الاستجابة المناعية في الفئران البيض لأحد متماثلات انزيم بولي امين اوكسيديز ضد الخمج بداء الأكياس العدرية الثانوي.
II. الرد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض

وثبة إدريس توحلة قسم الكيمياء
خولة احمد آل فليح قسم الكيمياء
أسماء عبد العزيز علي قسم علوم الحياة
كلية التربية / جامعة الموصل

الاستلام ٢٠٠٨ / ٠٩ / ٠٧
القبول ٢٠٠٩ / ٠١ / ٠٨

ABSTRACT

Polyamine oxidase activity in cerebrospinal fluid of normal children was determined, it was found that specific activity of crude PAO 64.16 ± 8.18 enzyme unit/mg protein. Partial purification of the enzyme was performed by dialysis and ion exchange chromatography. Two main peaks of high PAO activities were obtained I,II with specific activity of 1201.92 and 1157.22 enzyme unit/mg protein, and with purification fold of 18.17 and 17.50 respectively.

Innate immune response to infection with secondary hydatid disease in BALB/c mice activated by partially purified CSF-PAO with spermine and infected with protoscoleces of *Echinococcus granulosus* was studied. The changes in total and differential leukocyte count shown in mice activated by different concentrations of PAO II 200-1000μg / 10 gm body weight with constant concentration 200 μg Spm, were compared with positive and negative control group, along one month. Changes in leukocytes were followed in activated BALB/c mice with optimum concentration 800 μg/10 gm body weight PAO II with 200 μg Spm compared with positive control group throughout two and three months, depending on the mentioned criteria.

An elevation in the total leukocytes count, expressed by an increase in the number of lymphocytes accompanied by a decrease in the number of neutrophils and monocytes in mice activated with PAO-Spm system, for (one) month, and also in mice activated with optimum concentration of PAO-Spm system, for (tow and three) months, in comparison with the +ve control group.

Therefore, it is concluded that PAO II isolated from CSF with Spm could be considered as an effective stimulator for innate immune response against infection with secondary hydatid disease.

الخلاصة

قدرت فعالية انزيم بولي امين اوكسديز PAO في السائل المخي الشوكي CSF للأطفال الأصحاء . وجد ان الفعالية النوعية لأنزيم PAO الخام ٦٤.١٦ ± ٨.١٨ وحدة انزيمية /ملغم بروتين . نقي الانز يم المذكور تنقية جزئية باستخدام تقنيات الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا التبادل الايوني، حصلنا على قمتين I و II تمتلك كل منهما فعالية عالية لانزيم PAO، بلغت فعاليتهما النوعية ١٢٠١.٩٢ و ١١٥٧.٢٢ وحدة انزيمية / ملغم بروتين، وبعدد مرات تنقية ١٨.١٧ و ١٧.٥٠، على التوالي.

درست الاستجابة المناعية الطبيعية للإصابة بالأكياس العدرية الثانوية في الفئران البيض BALB/c المفعلة بانزيم PAO II المنقى مع السبرمين Spm ، والمخمجة بالرؤيسات الأولية لدودة المشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus*. لوحظت التغيرات في العد الكلي والفروقي لكريات الدم البيض الحاصلة في الفئران البيض المفعلة باستخدام تراكيز مختلفة ٢٠٠-١٠٠٠ مكغم / ١٠غم من وزن الجسم من انزيم PAO II مع تركيز ثابت ٢٠٠ مكغم من Spm، بالمقارنة مع مجاميع السيطرة الموجبة والسالبة طوال فترة شهر واحد . تمت متابعة التغيرات في كريات الدم البيض الحاصلة في الفئران البيض المفعلة بالتركيز الأمثل ٨٠٠ مكغم / ١٠غم من وزن الجسم من PAO II مع ٢٠٠ مكغم من Spm والمخمجة مع مجاميع فئران السيطرة الموجبة، طوال فترة شهرين وثلاثة اشهر، بالاعتماد على نفس المعايير السابقة.

لوحظ ارتفاع في معدل العد الكلي لكر يات الدم البيض من خلال ارتفاع أعداد الخلايا اللمفاوية المصحوب بانخفاض في أعداد الخلايا العدلة ووحيدة النواة في الفئران المفعلة بنظام Spm-PAO على مدى شهر واحد، وأيضاً في الفئران المفعلة بالتركيز الأمثل على مدى شهرين وثلاثة اشهر، بالمقارنة مع فئران السيطرة الموجبة.

وعليه يمكن الاستنتاج من هذه الدراسة بلن المتماثل الثاني لانزيم PAO المستخلص من CSF الأطفال مع السبرمين يمكن ان ينشط الاستجابة المناعية في الفئران البيض ضد الإصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي.

المقدمة

تمثل مركبات البولي امين Polyamine PA مجموعة من المركبات المتواجدة طبيعيا في كل الخلايا الحية. وتعد هذه المركبات ضرورية لنمو ووظيفة الخلايا الطبيعية ، حيث تتفاعل مع جزيئات كبيرة ومتنوعة الكتروستاتيكيا وتساهميا، ونتيجة لهذه التفاعلات يكون لها تأثيرات خلوية متعددة (١)، وينشا عن تثبيط تكوين هذه المركبات إيقاف النمو وبالتالي موت الخلية(٢).

