مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 18 (4) 2005

دراسة تأثير البروتينات الذائبة(Sp2,Sp1) المستخلصة من الجرثومة المتقلبة*Proteus mirabilis* على فعالية انظيم الادينوسين دي امينيزفي مصل الأرانب البيض

صلاح سلمان الخشالي
كلية التربية ابن- الهيثم ،جامعة بغداد

الخلاصة

هدف البحث إلى دراسة تأثير جزء من الخلية الجرثومية في الاستجابة المناعية الذاتية،إذ تم استخلاص البروتينات الذائبة لجرثومة جنس المتقلبة*Proteus mirabilis* وهي(Sp2,Sp1) باستخدام انظيم اللايسوزايم،وتم اختيار معيار مهم من معايير الاستجابة المناعية الذاتية وهو انظيم الادينوسين دي امينيز(ADA). قسمت الأرانب قيد التجربة على ثلاثة مجاميع ،حقنت المجموعة الاولى بالبروتين (Sp1) ،والمجموعة الثانية حقنت بالبروتين (Sp2)والمجموعة الثالثة كانت مجموعة السيطرة وقد حقنت بدارئ الفوسفات الملحي لمدة أربع أسابيع بمعدل جرعة واحدة كل أسبوع.وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي لقياس مستوى فعالية انظيم (ADA)لعينة الأرانب المعاملة والسيطرة ، وجود فروق معنوية بين الأرانب المعاملة بالمستضد (Sp1)مقارنة بعينة السيطرة اذ تقاربت قيمة الارتفاع في الأسبوعين الثاني والخامس من بداية الحقن(0.283±0.025)وحدة عالمية/ملغم و(0.285±0.038) وحدة عالمية /ملغم على التوالي.كما أوضحت نتائج قياس مستوى انظيم (ADA) في مصل الأرانب المعاملة بالمستضد (Sp2) مقارنة مع مجموعة السيطرة وجود فروقا معنوية وكان أعلى ارتفاع له في الأسبوع الخامس من بداية الحقن آذ بلغ (0.268±0.007) وحدة عالمية/ملغم.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

المقدمة

يؤدي انظيم (AdenosineDeaminase ; ADA)دورا مهما في الكثير من الفعاليات الحيوية في الجسم ،ويتضح ذلك من خلال دخوله في ايض البيورينات (Purinse) والاحماض النووية (RNA,DNA)والبروتينات النووية(1)،حيث يعمل على حماية الخلية من التركيز العالي لل(ATP) الناتج من تعرضها الى كمية عالية من الادينوسين (2)، ومن الناحية الفسلجية فان ADAيلعب دورا في تنظيم تدفق الدم التاجي المؤدي الى توسع الأوعية الدموية اذ ان الانسداد الاذيني- البطيني في قلب اللبائن الذي يسببه الادينو ين يكون حالة مؤقتة نظرا لان إبعاده يكون بشكل سريع .وان هذا الانظيم يؤثر في نمو وتمايز الخلايا اللمفية ولاسيما الخلايا التائية (T-Lymphocyte) منها.،وفي نضج خلاياوحيدة النواة (Monocyte)والخلايا البلعمية (Macrophage) فهو يلعب دوراً في تطوير الجهاز المناعي وان نقصه يترافق مع العوز المناعي الشديد(Sever combined Immunodeficiency)(4,3).وقد لوحظ عند غياب هذا الانظيم في قرابة 15%من الاشخاص الذين يعانون من امراض نقص المناعة والتي تزداد قابليتهم للإصابة بالجراثيم الانتهازية والفايروسات والطفيليات (5).يتواجد انظيم ADA في جميع أنسجة اللبائن وفعاليته تكون عالية في الطحال والاثني عشري ،بينما تكون واطئة في الدم والدماغ وغيرها من الأنسجة في الجرذ وخنزير غينيا والفأر والقط والأرنب والعجل والكلب(6) .

وقد هدف البحث هو دراسة تاثير البروتينات الذائبة Soluble Proteinsوالمستخلصة جرثومة*Proteus mirabilis* والمعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية على مستوى انظيم الادينوسين دي امينيز ADA في مصل دم الأرانب.

المواد وطرائق العمل

-عزل جرثومة***P.mirabilis*** : عزلت الجرثومة من احد حالات التهاب المجاري البولية(Urinary Tract Infection) بأستخدام الاوساط الغذائية حيث شخصت العزلة في مختبر الصحة المركزي _ وزارة الصحة العراقية،وقد أكد التشخيص بوساطة طريقة (Api-20E)(7).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

- **استخلاص البروتينات الذائبة:** علقت خلايا الجرثومة بعد تجميدها في محلول السكروز (0.75مولاري) 10:1.كسرت الخلايا بوساطة جهاز الذبذبات فوق الصوتية،ثم نبذت مركزيا(6000دورة/دقيقة)لمدة 60دقيقة.بعد ذلك أهمل الراسب،ونبذ المحلول الطافي مرة ثانية بسرعة(20000دورة/دقيقة)ولمدة 120دقيقة.جمع المحلول الطافي حيث أنه يمثل البروتين الذائب Sp1 ،أما الراسب فقد علق في 50مل من محلول الانظيم الحال(Lysozyme)وحضن العالق(37م)لمدة18ساعة.بعد ذلك نبذ العالق (20000دورة/دقيقة) ولمدة 120دقيقة،وجمع المحلول الطافي و الذي يمثل البروتين الذائب (SP2) (8).

-**الحيوانات المختبرية وطريقة التمنيع:** استخدمت ارانب بيضاء (*Oryctolagus cuniculus*)بعمر 6-8 أشهر،جهزت هذه الحيوانات من الكلية الطبية العراقية/جامعةالنهرين.

