الاستجابة المناعية في الفئران البيض لاحد متماثلات انزيم بولي امين اوكسيديز ضد الخمج بداء الاكياس العدرية الثانوي.III. معامل البلعمة وفرط الحساسية المتأخر

وثبة ادريس توحلة[1] و خولة احمد آل فليح[2] و اسماء عبد العزيز علي[2]

[1] *قسم الكيمياء ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق*

[2] *قسم الكيمياء ، كلية التربية للبنات ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق*

(تاريخ الاستلام: ٣ / ٤ /٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ١٥ / ١٢ / ٢٠٠٨)

الملخص

قدرت فعالية انزيم بولي امين اوكسديز PA Polyamine oxidase في السائل المخي الشوكي CSF Cerebrospinal للاطفال الاصحاء. وجد ان الفعالية النوعية لانزيم PAO الخام (٦٤,١٦ ± ٨,١٨) وحدة انزيمية/ملغم بروتين. نقي الانزيم 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 استجابة الجهاز المناعي للاصابة بالاكياس العدرية الثانوية في الفئران البيض BALB/c المفعلة بانزيم PAO (II) المنقى مع السبرمين (Spm) والمخمجة بالرؤيسات الاولية لدودة المشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus*. لوحظت التغيرات المرضية الحاصلة في الفئران البيض المفعلة باستخدام تراكيز مختلفة (٢٠٠–١٠٠٠ مكغم) من انزيم PAO (II) مع تركيز ثابت (٢٠٠ مكغم) من Spm، بالمقارنة مع مجاميع السيطرة الموجبة والسالبة طوال فترة شهر واحد بالاعتماد على دراسة الاستجابة المناعية غير النوعية والنوعية المتمثلة بالتغيرات الحاصلة في معدل معامل البلعمة وفرط الحساسية المتأخر، على التوالي. تمت متابعة التغيرات المرضية الحاصلة في الفئران البيض المفعلة بالتركيز الامثل (٨٠٠ مكغم من PAO (II) مع ٢٠٠ مكغم من Spm) والمخمجة مع مجاميع فئران السيطرة الموجبة، طوال فترة شهرين وثلاثة اشهر، بالاعتماد على نفس المعايير السابقة.

حدثت زيادة في الاستجابة المناعية غير النوعية (الطبيعية) والنوعية (الخلوية) متمثلة بالزيادة في معدلات معامل البلعمة وسمك وسادة القدم، على التوالي، في الفئران المفعلة بنظام PAO-Spm على مدى شهر، شهرين وثلاثة اشهر، بالمقارنة مع فئران السيطرة الموجبة.

يتضح من هذه الدراسة ان المتماثل الثاني لانزيم PAO المستخلص من CSF الاطفال مع السبرمين يعمل معدلا مناعيا مؤثرا ضد الاصابة بداء الاكياس العدرية الثانوي.

الكلمات المفتاحية: انزيم بولي امين اوكسيديز، داء الاكياس العدرية الثانوي، معامل البلعمة، فرط الحساسية المتأخر

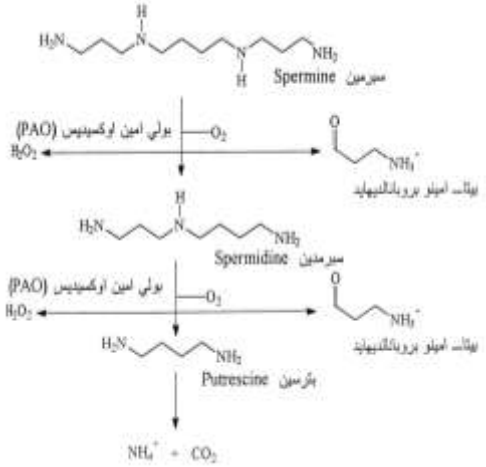
المقدمة

مركبات متعددة الأمين PA Polyamine مركبات عضوية متعددة الشحنة الموجبة، تحوي مجاميع أمينية تتأين جميعها عند الـ pH الفسيولوجية، وهي منتشرة في خلايا الكائن الحي كافة (١). تلعب هذه المركبات دورا أساسيا في العمليات الحياتية على مدى واسع بضمنها نمو وتمايز الخلايا (٢) وتشارك في تنظيم دورة حياة الخلية (٣). وينشا عن تثبيط تكوين PA إيقاف النمو وبالتالي موت الخلية (٤).

إن CSF سائل رائق عديم اللون، تركيبه مماثل لبلازما الدم مع بعض الاختلافات في النسب والمكونات (٥)، كما يحتوي على مركبات متعددة الأمين مثل السبرمين Spm Spermine ، السبرمدين Spermidine Spd والبترسين Put Putrescine (٦). ان معظم الأمينات التي تقوم بدور المراسلات العصبية في النظام العصبي المركزي Central CNS nervous system

ومركبات PA لها دور مهما في امراض الجهاز العصبي مثل الأورام وتحطم خلايا الدماغ (٧). لهذا أصبح لقياس مستوى Spm, Put و Spd في الـ CSF أهمية في تشخيص وعلاج سرطان الدماغ (٨).