إن السائل المخي الشوكي سائل رائق عديم اللون، تركيبه مماثل لبلازما الدم مع بعض الاختلافات في النسب والمكونات (٣)، كما يحتوي على مركبات متعددة الأمين مثل السبرمين

Spermine Spm ، السبرمدين Spermidine Spd والبترسين Putrusine Put (٤). لوحظ ارتفاع مستويات مركبات متعددة الأمين عن المستوى الطبيعي في CSF المصابين بسرطان الأغشية السحائية (٥). لهذا أصبح لقياس مستوى السبرمين، السبرمدين والبترسين في CSF أهمية في تشخيص وعلاج سرطان الدماغ (٦).

تقوم أنزيمات البولي أمين اوكسيديز Polyamine Oxidases PAO بتحفيز أكسدة وحذف مجاميع الأمين من مركبات متعددة الأمين مثل السبرمين والسبرمدين ومشتقاتهما بألفة عالية، وله ا دور هام في تنظيم مستويات مركبات متعددة الأمين داخل وخارج الخلايا (٧). إذ يتأكسد السبرمين بصورة رئيسية بوساطة بولي امين اوكسيديز إلى السبرمدين والذي يتأكسد بدوره إلى البترسين و β -amino propionaldehyde ، ثم يتأكسد البترسين جزئياً إلى NH_4 و CO_2. إن إنزيم PAO يمكن أن يحفز أكسدة مجموعة الأمين الثانوية لل سبرمين والسبرمدين، وان موقع التحفيز الإنزيمي وطبيعة آلية عمله على مركبات متعددة الأم ين يتغير بالاعتماد على مصدر الإنزيم، ولهذا فان انزيم PAO في بعض أنسجة الحيوان يحول السبرمين والسبرمدين إلى السبرمدين والبترسين، على التوالي، فضلا عن بروبان الديهايد و بيروكسيد الهيدروجين. أما في بعض البكتيريا والنباتات، فان الإنزيم يعمل على الجانب الأخر لمجموعة الأمين الثانوية، لذا فان المركبات الناتجة عن أكسدة السبرمين و السبرمدين هي 3-amino propyl-4-aminobutyraldehyde و4-aminobutyraldehyde، على التوالي (٨).

أوضحت البحوث أهمية تأثير اتزان مركبات متعددة الأمين في الوظائف الطبيعية للجهاز المناعي (٩)، وان ثمة عوامل ذائبة ليست مرتبطة بالأجسام المضادة مسؤولة عن موت الطفيليات داخل الخلايا بدون مساعدة مباشرة من خلايا أخرى، ولهذا فقد بدا محتملاً ان انزيم PAO او احد نواتجه ربما يكون هو العامل الذائب (١٠). لقد عرفت نواتج أكسدة مركبات متعددة الأمين بوساطة انزيم PAO بانها سامة لأنواع مختلفة من الخلايا (١١). حيث تمتلك البلاعم الكبيرة macrophages المنشطة فعالية متزايدة للا نزيم PAO، وانه مسؤول عن الأحداث التي تؤدي إلى قتل الطفيليات (١٢).

تؤدي أكسدة مركبات متعددة الأمين إلى تكوين امينو الديهايد فعال جدا له تأثيرات متنوعة، تتضمن تنظيم وظائف الكريات البيض (١٣)، قتل ديدان طفيلية مختلفة (١٤)، تثبيط إنتاج جذر الأوكسجين الحر والانجذاب الكيمياوي للخلايا العدلة (١٥).

يعد داء المشوكات Echinococcosis من الأمراض الطفيلية القديمة والشائعة في جميع أنحاء العالم، وبضمنها الوطن العربي والعراق (١٦) وهو من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان Cyclo-zoonotic disease (١٧). تعد المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* ، العامل المسبب لداء المشوكات الكيسي Cystic echinococcosis، طفيلا عالمي الانتشار (١٨) ومتوطنا في جميع القارات ، بالمقارنة

مع المشوكات متعددة الحجرات *E.multilocularis*، العامل المسبب لداء المشوكات السنخي Alveolar echinococcosis ، والذي يقع في نصف الكرة ا لشمالي (١٩)، ونظراً للأهمية الطبية والاقتصادية لداء الأكياس العدرية Hydatid disease وانتشاره في كثير من دول العالم فقد أولى الباح ثون والمختصون اهتماماً كبيراً لموضوع معالجة هذا الداء الذي مازال واحدا من اخطر الأمراض الطفيلية القاتلة والصعبة العلاج (٢٠). ونظرا لصعوبة علاج هذا المرض، إذ نجحت معظم الأدوية المستخدمة نجاحاً جزيئاً، فقد اتجه الباحثون حول إمكانية إحداث تعديل مناعي في المضيف بهدف تنشيط مقاومته ضد الإصابة بهذا الطفيل، واستخدموا لهذا الغرض مواداً عديدة عزلت من مصادر مختلفة (٢١-٢٤).

مع ما ذكر أعلاه، فان استخدام الانزيمات كمواد معدلة مناعيا يكاد يكون نادراً ، خاصة بالنسبة لانزيم PAO . واعتماداً على ما أشارت إليه الدراسة السابقة (٢٥-٢٧) من وجود فعالية عالية لانزيم PAO في السائل المخي الشوكي، فقد نجحت دراسة سابقة (٢٨) في استخدام احد متماثلي هذا انزيم PAO كمعدل مناعي ضد الخمج بداء الأكياس العدرية الثانوي في الفئران البيض، المصابة تجريبيا، وكان هذا حافزا لإجراء دراسة مماثلة على المتما ثل الثاني لهذا الانزيم لإمكانية استخدامه كمعدل مناعي ضد نفس المرض، وهذا هو هدف الدراسة الحالية.

المواد وطرائق العمل

عينة السائل المخي الشوكي

جمعت عينات CSF من الأطفال الأصحاء من مختبرات مستشفى ابن سينا التعليمي في الموصل بواقع ١٥ عينة وبمعدل ٠.٥-١ مل للعينة الواحدة.

