular phospholipase B ,lysophospholipase and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans* . *Infect. Immun*., 65:405-411.**
- **Costa , A.; Costa ,C.; Misefari , A. and Amato ,A. (1968). On the enzymetic activity of certain fungi .phospholipase activity on media containing sheeps blood of pathogenic strain of *Candida albicans* . *Sci.Fis.Mat.Nat.*,8: 93-101.**
- **Duane ,M.S. and Waite ,M. (1992). phosphatidylinositol hydrolysis by phospholipase A_2 and C activities in human peripheral blood neutrophils.*J. leukocyte Biology* , 52:670-678.**
- **Fourcade , O.; Simon , M. F.; Viode , C.; Rugani , N.; Leballe , F.; Ragab , A.; Fournie , B.; Sarda , L. and Chap , H. (1995). Activity of phospholipase enzyme . *Cell*, 80:919-927.**
- **John , S. V. (2001).Clinical Biochemistry Techniques and Instrumentation , Royal Melbourne Institute of Technology , Australia , *by World Scientific Publishing . Co. Pet. Ltd.***
- **Koul ,A. C.; Jessup ,J.; Deluca ,D.J.; Elnicky ,C.J.; Nunez ,M.; Washburn ,R.G. and Ghannoum ,M.A.(1998).Ability of eight strains of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* to produce phospholipase .*Am.Soc.Microbiol.*,4: 78-83.**
- **Lewis ,S.; Bain ,J. and Bates ,I. (2001). Practical Hematolgy 9th ed. Chap. 3:19-41.**

- **Memon ,P.D.;Shaw ,C.E. and Blain ,J.A. (1983). Phospholipase B activity in mycelia of Aspergillus niger . *Microbiology letters*, 18:15-18.**
- **Michael ,D.J. (2005). Human Biology . West Vnginia University . Chap:9 .**
- **Moor, C. B.; Walls, C. M. and Denning, D. W. (2000). In vitro activity against *Aspergillus* species in comparison with itraconazole. *Agents Chemother,* 44:441-443.**
- **Nikole ,A.N.; Sandra ,K.L.; Amrita ,B.;Gregory ,P.V. and Frans , A.K. (2006). Hydrolysis of phosphotidylserine – exposing red blood cells by secretory phospholipase A_2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J.Biol. Chem.*, 281:775-781.**
- **Price ,M.F.; Wilkinson ,I.D. and Gentry , L.O.(1982). Plate method for delection of phospholipase activity in *Candida albicans* . *Sabouraudia* , 15:179-185.**
- **Sharon ,C.; Michael , M.; Jin ,Z.Z.; Wright ,L.C. and Sorrell , C. (1996).Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans* : A new virulence factor ? *J. Infections diseases* ., 175:414-420.**
- **Terry K. K., Stedman D.B., Bolon B. & Welsch F. (1996). Effects of 2-Methoxyethanol on Mouse Neurulation . *Teratology*,54:219-229.**
- **Vidotto , V.; Leone, R.; Alessandro , S.; Kuwa, S. and Crisea, G. (1998). Comparison of Phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolated from patients and bird droppings . Mycopathogia. 142: 71-76 .**
- **Vishwanath ,B. S.; Fux , C. A.; Uehlinger , D. E.; Frey , B. M.; Franson , R. C. and Frey , F. J. (1996) . Hemodialysis activates phospholipase A_2 enzyme . *Nephrol. Dial. Transplant.* , 11: 109-116.**
- **Walsh ,C. E.; Dechatelet , L. R.; Chilton , F. H.; Wykle , R. L. and Waite , M. (1983).Mechanism of arachidonic acid release in human polymorphonuclear leukocyte . *Biochim. Biophys. Acta*., 750:32-40.**
- **WHO. (1989).Preventing and controlling iron deficiency anemia through primary health care.**
- **Zaidi , S. N.; Shipstone , A. C. and Garg , N. K. (1978). Effect of phospholipase D on rat kidney mitochondria . *J. Bio. Sci.*, 1:75-82.**

Effect of phospholipase and the fungus which it produced (Aspergillus niger) on the some of blood parameters of male mice (Mus musculus)

Mohammed A. Auda* , Khalid Al-Fartosi , Huda I. Al-Taae****

*** Department of Chemistry , College of Science , University of Thi-Qar , Iraq**

**** Department of Biology , College of Education , University of Thi-Qar , Iraq**

Abstract

The present study included the isolation and identification of phospholipase from *Aspergillus niger* , and then the study of the effect of phospholipase and the fungus which it produced (*Aspergillus niger*) on some blood parameters of male mice.

***A.niger* was isolated from patients with epidermal infection , and then growth on SDA media . The ability of fungus for product of phospholipase was examined by plate assay method under standard condition . The phospholipase was isolated after the growth of fungus on liquid media. The male mice were injected (I. P.) with 0.1 , 0.2 ml / animal /day for 7 days (first stage) and 14 days (second stage) from phospholipase enzyme and then it's effect on some blood parameters were recorded. Other groups of male mice were injected with 0.1 and 0.2 ml /animal with suspension of *A.niger* spores for one time , then after 7 days (first stage) and 14 days (second stage) the some blood parameters were examined .**

The results indicated that the phospholipase and suspension of *A.niger* spores caused a significant reduction in blood parameters (R.B.C. , P.C.V. , Hb and W.B.C.) of male mice .

- This paper is part of M.Sc. thesis .