تقوم أنزيمات PAO بتحفيز أكسدة وحذف مجاميع الأمين من مركبات متعددة الأمين مثل Spm و Spd ومشتقاتهما بألفة عالية، ولها دور هام في تنظيم مستويات مركبات PA داخل وخارج الخلايا (٩)، إذ يتأكسد Spm بصورة رئيسية بوساطة PAO إلى Spd والذي يتأكسد بدوره إلى Put و β -amino propionaldehyde ، ثم يتأكسد Put جزئيا إلى NH_4 و CO_2. وان موقع التحفيز الإنزيمي وطبيعة الية عمله على مركبات الـ PA يتغير بالاعتماد على مصدر الإنزيم (١٠). أن متماثلات إنزيم PAO المختلفة يمكن أن تمتلك دورا مباشرا في توازن مركبات PA وهي مهمة كثيرا في استجابة الأورام المتنوعة للأدوية التي هي من مشابهات الـ PA (١١).



اوضحت البحوث أهمية تاثير اتزان مركبات PA في الوظائف الطبيعية للجهاز المناعي (١٢). عرفت نواتج اكسدة الـ PA بوساطة PAO بانها

سامة لانواع مختلفة من الخلايا (١٣). وجد ان طفيليات تريبانوسوما (١٤) قتلت بسرعة عند تحضينها مع PAO او مع المصول الحاوية على PAO و PA، وقد اقترح بان نظام (PA-PA0) له علاقة خاصة بالميكانيكيات القاتلة غير النوعية لطفيليات التريبانوسوما التي تصيب المجترات، وبصورة عامة فان لهذا النظام اهمية اكثر لان فعالية انزيمات PAO ربما ترتفع خلال بعض الاصابات في الحيوانات غير المجترة، وخلال الحمل في الانسان، حيث تمتلك البلاعم الكبيرة macrophages المنشطة فعالية متزايدة للـ PAO، وانه مسؤول عن الاحداث التي تؤدي إلى قتل الطفيليات (١٥).

يعد داء المشوكات Echinococcosis من الامراض الطفيلية القديمة والشائعة في جميع أنحاء العالم ، وبضمنها الوطن العربي والعراق (١٦) وهو من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان (١٧). تعد المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* طفيلا عالمي الانتشار (١٨) ومتوطنا في جميع القارات، وهي العامل المسبب لداء المشوكات الكيسي Cystic Echinococcosis او داء العدريات الكيسي Cystic hydatid disease (١٩). يسبب داء الأكياس العدرية مشاكل صحية للانسان وخسائر اقتصادية للحيوانات في البلدان التي ينتشر فيها المرض ولاسيما في المناطق التي يستوطن فيها (٢٠). لهذا أولى الباحثون والمختصون اهتماما كبيرا لموضوع معالجة هذا الداء الذي مازال واحدا من اخطر الامراض الطفيلية القاتلة والصعبة العلاج (٢١).

اشارت دراسات سابقة (٢٢-٢٤) الى وجود فعالية عالية لانزيم PAO في CSF ، وان له متماثلات عديدة بعد التنقية الجزئية له، وحيث ان هناك دراسة سابقة (٢٥) اشارت الى التاثير المناعي لاحد متماثلات انزيم PAO المنقى جزئيا من CSF ضد الخمج بداء الاكياس العدرية الثانوي في الفئران، فدراستنا الحالية هذه مكملة لدراستين قيد النشر (٢٦،٢٧) اشارتا الى التاثير المناعي لمتماثل ثاني لانزيم PAO من CSF ضد الخمج بداء الاكياس العدرية الثانوي في الفئران (اوضحت الدراسة الاولى نمو وتطور الاكياس العدرية واوضحت الدراسة الثانية صورة الدم).

يهدف بحثنا الحالي الى دراسة الاستجابة المناعية غير النوعية والنوعية المتمثلتين بمعامل البلعمة وسمك وسادة القدم، على التوالي، في الفئران المفعلة بالمتماثل الثاني لانزيم PAO مع السبرمين ضد الخمج بداء الاكياس العدرية الثانوي في الفئران.

المواد وطرائق العمل

عينة السائل المخي الشوكي

جمعت عينات CSF للاطفال الاصحاء من مختبرات مستشفى ابن سينا التعليمي في الموصل بواقع ١٥ عينة وبمعدل (٠,٥-١) مل للعينة الواحدة.

تقدير كمية البروتين في الـ CSF

استخدمت طريقة لاوري المعدلة (٢٨،٢٩) في تقدير كمية البروتين في عينات الـ CSF.

قياس فعالية أنزيم PAO

قيست فعالية أنزيم PAO بالاعتماد على طريقة فليح (٣٠) والمحورة من قبل (٣١)، واستخدمت الظروف المثالية التي يعمل عليها انزيم PAO للـ CSF والمثبتة من قبل (٢٢).

التنقية الجزئية لانزيم PAO

تمت التنقية الجزئية لأنزيم PAO من الـ CSF الأطفال باستخدام الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا التبادل الايوني (باستخدام المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose)، على التوالي (٣٢).