تقدير كمية البروتين في CSF

استخدمت طريقة Lowrey المعدلة (٢٩،٣٠) في تقدير كمية البروتين في عينات CSF.

قياس فعالية أنزيم PAO

قيست فعالية أنزيم PAO بالاعتماد على طريقة Flayeh (٣١) والمحورة من قبل Dahel (٣٢)، واستخدمت الظروف المثالية التي يعمل عليها انزيم PAO في CSF والمثبتة Al-Katib من قبل (٢٥).

التنقية الجزئية لانزيم PAO

تمت التنقية الجزئية لأ نزيم PAO من CSF الأطفال باستخدام الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose، على التوالي (٣٣).

الحيوانات المختبرية

استخدمت الفئران البيض سلالة BALB/c في تجارب البحث وقد تم الحصول عليها من غرفة تربية الحيوانات التابعة لقسم علوم الحياة / كلية التربية.

الأكياس العدرية

عزلت الأكياس العدرية من أكباد الأغنام المذبوحة من الجزارين في مدينة الموصل . وجمعت الرؤيسات الأولية حسب طريقة Smyth (٣٤) وتم تقدير حيويتها حسب طريقة Smyth & Barett (٣٥)، واستخدمت الرؤيسات الأولية التي بلغت حيويتها ٩٦% فأكثر وحقنت الفئران في التجويف البريتوني بـ ٢٠٠٠ رؤيس اولي تقريباً والتي تم حسابها حسب طريقة Wangoo وجماعته (٣٦).

تصميم التجارب

لدراسة تأثير انزيم PAO II على الامراضية التي تنتج عن الخمج بالأكياس العدرية في الفئران، قسمت مجاميع الفئران على ثلاث تجارب:

التجربة الأولى: حقن ٢٥ فأرا داخل الخلب بتركيز 200 مكغم /١٠غم من وزن الجسم بالسبرمين مضافاً اليها تراكيز مختلفة (800,600,400,200, ١٠٠٠ مكغم/١٠غم من وزن الجسم) من أنزيم PAO II المستحصل من القمة الثانية من عملية التبادل ألايوني. خمجت الفئران بما يقرب من ٢٠٠٠ رؤيس اولي حي /فار بعد يوم واحد من التفعيل، وخمجت ٥ فئران بالعدد نفسه من الرؤيسات الأولية فقط كمجموعة سيطرة موجبة . استخدمت ٥ فئران كمجموعة سيطرة سالبة ، شرحت الفئران جميعها بعد شهر من احداث الخمج. حدد التركيز الأمثل للانزيم من هذه التجربة لاجراء التجارب اللاحقة.

التجربة الثانية : حقنت ٥ فئران بالتركيز الأمثل من أنزيم PAO II مع السبرمين، وبعد ثلاثة أيام من التفعيل خمجت الفئران بالعدد نفسه من الرؤيسات الأولية الحية.

التجربة الثالثة : حقنت ٥ فئران بالتركيز الأمثل من أنزيم PAO II مع السبرمين وبجرعتين متتاليتين بينهما ٧٢ ساعة، خمجت الفئران بالعدد نفسه من الرؤيسات الأولية بعد ٦ أيام من التفعيل الأولي. في كلا التجربتين كان هناك مجموعة سيطرة سالبة وأخرى موجبة . شرحت الفئران جميعها بعد شهرين و ثلاثة اشهر من إحداث الخمج.

المعايير المختارة للدراسة

الدم

خدرت الفئران باستخدام الايثر Diethyl ether، سحب الدم من العين باستخدام أنبوبة

شعرية وفق طريقة Waynforth (٣٧). جمع الدم في أنابيب حاوية على مانع التخثر EDTA، حيث حسب العد التفريقي لكريات الدم البيض، و تم مباشرة حساب العد الكلي لكريات الدم البيض Total count حسب المعادلة التالية (٣٨):

عدد الخلايا في المربعات الأربع الكبيرة x ٥٠ = عدد الخلايا / مل واحد من الدم

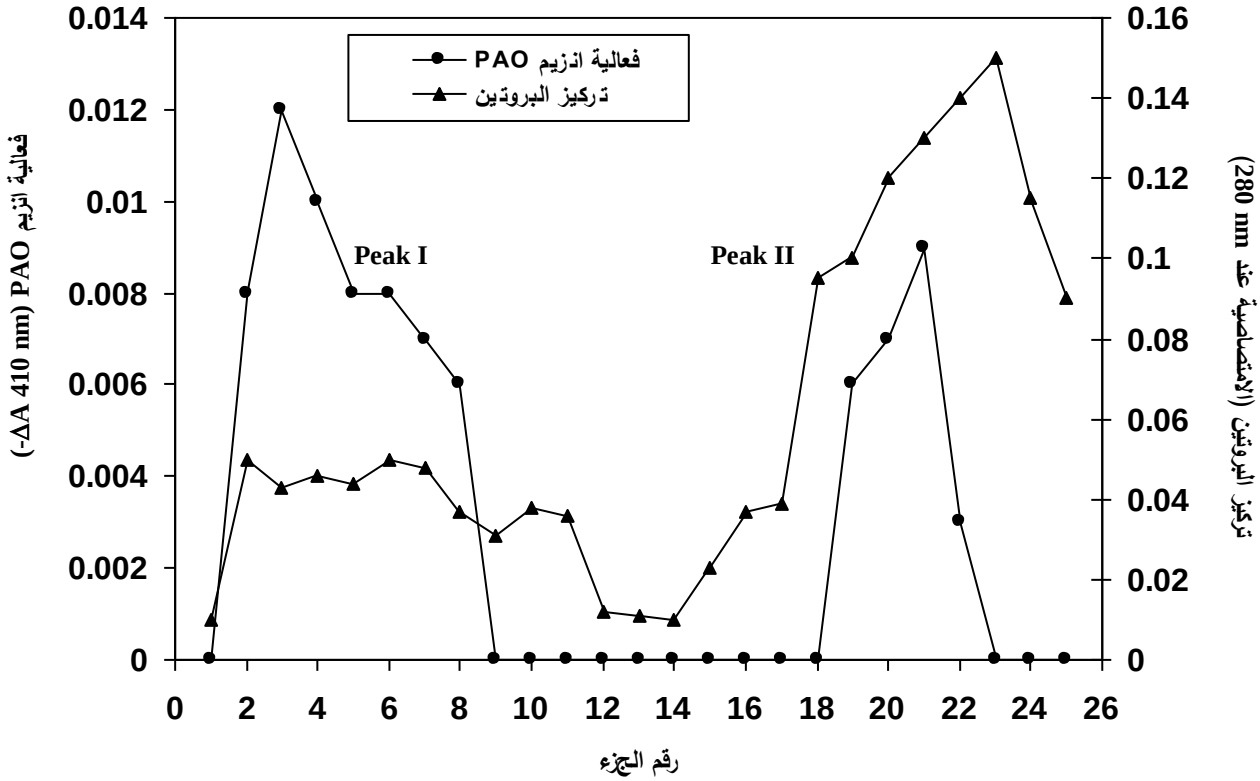
التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج باستخدام اختبار t (٣٩) لتحديد الفروقات بين حيوانات السيطرة الموجبة والسيطرة السالبة من جهة، وبين الحيوانات المعاملة وحيوانات السيطرة الموجبة من جهة أخرى.

النتائج

تحديد مستوى فعالية انزيم PAO في CSF

ارتفعت الفعالية النوعية لانزيم PAO حسب خطوات التنقية ما بين الانزيم الخام، والفرز الغشائي والتبادل الأيوني (الشكل ١ والجدول ١).



الشكل (١): نموذج الروغان المستحصل من تنقية إنزيم PAO من CSF بوساطة التبادل ألايوني

الجدول (١): خطوات تنقية إنزيم PAO من CSF الأطفال الأصحاء

خطوات تنقية CSF	الحجم الكلي (مل)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية الانزيمية (وحدة انزيمية/مل)	الفعالية الانزيمية الكلية (وحدة انزيمية)*	الفعالية النوعية (وحدة انزيمية/ملغم	عدد مرات التنقية	استرجاع الفعالية %

		بروتين)					
الانزيم الخام	٩.٠	٥.٦٧	٤١.٦٦	٣٧٤.٩٤	٦٦.١٢	–	١٠٠
الفرز الغشائي	٨.٥	٤.٢٠	٧٢.٩٠	٦١٩.٦٥	١٤٧.٥٣	٢.٢٣	١٦٥.٢٦
التبادل الايوني							
peak I	٣٥	٠.٩١	٣١.٢٥	١٠٩٣.٧٥	١٢٠١.٩٢	١٨.١٧	٢٩١.٧١
peak II	٢٠	٠.٧٢	٤١.٦٦	٨٣٣.٢٠	١١٥٧.٢٢	١٧.٥٠	٢٢٢.٢٢

- **الوحدة الإنزيمية U تشير إلى كمية الإنزيم التي تؤكسد مايكرومول واحد من المادة الأساس السبرمين في الدقيقة الواحدة.**

تأثير نظام Spm–PAO في الخمج التجريبي بالرؤيسات الأولية في الفئران البيض

درس تأثير نظام Spm–PAO في الخمج التجريبي بالرؤيسات الأولية في الفئران البيض، وفيما يلي نتائج هذه الدراسة:

معدلات العد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض باستخدام جرعات PAO مختلفة التركيز

أظهرت مجموعة السيطرة الموجبة انخفاضا معنويا عاليا ($P<0.001$) في معدل العد الكلي للكريات البيض مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة السالبة . أما العد التفـويقي لكريات الدم البيض فقد أظهرت مجموعة السيطرة الموجبة ارتفاعاً معنوياً عالياً ($P<0.001$) في عدد الخلايا اللمفاوية ، وانخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) في معدل الخلايا العدلة وانخفاضاً غير معنوي في معدل الخلايا وحيدة النواة، مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة السالبة (الجدول ٢).

ويوضح هذا الجدول حدوث ارتفاع معنوي ع ال ($P<0.001$) في معدل العد الكلي للكريات البيض في الفئران المفعلة بنظام Spm–PAO مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة الموجبة، بلغ أقصاه عند التركيز ٨٠٠ مكغم. أما فيما يتعلق بالعد التفـويقي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة بنظام Spm–PAO، فقد أظهرت الخلايا اللمفاو ية عند التركيز ٨٠٠ مكغم أقصى معدل، وبفوق معنوي ($P<0.05$)، واظهر التركيز ٤٠٠ مكغم انخفاضا ضئيلا غير معنوي، في حين أظهرت بقية التراكيز ارتفاعاً غير معنوي ، مقارنة بم عدل مجموعة السيطرة الموجبة.

لوحظ حدوث انخفاض في معدل الخلايا العدلة مقارنة بـنظيره في مجموعة السيطرة الموجبة، بلغ أدناه عند التركيز ٨٠٠ مكغم، وبفرق معنوي ($P < 0.05$)، أما التركيز ٢٠٠ مكغم فقد اظهر ارتفاعا غير معنوي، في حين أظهرت بقية التراكيز انخفاضا غير معنوي.