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

تم الحصول على الأكياس العدرية والتي تم عزلها من اكباد الاغنام المذبوحة من الجزارين في مدينة الموصل. وجمعت الرؤيسات الأولية حسب طريقة (٣٣) وتم تقدير حيويتها حسب طريقة (٣٤)، واستخدمت الرؤيسات الأولية التي بلغت حيويتها (٩٦%) فاكثر وحقنت الفئران في التجويف البريتوني بـ (٢٠٠٠) رؤيس اولي تقريبا والتي تم حسابها حسب طريقة (٣٥).

تصميم التجارب

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

التجربة الأولى: حقن ٢٥ فأرا عبر الخلب بتركيز 200 مكغم /١٠غم من وزن الجسم بالـ Spm مضافا اليها تراكيز مختلفة (١٠٠٠,٨٠٠,٦٠٠,٤٠٠,٢٠٠ مكغم/١٠غم من وزن الجسم) من أنزيم II (PAO 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 الحية فقط كمجموعة سيطرة موجبة. حقنت ٥ فئران بمنظم الفوسفات الملحي PBS Phosphate Buffer Saline فقط كمجموعة سيطرة سالبة، شرحت الفئران جميعها بعد شهر من احداث الخمج. حدد التركيز الامثل للانزيم من هذه التجربة لاجراء التجارب اللاحقة.

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

التجربة الثالثة: حقنت ٥ فئران بالتركيز الامثل من أنزيم PAO II مع Spm وبجرعتين متتاليتين بينهما ٧٢ ساعة، خمجت الفئران بالعدد نفسه من الرؤيسات الأولية الحية بعد ٦ أيام من التفعيل الاولي. في كلا التجربتين كان هناك مجموعة سيطرة سالبة وموجبة. شرحت الفئران جميعها بعد شهرين وثلاثة اشهر من إحداث الخمج.

دراسة الاستجابة المناعية

١. الاستجابة المناعية الطبيعية

معامل البلعمة

درس معامل البلعمة باستخدام صبغة Nitro blue Tetrazolium (NBT) وحسب معامل البلعمة وفق المعادلة التالية (٣٦):

معامل البلعمة =(عدد البلاعم المختزلة / عدد البلاعم الكلي) x ١٠٠

٢. الاستجابة المناعية الخلوية

اختبار فرط الحساسية المتأخر

اتبعت طريقة (٣٧) في تحضير مستضد الرؤيسات الأولية، واتبعت طريقة (٣٨) لقياس فرط الحساسية المتاخر.

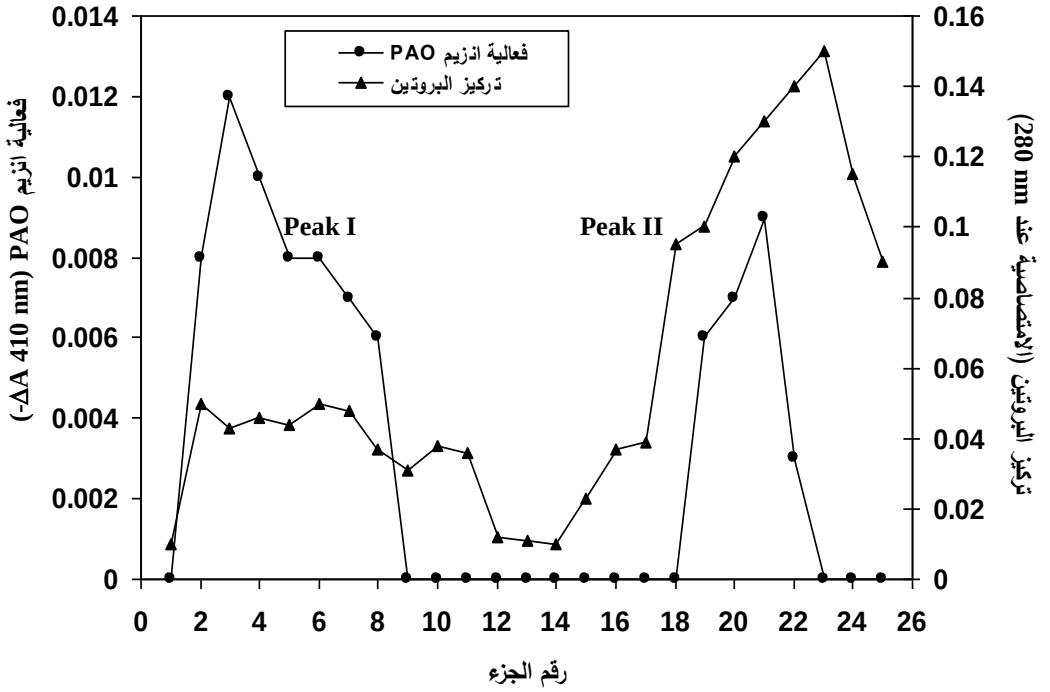
التحليل الاحصائي

تم تحليل نتائج معامل البلعمة باستخدام اختبار t لمعرفة اذا كانت هناك فروق معنوية بين الحيوانات المفعلة بانزيم PAO وحيوانات السيطرة الموجبة. تم استخدام تحليل التباين واختبار F لبيان الفروق المعنوية بين المعاملات حسب تصميم القطاعات العشوائية الكامنة Randomly Complete Block Design (RCBD) في تحليل نتائج اختبار فرط الحساسية المتاخر ، واختبرت احصائيا باستخدام اختبار دنت Dunnett لمقارنة المعاملات المستخدمة مع مجموعة السيطرة الموجبة (٣٩).

النتائج

تحديد مستوى فعالية انزيم PAO في CSF

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



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

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

خطوات تنقية الـCSF	الحجم الكلي (مل)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية الانزيمية (وحدة انزيمية/مل)	الفعالية الانزيمية الكلية (وحدة انزيمية)*	الفعالية النوعية (وحدة انزيمية/ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	استرجاع الفعالية %
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 معامل البلعمة واختبار فرط الحساسية المتاخر باستخدام جرعات

PAO مختلفة التركيز

يوضح الجدول (٢) حدوث ارتفاع معنوي عالي في معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة بنظام Spm-PAO مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة الموجبة، بلغ اقصاه عند التركيز ٨٠٠ مكغم، وبلغ ادناه عند التركيز ٢٠٠ مكغم. اما بالنسبة لمعدلات سمك وسادة القدم فقد بلغ اعلى معدل سمك بعد ٣ ساعات من حقن المستضد عند التركيز ٨٠٠ مكغم، وبفرق معنوي عال، في حين اظهر التركيز ٢٠٠ مكغم ادنى معدل سمك، وبفرق غير معنوي، مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة الموجبة البالغ ٠,٥١ ملي متر.

الجدول (٢): التغيرات الحاصلة في معدلات معامل البلعمة وسمك وسادة القدم (ملم) في الفئران المفعلة باستخدام تراكيز مختلفة من انزيم PAO مع تركيز ثابت من مادة الاساس Spm، وبجرعة واحدة قبل ٢٤ ساعة من الخمج لمدة شهر واحد

التراكيز (مكغم)		معدل سمك وسادة القدم (ملم) بعد مرور الفترة الزمنية المحددة			معامل البلعمة (%)
PAO	Spm	٣ ساعات	٢٤ ساعة	٤٨ ساعة	
٢٠٠	٢٠٠	٠,٠٣±٠,٤٥	٠,٠٣±٠,٤٠	٠,٠١±٠,٣٧	١,٩٢ ± ****٣٥,٢
٤٠٠	٢٠٠	٠,٠٩±٠,٥١	٠,٠٢±٠,٤١	٠,٠١±٠,٣٩	٣,٢١ ± ****٤٢,٤
٦٠٠	٢٠٠	٠,٠٨±****١,١٧	٠,٠٤±****٠,٧٦	٠,٠٧±****٠,٥٣	١,٨١ ± ****٥٤,٤
٨٠٠	٢٠٠	٠,١٤±****١,٢٣	٠,٠٧±****٠,٧٩	٠,٠٧±****٠,٦٥	١,٥١ ± ****٦٨,٤
١٠٠٠	٢٠٠	٠,١١±****٠,٩٤	٠,٠٢±****٠,٥١	٠,٠٣±٠,٣٥	٣,٩٠ ± ****٤٣,٨
C+		٠,٠٩±٠,٥١	٠,٠٣±٠,٤٢	٠,٠٣±٠,٣٢	٠,٩٨ ± ٢٧,٧

C+ فئران السيطرة المخمجة غير المفعلة

**** الفروق معنوية عند ($P < 0.001$)

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

اختيار التركيز الامثل لـ PAO

تم اختيار التركيز الامثل لـ PAO على ضوء النتائج التي استحصلت من الدراستين السابقتين ودراستنا الحالية، حيث وجد ان امثل تركيز لـ PAO كان ٨٠٠ مكغم مع ٢٠٠ مكغم من Spm، وعليه فقد استخدم في تمنيع الفئران المخمجة في التجارب اللاحقة.

معدلات معامل البلعمة واختبار فرط الحساسية المتأخر باستخدام التركيز الامثل لـ PAO

يوضح الجدول (٣) حدوث ارتفاع معنوي عال في معدل معامل البلعمة في الفئران المفعلة مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة الموجبة. حدث ارتفاع معنوي عال في معدل سمك وسادة القدم في المجموعة المفعلة، بعد مرور شهر وشهرين من الخمج، بعد ٣ ساعات من حقن المستضد، واستمر الانتفاخ بعد ٤٨ ساعة من الحقن مقارنة مع معدل مجموعة السيطرة الموجبة.

يوضح الجدول (٤) حدوث ارتفاع معنوي عال في معدل معامل البلعمة في الفئران المفعلة مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة الموجبة. يتوضح من الجدول نفسه حدوث اقصى ارتفاع لمعدل سمك وسادة القدم، بعد مرور شهر، شهرين وثلاثة اشهر من الخمج، في الفئران المفعلة بعد ٣ ساعات من حقن المستضد، والذي استمر بعد ٤٨ ساعة من الحقن، وبفرق معنوي عال مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة الموجبة.