أظهرت الخلايا وحيدة النواة انخفاضا في معدلاتها مقارنة بـنظيراتها في مجموعة السيطرة الموجبة وبفروقات مختلفة، وكان أعلى انخفاض عند التركيز ٨٠٠ مكغم.

اختيار التركيز الامثل لانزيم PAO

تم اختيار التركيز الأمثل لانزيم PAO في الدراسة الحالية حيث وجد ان ا مثل تركيز لانزيم PAO كان ٨٠٠ مكغم مع ٢٠٠ مكغم من السبرمين، وعليه فقد استخدم كمعدل مناعي في الفئران المخمجة في التجارب اللاحقة.

الجدول(٢): التغيرات الحاصلة في معدلات العد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة باستخدام تراكيز مختلفة من انزيم PAO مع تركيز ثابت من مادة الأساس Spm، وبجرعة واحدة قبل ٢٤ ساعة من الخمج لمدة شهر واحد

التراكيز (مكغم)		العد الكلي لكريات الدم البيض	معدل العد التفريقي لكريات الدم البيض		
PAO	Spm		Lymphocytes %	Neutrophils %	Monocytes %
٢٠٠	٢٠٠	٥٥٢٠ ****±٢١٦.٨	٨٢.٨ ±٢.٣٨	١٤.٢±٢.٥٨	٢.٠±*١.٠
٤٠٠	٢٠٠	٤٤٣٠****±١٧١.٨	٨٢.٠ ±٢.٩١	١٢.٦±٢.٣٠	٣.٤±١.٦٧
٦٠٠	٢٠٠	٤١٦٠****±٦٥.٢	٨٣.٠ ± ٢.٢٣	١٢.٥±٣.٧٠	٣.٢ ±١.٧٩
٨٠٠	٢٠٠	٦٧٣٠****±٢٩٧.٠	٨٧.٠ ±*٣.٥٣	١٠.٢ ±*٢.٧٩	١.٣±**٠.٨٩
١٠٠٠	٢٠٠	٥٣٠٠****±٢١٢.١	٨٥.٠ ±٤.٤٩	١١.٨±٣.٣٩	٢.٠ ± ١.٣٠
C–		٥١٠٠****±٦٩٦.٤	٧٨.٤ ****±٠.٨٩	١٥.٦ ±*١.٨١	٤.٦±١.٥٨
C+		٢٥٠٠±٧٩.٠	٨١.٩ ±٠.٨٣	١٤.٠±١.٣٠	٣.٢±٠.٨٩

- **C** فئران السيطرة السالبة ، **C+** فئران السيطرة الموجبة.

* الفروق معنوية عند (P<0.05) ، ** الفروق معنوية عند (P<0.01)

*** الفروق معنوية عند (P<0.005)، **** الفروق معنوية عند (P<0.001)

تشير الأرقام في الجدول إلى المعدل (لخمس مكررات) ± الانحراف القياسي.

معدلات العد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض باستخدام التركيز الامثل لانزيم PAO

يوضح الجدول (٣) حدوث ارتفاع معنوي (P<0.01) في معدل عدد كريات الدم البيض في مجموعة السيطرة الموجبة مقارنة بنظيره في مجموعة السيطرة السالبة، وارتفع معدل العد الكلي لكريات الدم البيض في المجموعة المفعلة ارتفاعا معنويا عاليا (P<0.001) مقارنة بنظيره في مجموعة السيطرة الموجبة.

أما بالنسبة للعد التفريقي لكريات الدم البيض فقد أظهرت الخلايا اللمفاوية ارتفاعاً معنوياً (P<0.01) في مجموعة السيطرة الموجبة مقارنة بمجموعة السيطرة السالب ة، وأظهرت ارتفاعاً معنوياً (P<0.001) في الفئران المفعلة مقارنة بفئران السيطرة الموجبة . لوحظ وجود انخفاض معنوي عال (P<0.001) للخلايا العدلة في فئران مجموعة السيطرة الموجبة مقارنة بنظيراتها في مجموعة السيطرة السالبة ، والتي بدورها أظهرت انخفاضاً معنوياً (P<0.01) في الفئران المفعلة مقارنة بنظيراتها في مجموعة السيطرة الموجبة . كذلك انخفضت الخلايا وحيدة النواة في مجموعة السيطرة الموجبة انخفاضاً غير معنوي مقارنة بـفظيراتها في مجموعة السيطرة السالبة ، في حين

أظهرت الفئران المفعلة ا نخفاضا معنويا (P<0.01) مقارنة بنظيرا تها في مجموعة السيطرة الموجبة.

يبين الجدول (٤) حدوث اختلاف غير معنوي في معدل أعداد كريات الدم البيض بين مجموعة السيطرة الموجبة والسيطرة السالبة، وحدوث ارتفلع معنوي (P<0.005) في الفئران المفعلة مقارنة بمجموعة نظيره في مجموعة السيطرة الموجبة.