الجدول (٣): التغيرات الحاصلة في معدلات معامل البلعمة وسمك وسادة القدم (ملم) في الفئران المفعلة بالتركيز الامثل من انزيم PAO مع مادة الاساس Spm، وبجرعة واحدة قبل ٧٢ ساعة من الخمج لمدة شهرين

التركيز (مكغم)		المدة الزمنية (شهر)	معدل سمك وسادة القدم (ملم) بعد مرور الفترة الزمنية المحددة			معامل البلعمة (%)
PAO	Spm		٣ ساعات	٢٤ ساعة	٤٨ ساعة	
٨٠٠	٢٠٠	١	٠,١٦٦±****١,٣٥	٠,١٢٢±****١,٠٠	٠,١٤٨±****٠,٧٨	٢,١٣±****٦٣,٧
		٢	٠,١٥٨±****١,٦٠	٠,١١٢±****١,٠٥	٠,١٨٢±****٠,٧٦	
C^+		١	٠,٠١٢±٠,٩٧	٠,١٥٨±٠,٨٠	٠,٠٤١±٠,٤٨	١,٦٧±٤٢,٦
		٢	٠,١٥٨±٠,٩٠	٠,١٥٥±٠,٧١	٠,١٤٥±٠,٣٥	

الجدول (٤): التغيرات الحاصلة في معدلات معامل البلعمة وسمك وسادة القدم (ملم) في الفئران المفعلة بالتركيز الامثل من انزيم PAO مع مادة الاساس Spm ، وبجرعتين (كل ٧٢ ساعة) قبل ستة ايام من الخمج لمدة ثلاثة اشهر

التركيز (مكغم)		المدة الزمنية (شهر)	معدل سمك وسادة القدم (ملم) بعد مرور الفترة الزمنية المحددة			معامل البلعمة (%)
PAO	Spm		٣ ساعات	٢٤ ساعة	٤٨ ساعة	
٨٠٠	٢٠٠	1	١,٢٥****±٠,١١٧	٠,٩٢****±٠,١٣٠	٠,٧٢****±٠,١٣٠	٧٢,٠****±١,٦٨
		2	١,٣٢****±٠,٠٥٦	٠,٩٥****±٠,١١٢	٠,٧٥****±٠,١١٢	
		3	١,٣٠****±٠,٢٧٤	٠,٩٢****±٠,١٦٠	٠,٧٠****±٠,٠٧٩	
C^+		1	٠,٩٧ ±٠,٠١٢	٠,٨٠ ±٠,١٥٨	٠,٤٨±٠,٠٤١	٥٥,٤±٣,٢٣
		2	٠,٩٠ ±٠,١٥٨	٠,٧١ ±٠,١٥٥	٠,٣٥±٠,١٤٥	
		3	١,٠٠ ±٠,١٥٨	٠,٧٧±٠,٠٩٧	٠,٥٢±٠,٠٤٨	

المناقشة

لوحظ في دراستنا الحالية عند تنقية انزيم PAO التنقية الجزئية من CSF الاطفال ظهور قمتين متميزتين تمتلكان فعالية PAO ، وهذا نفس ما لاحظته Al-Katib (٢٢) باستخدام خطوة التبادل الأيوني. ان ظهور قمتين متميزتين تمتلك كل منها فعالية عالية نسبيا لإنزيم PAO في دراستنا هنا تشير الى وجود هذا الأنزيم بأشكال متماثلات، هذا مابينه الباحثون (٤٠) حيث تم تشخيص متماثلات لإنزيم PAO مميزة في الهيئات التركيبية والمواقع الخلوية، كما تم تشخيص الجينات الوراثية لهذه المتماثلات (11). ان الوظائف المهمة المعينة التي تلعبها مركبات الـ PA في النسيج المعين يعتمد لحد ما على نمط الايض لهذه المركبات (41)، حيث ان إنزيم PAO يعمل على التنظيم الدقيق لتركيز الـ PA وفي الوقت نفسه يعمل على التحكم بتركيز ونوع نواتج الأكسدة للـ PA اعتمادا على الآلية الخاصة به، الأمر الذي يفسر أهمية تواجد PAO بمتماثلات مختلفة (42).