بالنسبة لحسا ب العد التفريقي لكريات الدم البيض فقد أظهرت الخلايا اللمفاوية ارتفاعا معنويا عاليا (P<0.001) بين معدلات مجموعة السيطرة الموجبة ونظيراتها في السيطرة السالبة ، وأيضاً ارتفاعاً معنوياً (P<0.001) في الفئران المفعلة مقارنة بنظيراتها في مجموعة السيطرة الموجبة . أم ا بالنسبة للخلايا العدلة فقد حدث انخفاض معنوي عال (P<0.001) بين معدلات مجموعة السيطرة الموجبة ونظيراتها في السيطرة السالبة ، رافقه انخفاض معنوي (P<0.001) في المجموعة المفعلة مقارنة بنظيره في مجموعة السيطرة الموجبة . أما بالنسبة للخلايا وحيدة النواة فقد حدث اختلاف ضئيل جدا في السيطرة الموجبة مقارنة بنظيره في السيطرة السالبة ، وكان هناك انخفلض غير معنوي في المجموعة المفعلة مقارنة بنظيره في مجموعة السيطرة الموجبة.

الجدول(٣): التغيرات الحاصلة في معدلات العد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة بالتركيز الامثل من انزيم PAO مع مادة الاساس Spm، وبجرعة واحدة قبل ٧٢ ساعة من الخمج لمدة شهرين

التركيز (مكغم)		العد الكلي لكريات الدم البيض	معدل العد التفريقي لكريات الدم البيض		
PAO	Spm		Lymphocytes %	Neutrophils %	Monocytes %
٨٠٠	200	١٨٧.١±٧١٥٠****	٢.٩±٨١.٣****	٢.٦٠±١٧.٢**	٠.٤٤±١.٠**
C-		٢٨.٠٣±٤٠٧٠**	٣.٣٩±٦٥.٠ **	١.٩٢±٢٧.٠****	١.٩٢±٧.١
C +		٥٥٤.٨٠±٥٢٢٥	٢.٣٨±٧١.٨	١.٣٠±٢٠.٨	١.٦٧±٦.٢

الجدول (٤) : التغيرات الحاصلة في معدلات العد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة بالتركيز الأمثل من انزيم PAO مع مادة الأساس Spm، وبجرعتين (كل ٧٢ ساعة) قبل ستة أيام من الخمج لمدة ثلاثة اشهر

التركيز (مكغم)		العد الكلي لكريات الدم البيض	معدل العد التفريقي لكريات الدم البيض		
PAO	Spm		Lymphocytes %	Neutrophils %	Monocytes %
٨٠٠	200	١٥٨.٣±٦٦٠٣***	١.٩٢±٨٢.٨****	٣.٠٨±٩.٠**	٢.١٦±٧.٢
C-		١٩٤.٧٢±٤٠١٧	٣.١٦±٦٠.٠****	٤.٢٧±٢٨.٩****	٣.٤٣±٩.٦
C +		٧ ٧٥.٢٥±٤٤٨٢	٢.٤٠±٧٥.٦	٢.٤٠±١٤.٤	1.58 ±9.0

المناقشة

لوحظ في الدراسة الحالية ظهور قمتين متميزتين لإنزيم PAO بعد تنقيته من CSF الأطفال الأصحاء وهو نفس ما لاحظته Al-Katib (٢٥) باستخدام التبادل ألايوني أيضاً. ان ظهور قمتين متميزتين تمتلك كل منها فعالية عالية نسبياً ، لإنزيم PAO، في دراستنا ، يشير إلى وجود هذا الأنزيم بشكل متماثلات وهذا مابينه الباحثون Cervelli وجماعته (٤٠) حيث تم تشخيص متماثلات لإنزيم PAO مميزة في الهيئات التركيبية والمواقع الخلوية، كما تم تشخيص الجينات الوراثية لهذه المتماثلات (41). ان الوظائف المهمة المعينة التي تلعبها مركبات PA في نسيج معين يعتمد ، لحد ما ، على نمط الايض لهذه المركبات (42)، حيث ان إنزيم PAO يعمل على التنظيم الدقيق لتركيز مركبات متعدد ة الامين، وفي الوقت نفسه يعمل على التحكم بتركيز ونوع نواتج الأكسدة لهذه المركبات اعتمادا على الآلية الخاصة به، الأمر الذي يفسر أهمية تواجد إنزيم PAO بمتماثلات مختلفة (43).

يمكن أن تعزى الزيادة الحاصلة في العد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة بنظا م Spm−PAO ولجميع التراكيز المستخدمة من إنزيم PAO، مقارنة بفئران السيطرة الموجبة، إلى دور البروتين PAO بحد ذاته كمعدل مناعي، إذ قد يؤدي إلى إفراز المونوكينات Monokines التي تساعد على تكاثر الخلايا اللمفية، وهو ماعزاه الباحثن السابقون (للمصادر انظر ٢٢،٢١) عند استخدامهم السكر المتعدد المستخلص من بكتريا *Rhizobium* ومن الفطر *Aureobasidium pullulans* ، على التوالي، فضلاً عن مواد أخرى مستخلصة من مصادر مختلفة، كمعدلات مناعية، أو قد تعزى الزيادة الحاصلة في العد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة إلى دور النواتج السمية لفعالية هذا الانزيم، فقد تكون هذه جزءا مكملا للفعالية المنظمة للخلايا البلعمية (٤٤). وان الامينوالدهايد الفعال جدا والناتج من أكسدة مركبات متعددة الامين بوساطة انزيم PAO يمكن ان يكون له تأثير في تنظيم وظائف كريات الدم البيض (١٣). ويمكن تفسيره الى كون المادة الممنعة قد أحدثت زيادة معنوية في معدل مدة حياة الخلايا اللمفاوية المفعلة . جاءت نتائجنا موافقة لما توصل اليه باحثون سابقون (٢٨،٢٤،٢٣) عند استخدامهم معدلات مناعية مختلفة ضد داء الأكياس العدرية الثانوي.