درسنا في بحثنا الحالي فعالية البلعمة Phagocytic activity كمؤشر على نشاط الاستجابة المناعية غير النوعية، وقد اظهرت الفئران المفعلة بنظام Spm–PAO وعلى مدى شهر، شهرين وثلاثة اشهر من الخمج معاملات بلعمية مرتفعة مقارنة بفئران السيطرة الموجبة. قد يعزى السبب في ذلك إلى ان النواتج السامة (اكرولين، امونيا، بيروكسيد الهيدروجين وغيرها) المتكونة بفعل آلية معينة لانزيم PAO، تعمل جزءا تكميليا للفعل التنظيمي للخلايا البلعمية (٤٣). وان تنشيط البلاعم في الجسم الحي ربما يؤدي الى زيادة محتوى انزيم PAO لكل خلية على الرغم من بقاء الفعالية النوعية له ثابتة (٤٤). حيث ان من ضمن الاحداث التي تعقب تنشيط البلاعم الكبيرة هي التكوين الحياتي لانزيم PAO الذي بدوره، وبوجود المادة الاساس المناسبة له، يعمل على توليد عوامل تحلل او تحدد توالد الخلايا اللمفاوية، الخلايا السرطانية، والكائنات الدقيقة (٤٥). في الوقت نفسه، فقد اشير الى دورامينوالديهايد الفعال والاكرولين الناتج من اكسدة PA بوساطة PAO في عملية قتل *P.falciparum* (٤٦). في حين اشار باحثون اخرون (٤٧) الى دور H_2O_2 المتحرر من اكسدة PA في عملية الموت المبرمج للخلية Apoptosis بوساطة إزالة قطبية غشاء المايتوكوندريا. جاءت نتائجنا موافقة لما توصل اليه الباحثون السابقون (٤٩،٤٨،٢٥) باستخدام معدلات مناعية مختلفة ضد داء الاكياس العدرية الثانوي في الفئران البيض. أظهرت مجموعة السيطرة الموجبة في الدراسة الحالية انخفاضا في معامل البلعمة، ربما يكون للطفيل دور في إنتاج اللمفوكينات التي تثبط عملية قتل الرؤيسات الأولية لدودة المشوكات الحبيبية، في حين تحث يرقات الدودة الشريطية *Mesocestoides corti* عدم استجابة خلايا البلاعم (٥٠). وان سائل الأكياس العدرية من طفيل المشوكات الحبيبية يثبط بلعمة البكتيريا وخلايا الخميرة بوساطة بلاعم المضيف في الزجاج (٥١). في الوقت نفسه، اشار الباحثون (٥٢) الى ان السائل العدري والاجزاء المختلفة المعزولة منه لها تاثير سمي على خلايا البلاعم الخلبية في الفئران، كما اثبتوا ان لهذا السائل تاثيرا ساما على البلاعم الكبيرة في الزجاج، كما سببت معاملة الفئران بالذيفان ذاته انخفاضا في النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية. اكدت هذه النتائج ما جاء في دراسات اخرى سابقة حول العوامل المشتقة من *Taenia multiceps* (٥٣) او المشتقة من المشوكات متعددة الحجرات (٥٥،٥٤) المعدلة للفعالية المناعية للخلايا البلعمية الكبيرة المساعدة.

يتبين من خلال دراسة الاستجابة المناعية الخلوية المتمثلة باختبار فرط الحساسية المتاخر، ان الفئران المفعلة بانزيم Spm–PAO اظهرت ارتفاعا معنويا في معدلات سمك وسادة القدم اليمنى المحسسة بالمستضد على مدى شهر، شهرين وثلاثة اشهر من الخمج، مقارنة بفئران السيطرة الموجبة. ان هذا الورم او الانتفاخ يعود الى ارتشاح الخلايا العدلة، البلاعم الكبيرة وحيدة النواة والخلايا اللمفاوية، والذي يعد صفة مميزة لتفاعل فرط الحساسية المتاخر النموذجي (٥٦). وان الارتفاع المعنوي في معدلات سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة بنظام Spm–PAO ، يمكن ان يعزى الى قدرة انزيم PAO بحد ذاته او الى تاثير نواتج فعاليته الانزيمية على حث المناعة الخلوية (٤٧،٤٤). جاءت نتائج الدراسة الحالية موافقة لما توصل اليه الباحثون (٥٧،٤٩،٢٥)، الذين استخدموا معدلات مناعية مختلفة. كما جاءت هذه النتائج مشابهه لما ذكره Ryu and Kim (٥٦) اللذان وجدا ان المستضد المتكون من معقد البروتين–السكر المتعدد ألدهني المستخلص من بكتيريا

Pasteurella multocida (P-2383) حث انتفاخا كان ملحوظا بعد ١٨ ساعة من الحقن، واشارا بان الانتفاخ يعود الى ارتشاح الخلايا العدلة،

البلاعم الكبيرة وحيدة النواة والخلايا اللمفاوية، وان الفئران الممنعة قادرة على تجنيد عدد كبير من خلايا البلاعم عند موقع الاصابة بسبب تحرير اللمفوكينات بوساطة الخلايا اللمفاوية مؤشرا دور المناعة الخلوية (٥٨). وان سبب الزيادة في الانتفاخ قد يعود الى تاثير المادة الممنعة على الخلايا البلعمية وتفعيلها الذي يؤدي الى زيادة اعداد الخلايا اللمفاوية، والذي يؤدي الى حصول تنسيق بينهما وينظم حجم الاستجابة المناعية الخلوية ويزيد افراز مركبات اللمف المنظمة للاستجابة المناعية (٥٩).

كما اظهرت الفئران المخمجة غير المفعلة في الدراسة الحالية استجابة خلوية منخفضة Depressed CMI ، وهذا يشابه ما لاحظه Ali-Khan (٣٨) في الفئران المخمجة بالمشوكات متعددة الحجرات، وفي الفئران المخمجة بالمشوكات الحبيبية (٦١،٦٠).

يتضح من دراستنا الحالية ان المتماثل الثاني لانزيم PAO المستخلص من CSF مع السبرمين يعمل معدلا مناعيا مؤثرا ضد الاصابة بداء الاكياس العدرية الثانوي، وعليه فاننا نطمح من دراساتنا المستقبلية في الحصول على انزيم اكثر نقاوة وذلك باجراء عمليات تنقية اكثر بهدف معرفة من هو المسؤول المباشر عن التاثير المناعي.