أظهرت مجموعة السيطرة الموجبة انخفاضا في العد الكلي لكريات الدم البيض مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة ، بعد مرور شهر من الخمج، وذلك بسبب ارتشاح الكريات وهجرتها إلى مواقع الخمج لغرض السيطرة على نمو وتطور الأكياس العدرية (٤٥). أكد ذلك Du and Ali-Khan (٤٦) إذ أوضحا عدم حدوث زيادة في عدد كريات الدم البيض في الفئران المخمجة بالمشوكة متعددة الحجرات، كما أشير إلى ذلك أيضاً بالنسبة للمشوكات الحبيبية (٢٨،٢٢)، في حين لوحظ من نتائج البحث الحالي حدوث زيادة في العدد الكلي لكريات الدم البيض في السيطرة

الموجبة مقارنة بالسالبة، بعد مرور شهرين وثلاثة اشهر من الخمج، وقد تم تسجيل الزيادة نفسها في الفئران المخمجة من قبل باحثين آخرين (٤٧). ان سبب الارتفاع يمكن ان يعزى إلى الوجود المستمر للطفيلي داخل الجسم (٤٨).

إن الارتفاع في نسب أعداد الخلايا اللمفاوية في الفئران المفعلة بنظام Spm−PAO صاحبه انخفاض في نسب أعداد الخلايا العدلة وأعداد الخلايا وحيدة النواة مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة ، ولم يلحظ وجود الخلايا الحمضة في كل من الفئران المفعلة بنظام PAO− Spm او في فئران السيطرة المخمجة لانه في حالات الإصابة يحدث ارتشاح للخلايا الحمضة إلى مناطق الإصابة لانها تعتبر من الخلايا البلعمية كجزء من الجهاز البلعمي النخاعي (٤٩) والذي يشمل الخلايا العدلة، الحمضة والقعدة إضافة إلى ذلك فان إعطاء مادة PAO كمادة منشطة مناعياً قد حفزت هجرة هذه الخلايا . ان زيادة الخلايا اللمفاوية هنا تتفق مع ما وجده Reuben وجماعته (٥٠) عند تفعيل بلاعم الخلب Peritoneal macrophages(PQ) بوساطة لقاح BCG، ومع ما وجده باحثون سابقون (٢٣،٢٤،٢٨) عند استخدامهم معدلات مناعية مختلفة ومن مصادر مختلفة . وان الانخفاض في أعداد الخلايا اللمفاوية التي أظهرته فئران السيطرة الموجبة مقارنة بالفئران المفعلة كان مماثلا لما وجده Du and Ali-Khan (٤٦) في الفئران المخمجة بالرؤيسات الأولية للمشوكة متعددة الحجرات. لوحظ أيضاً في فئران السيطرة الموجبة زيادة في أعداد الخلايا اللمفاوية مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة، حيث ان الوجود المستمر للأكياس العدرية في جسم الفئران يعني استمرار التحفيز ببقاء مستضدات الطفيل (٤٨).

أما فيما يتعلق بالخلايا العدلة، فيعزى انخفاض أعدادها في الفئران المفعلة بنظام Spm−PAO إلى قدرة هذا الإنزيم على تحفيز هجرتها إلى مواقع الطفيل والقضاء عليه بعملية البلعمة، حيث أنها تمثل جزءا من الجهاز البلعمي النخاعي Myeloid phagocytic system (٤٩). كما لوحظ حدوث انخفاض غير معنوي في أعداد الخلايا العدلة والذي استمر لمدة ٦٠ يوما بعد الخمج بالمشوكات متعددة الحجرات، وأكد Al-Karmi and Behbehani (٥١) نزوح هذه الخلايا إلى مواقع الطفيل مما أدى إلى انخفاض أعدادها.

بالنسبة للخلايا وحيدة النواة فقد لوحظ انخفاض معدلها في الفئران المفعلة مقارنة بالسيطرة الموجبة والتي بدورها انخفضت مقارنة بالسيطرة السالبة . وقد يعزى سبب قلة أو انخفاض أعداد كريات الدم وحيدة النواة إلى هجرتها من الدم إلى مواقع الإصابة وتحولها إلى بلاعم (٥٢) بتأثير المعدل المناعي، إذ تمثل هذه الخلايا المصدر الرئيسي للبلاعم الكبيرة بوصفها جزءا من الجهاز البلعمي أحادي النواة Mononuclear phagocytic system (٤٩) وبذلك فهي تمثل الجزء الأكبر من جهاز الدفاع غير النوعي للمضيف . في حين تقل عملية انجذاب الخلايا وحيدة النواة إلى مواقع الخمج في فئران السيطرة السالبة (٥١).

يتضح من دراستنا الحالية ان المتماثل الثاني لانزيم PAO المستخلص من CSF مع السبرمين يمكن ان ينشط ا لاستجابة المناعية الطبيعية في الفئران البيض ضد الإصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي.

المصادر

1. Wallace H. M., Fraser A. V. and Hughes A., Biochem J., 376:1-14 (2003).
2. Aziz S. M., Gillespie M. N., Crooks P. A., Tofiq S. F., Tsuboi C. P., Olson J. W. and Gosland M. P., J. Pharmacol Exp. Ther., 278:185-192(1996).
3. Watson M. A. and Scott M. G., Clin. Chem., 41(3): 343- 360 (1995).
4. Kermzner L. T., Duffy P. E., Defendini R. F. and Terrano M. J., Exc. Med., 193:242 (1969).
5. Risetti U. and Mancini G., Acta. Neurol., 8:911-915 (1953).
6. Marton L. J., Edwards M. S., Levin V. A., Lubich A. and Wilson B., Cancer Res., 39:993-997 (1979).
7. Seiler N., "Structure and function of amine oxidases" Mondovi B. eds., CRC Press, Boca Roton F.L. (1985).
8. Seiler N., Prog Brain Res., 106:333-344 (1995).
9. Seiler N., "Polyamines in health and nutrition" Bardocz S., White A. Eds., Klumer, Dordrecht, 65-76 (1999).
10. Clark I. A., Cox F. E. G. and Allison A. C., Parasitol., 74:9-17 (1977).
11. Tabor H. and Tabor C. W., Pharmacol. Rev., 16:245-300 (1964).
12. Morgan D. M. L., Christensen J. R. and Allison A. C., Biochem. Soc. Trans., 9:563-564 (1981).
13. Ferrante A., Storer R. J. and Cleland L. J., Clin. Exp. Immunol., 80:373-375 (1990).
14. Ferrante A., Ljungstrom I., Rzepczyk C. M. and Morgan D. M. L. Infect. Immun., 53(3):606-610 (1986a).
15. Ferrante A., Maxwell G. M., Rencis V. O., Allison A. C. and Morgan D. M. L., Int. J. Immunopharmacol., 8:411 (1986b).
16. Jumaa H. I., Al-Kennany E. R., Al-Hayali F. Q., Iraqi J. Vet. Sci., 14(1):39-56 (2001).

17. Eckert J. and Deplazes P., Clin. Microbiol. Rev., 17(1):107-135 (2004).

18. Zhang W., Li J. and McManus D. P., Clin. Microbiol. Rev., 16(1):18-36 (2003).

19. Liance M., Janin V., Bresson-Hadni S., Vuitton D. A., Houin R. and Piarroux R., J, Clin, Microbiol, 38(10):3718-3721 (2000).

20. Blanton R. E. Options in Infect. Dis., 3:327-332 (2001).

21. Al-Taei A. F. M., PhD Thesis, College of Science, University Al-Mustansiriya (1996). (In Arabic)

22. Ali A. A. and Salih N. E., Riv. Parassitol., XVII (LXI), 3:333-39 (2000).

23. Ali A. A. and Abdulla I. T., Riv., Parassitol., XXI (LXV), 1:11–16 (2004).

24. Al-Mutaywiti S. S. Y. MSc Thesis, College of Education, University of Mosul (2005) .(In Arabic)

25. AL-Katib S. M. Y., PhD Thesis, College of Education, University of Mosul (2000). (In Arabic)

26. Mekha L. A. M., MSc. Thesis, College of Education, University of Mosul (2002). (In Arabic)

27. Al-Abbasy O. Y. M., MSc Thesis, College of Education, University of Mosul (2003) .(In Arabic)

28. Tohala W. I. A, PhD Thesis, College of Education, University of Mosul (2006). (In Arabic)

29. Lowrey O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J., J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951).

30. Scharcterle G. R. and Pollack R. L., Anal. Biochem., 51:654-655 (1973).

31. Flayeh K. A., Clin. Chem., 34: 401-403 (1988).

32. Dahel K. A. D., MSc Thesis, College of Education, University of Mosul (1995). (In Arabic)

33. Clark J. M. and Switzer R. L., "Experimental Biochemistry" 2nd Ed. Freeman W. H. Company, San Francisco (1976).

34. Smyth J.D., "*In vitro* culture of *Echinococcus spp*". Proc. 13th Ed. Int. Cong. Hydit., Madrid (1985).

35. Smyth J. D. and Barett N. G., Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74:649-652 (1980).

36. Wangoo A., Ganguly N. K. and Mahajan R. C., Indian J. Med. Res., 89:40-42 (1989).

37. Waynforth H. B., "Experimental and surgical technique in the rat" Academic press Inc. London LTD NWI, (1980).

38. Dacie J. V. and Lewis S. M., "Parasitical hematology" 6th Ed., Churchill Livingstone Publication, (1986).

39. Bruning J. L. and Kintz B. L., "Computational handbook of statistics" 2nd Ed. Scott Foresman Company, Gleriew, (1977).

40. Cervelli M., Cona A., Angelini R., Pdticelli F., Federico R. and Mariottini P., Eur. J. Biochem., 268(13): 3816-3830 (2001).

41. Murray-Stewart T., Wang Y., Devereux W. and Casero Jr. R. A., Biochem. J., 368:673-677 (2002).

42. Sessa A. and Perin A., Clin. Exp. Res., 21(2): 318-325 (1997).

43. Mondovi B., "Structure and functions of amine oxidases" Mondovi B. Ed, CRC Press, Boca Raton FL, (1985).

44. Seiler N., Moulinoux J. P., Havouis R. and Toujas L., Biochem. Cell Biol., 73(5-6): 275-281 (1995).

45. AL-Kannany E. R., MSc Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad (1988).

46. Du T. and Ali-Khan Z., J. Exp. Pathol., 71: 313-335 (1990).

47. Riley E. M., Dixon J. B., Jenkins P. and Ross G., Parasitol, 92: 391-403 (1986).

48. Gottstein B. and Felleisen R., Parasitol. Today, 11(9): 320-326 (1995).

49. Roitt I., Brostoff J. and Male D., "Immunology" 6th Ed., Harcourt Publishers Limited, UK (2001).

50. Reuben J. M., Tanner C. E. and Rau M. E., Infect. Immun., 21:135-139 (1978).

51. Al-Karmi T. and Behbehani K., Exp. Parasitol., 69: 16-22 (1989).

52. Davis D. E. and Lioyed J. B., J. Immunol. Methods, 118: 9-16 (1989).