المصادر

1. H.M. Wallace, A.V. Fraser and A. Hughes, Biochem . J., 376 (2003) 1-14.
2. C. Valentim, F.G. Mello, W. De Souza and M.A. Vannier-Santos, Acta Microscopica, 12 (2003) 229-230.
3. K.M. Christopher and H. Van, "Polyamine biochemistry". The Benjamin Communes Publishing Company, 706-715, 1990.
4. S.M. Aziz, M.N. Gillespie, P.A. Crooks, S.F. Tofiq, C.P. Tsuboi, J.W. Olson and M.P. Gosland, J. Pharmacol. Exp. Ther., 278 (1996) 185-192.
5. M.A. Watson and M.G. Scott, Clin. Chem., 41(3) (1995) 343- 360.
6. L.T. Kermzner, P.E. Duffy, R.F. Defendini and M.J. Terrano, Exc. Med., 193 (1969) 242.
7. I.J. Russell, H. Vaeroy, M. Javors and F. Nyberg, Arthritis-Rheum., 35(5) (1992) 550-556.
8. L.J. Marton, M.S. Edwards, V.A. Levin, A. Lubich and B. Wilson, Cancer Res., 39 (1979) 993-997.
9. C. Binda, A. Coda, R. Angelini, R. Federico, P. Ascenzi and A. Mattevi, Acta. crystallogr. D.Biol. Crystallogr, 4(2) (1998) 1429-1431.
10. N. Seiler, Prog. Brain Res., 106 (1995) 333-344.
11. T. Murray-Stewart, Y. Wang, W. Devereux and Jr. R.A. Casero, Biochem. J., 368 (2002) 673-677.
12. N. Seiler, "Polyamines and the immune system". In: Polyamines in health and nutrition". Bardocz S., White A.(eds.)., Klumer, Dordrecht, 65-76, 1999.
13. U. Bachrach, "Oxidized polyamines". In: Metabolism of polyamines 171(IV). Metabolism and biological functions of polyamines Ann. Acad. Sci., NY., 939-969, 1970.
14. C.W. Tabor and S.M. Rosenthal, J. Pharmacol. Exp. Ther, 116 (1956) 139-155.
15. D.M.L. Morgan, J.R. Christensen and A.C. Allison, Biochem. Soc. Trans., 9 (1981) 563-564.
16. H.I. Jumaa, E.R. Al-Kennany and F.Q. Al-Hayali, Iraqi J. Vet. Sci., 14(1) (2001) 39-56.
17. Y. Oku, R. Malgor, Z.U. Benavidez, C. Carmona and H. Kamiya, Int. Congress Series., 1267 (2004) 98-104.
18. W. Zhang, J. Li and D.P. McManus, Clin. Microbiol. Rev., 16(1) (2003) 18-36.
19. D.A. Vuitton, Clin. Rev. Aller. Immumol., 26 (2) (2004) 93-104.
20. F.L. Andersen, "Introduction to cystic Echinococcosis and description of cooperative research project in Morocco". In: Compendium of cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern countries with special reference to Morocco. Andersen F.L., Ouhelli H. and Kachani M.(Eds.). Brigham Young University, Print Services, Provo., UT 84602, USA, 1-8, 1997.
21. R.E. Blanton, Options in Infect. Dis., 3 (2001) 327-332.
22. S.M.Y. AL-Katib, Ph.D. Thesis, Univ. Mosul, 2000 (Arabic).
23. L.A.M. Mekha, M.Sc. Thesis, Univ. Mosul, 2002.
24. O.Y.M. Al-Abbasy, M.Sc. Thesis, Univ. Mosul, 2003 (Arabic).
25. W.I.A. Tohala, Ph.D. Thesis, Univ. Mosul, 2006 (Arabic).
26. W.I.A. Tohala, 2007, Under Publication.
27. W.I. Tohala, K.A. Flayeh and A.A. Ali, 2007, Under Publication.
28. O.H. Lowrey, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, J. Biol. Chem., 193 (1951) 265-275.
29. G.R. Scharcterle and R.L. Pollack, Anal. Biochem., 51 (1973) 654-655.
30. K.A. Flayeh, Clin. Chem., 34 (1988) 401-403.
31. K.A.D. Dahel, M.Sc. Thesis, Univ. Mosul, 1995 (Arabic).
32. B.D. Hames and N.M. Hooper, "Instant notes on biochemistry". 2nd ed. Bios. Scientific Publishers Limited, 2000.
33. J.D. Smyth, "*In vitro* culture of *Echinococcus spp*". Proc. 13th ed., Int. Cong. Hydit, Madrid, pp. 84-95, 1985.
34. J.D. Smyth and N.G. Barett, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg, 74 (1980) 649-652.
35. A. Wangoo, N.K. Ganguly and R.C. Mahajan, Indian J. Med. Res., 89 (1989) 40-42.
36. P.H. Park, S.M. Filkring and E.M. Smith Wick, Lancet., 2 (1968) 532-534.
37. S. Dottorini, M. Sparovli, C. Bellucci and M. Magnini, Ann. Trop. Med. Parasitol., 74 (1985) 43-49.
38. Z.Ali-khan, Exp. Parasitol, 46(1978)157-165.
39. J.L. Bruning and B.L. Kintz, "Computational handbook of statistics". 2nd ed., Scott Foresman Company, Gleriew, 1977.
40. M. Cervelli, A. Cona, R. Angelini, F. Pdticelli, R. Federico and P. Mariottini, Eur. J. Biochem., 268(13) (2001) 3816-3830.
41. A. Sessa and A. Perin, Clin. Exp. Res., 21(2) (1997) 318-325.

Parasitol., 40 (1993) 109-113.
52. D. Janssen, M.C. Rueda, P.H. DeRyck and A. Osuna, Parasite Immunol., 19 (1997) 149-160.
53. N.K. Rakha, J.B. Dixon, G.C. Skerritt, S.D. Carter, P. Jenkins and M. Clark, Parasitol., 102 (1991) 133-140.
54. N.K. Rakha, J.B. Dixon, P. Jenkins, S.D. Carter, G.C. Skerritt and S. Clark, Parasitol., 103 (1991) 139-147.
55. N.K. Rakha, J.B. Dixon, S.D. Carter, P.S. Craig, P. Jenkins and S. Folkard, Immunology, 74 (1991) 652-656.
56. H. Ryu and C. Kim, J. Vet. Sci., 1(2) (2000) 87–95.
57. S.Y. Yousif, M.Sc. Thesis, Univ. Mosul, 2005 (Arabic).
58. C.J. Czuprinski, P.E. Henson and P.A. Campbell, J. Leukocyte Biol., 35 (1984) 193–208.
59. I. Roitt, J. Brostoff and D. Male, "Immunology". 6th ed., Harcourt Publishers Limited UK, 2001.
60. S. Kivity, N. Heno, Z. Greif, E. Fireman and N. Topilsky, Ann. Aller., 71(3) (1993) 247-250.
61. A.A. Ali and N.E. Salih, Riv. Parssitol., XVII (LXI)-2 (2000) 175-182.
42. B. Mondovi, "Animal intracellular amine oxidases, In: Structure and functions of amine oxidases". Mondovi B. ed., CRC Press, Boca Raton. FL, 1985.
43. N. Seiler, J.P. Moulinoux, R. Havouis and L. Toujas, Biochem. Cell Biol., 73(5-6) (1995) 275-281.
44. D.M.L. Morgan, "Polyamine oxidase". In Polyamines in Biomedical Research, (Gaugas J.M., ed.), 285-302. Wiley, Chichester and New York, 1980.
45. A.C. Allison, J. Ferluga, H. Prydz and H.U. Schorlemmer, Inflamm. Res., 8(1-2) (1978) 27-35.
46. C.M. Rzepczyk, A.J. Saul and A. Ferrante, Infect. Immun., 43(1) (1984) 238-244.
47. R. Chaturvedi, Y. Cheng, M. Asim, F.I. Bussiere, H. Xu, A.P. Gobert, A. Hacker, Jr. R.A. Casero, K.T. Wilson, J. Biol. Chem., 279(38) (2004)40161-40173.
48. A.A. Ali and N.E. Salih, Riv. Parassitol., XVIII (LXII)-2 (2001) 161-170.
49. S.S.Y. Al-Mutaywiti, M.Sc. Thesis, Univ. Mosul, 2005 (Arabic).
50. P. Jenkins, J.B. Dixon, N.K. Rakha and S.D. Carter, Parasitology, 100 (1990) 309-315.
51. D. Janssen, P.H. De Rycke and A. Osuna, Folia

Immune response in BALB/c mice of polyamine oxidase isomer against infection with secondary hydatid disease III. Phagocytosis and delayed-type hypersensitivity

W.I. Tohala[1] , K.A. Flayeh[2] , A.A. Ali[2]

[1] *Chemistry Dept.* **,** *College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq*
[2] *Chemistry Dept.* **,** *Education College for Girls* **,** *University of Mosul , Mosul , Iraq*

(Received 3 / 4 / 200٨, Accepted 15 /12 / 2008)

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.

Immune response was studied 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*. The pathological changes occurred in the mice activated by different concentrations of PAO (II) (200-1000 μg) with constant concentration (200 μg) Spm, were followed in comparison with positive and negative control group, along one month, depending on non-specific and specific immune response represented by phagocytosis and delayed-type hypersensitivity, respectively. Then pathological changes were followed in activated BALB/c mice with optimum concentration (800 μg PAO(II) with 200 μg Spm) in comparison with positive control group throughout two and three months, depending on the mentioned criteria.

An increase in the non-specific (innate) and specific (cellular) immune responses, which represented by an increase in the rate of phagocytic index and foot pad thickness, respectively, in activated mice with PAO-Spm system throughout (1,2,3) months, in comparison with +ve control group.

Therefore, it was concluded here that PAO (II) isolated from CSF with Spm could be considered as an effective immunomodulator against infection with secondary hydatid disease.

Keywords: polyamine oxidase isomer, secondary hydatid disease, Phagocytosis, delayed-type hypersensitivity