قسمت الحيوانات على ثلاثة مجاميع وكل مجموعة ضمت ثلاث ارانب.حقنت المجموعة الأولى بالمستضد SP1ممزوجا مع معامل الفروند الكامل(C.F.A ;CompleteFreundsAdjuvant)،اما المجموعة الثانية من الارانب فحقنت(SP2+C.F.A) ،اما المجموعة الثالثة فكانت مجموعة السيطرة حيث حقنت بداىٔ الفوسفات الفسلجي .حقنت الارانب تحت الجلد (subcutaneous) وبمعدل جرعة واحدة (1ملغم/مل)اسبوعيا ولمدة اربعة اسابيع.

سحب الدم (2مل)من الارانب عن طريق طعنة القلب في الاسابيع(6,5,4,2).بعد تجلط الدم، نبذت العينات للحصول على المصل والذي حفظ في المجمدة(-20م).

- **قياس فعالية انظيم ADA:** اعتمدت طريقة قياس فعالية انظيم ADAعلى القياس غير المباشر لأنتاج الامونيا عندما يعمل انظيم ADAعلى الادينوسين.قرأت الامتصاصية تحت طول مرجي 658نانوميتر ومن خلالها حسبت الفعالية الحجمية للانظيم (9).

اما الفعالية "نوعية(وحدة/ملغم بروتين) فقد سجلت بعد تقدير مستوى البروتين الكلي في العينة وبالأعتماد على تعليمات الشركة المجهزة لعدة القياس (Randox Company).

حيث قيست الفعالية الحجمية على مستوى البروتين في العينة (10).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

-**التحليل الإحصائي:** عرضت النتائج بهيئة معدل± الانحراف المعياري ثم المقارنات مابين المعدلات باستخدام اختبار (t-test) لتحديد مستوى معنوية الفرو بين معدلات الحيوانات المحقونة وحيوانات السيطرة.

النتائج

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين مجموعة ال ومجموعة الارانب المعاملة بمستضد البروتينات الذائبة(Sp1) في الفعالية النوعي الادينوسين دي امينيز ADA ومنذ الاسبوع الثاني من فترة الحقن (0.283±045 /ملغم بروتين مقارنة مع مجموعة السيطرة(0.0175±0.006) وقد تقارب هذا مع الفعالية النوعية لهذا الانظيم في الأسبوع الخامس من المعاملة (0.285± وحدة /ملغم بروتين مع الأسبوع الثاني جدول(1).

كما بينت نتائج قياس فعالية انظيم ADA في مصل الارانب المحقونة بمستضد وجود ارتفاعا معنويا ابتدا من الاسبوع الثاني (0.0205±0.056) وحدة/ملغم برو بلغ اعلى ارتفاع لمستوى الانظيم مقارنة مع السيطرة عند الاسبوع الخامس من (0.007±0.268)) وحدة/ملغم بروتين. جدول(2).

المناقشة

هدفت الدراسة الحالية الى تسليط الضوء على انظيم الادينوسين دي ا (ADA)نظرا له من دور في تطوير ونمو الجهاز المناعي في والأرنب وان ن يترافق مع حالات العوز المناعي الشديد (SCID) ولما له من دور في حماية الـ اللمفية من التأثيرات السمية للأدينوسين والديوكسي ادينوسين فضلا عن الى انه يتر مع نمو وتمايز الخلايا البلعمية متعددة أشكال الأنوية وأحادية النواة (4) .لقد اش معظم الدراسات الى ان زيادة فعالية (ADA) ممكن ان تعد كانعكاس للتنشيط الم للاستجابة المناعية الخلوية ولاسيما بعد التحفيز بالمستضدات بوساطة التمنيع (11) و جانب اخر فان بعض الدراسات قد اشارت الى وجود انخفاض في مستوى هذا الانظي حالات معينة مثل سرطان الثدي (12) ولقد بينت الدراسة الحالية زيادة فعالية انظيم

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

(ADA) منذ الاسبوع الثاني وقد بلغت اعلى فعالية لهذا الانظيم في الاسبوع الخامس ولكلا المستضدين Sp1,Sp2مقارنة بالسيطرة.وعند مقارنة هذه النتائج مع ماحصل عليه الباحثون في دراساتهم للفعالية النوعية لهذا الانظيم مرتبطة بنوع الاصابة فايروسية كانت اوجرثومية على حد سواء،نجد ان جزء من الخلية الجرثومية وهي البروتينات الذائبة قد ادى الى ارتفاع معنوي في فعالية الانظيم .وقد اشارت بعض البحوث والدراسات الى وجود علاقة بين الاصابة الجرثومية وزيادة فعالية انظيم ADA وكما هو الحال مع المرضى المصابين بمرض السل القصبي والاصابة ببعض الجراثيم الموجبة لملون كرام مثل *Streptococcus pyogenes* (13).

المصادر

1.Schrader,W.P.;Stacy,AR.and Ollar,B.(1976).J.BioChem.251(13):4026-4032.

2.Weyden,M.B. and Kelly,W.N.(1976).J.BioChem.51(18):5448-5456.

3.Cohen,F.(1975ClinicalFeaturesinCombinedImmunodeficiencyDiseaseandAdenosineDeaminaseDificiency:AMolecularDefect.Academic Press,NewYork.p:245.

4.Moriwaki,Y.;Yamaoto,T.andHigashino,K.(1999).Histol.Histopathol. 14:1321-1340.

5.Buckley,R.H.(1999).Primaryimmunodeficiency diseaseIn:Paule,W.(Ed):FundamentalImmunology,4th(ed),Lippincot-Raven,NewYork.pp:1425.

6. Brady,T.G.andO`Donovan,C.L.(1965).Biochem.Physiol.,14:101-120.

7. Baron,E.J.andFinegold,S.M.(1994).Bailyand Scott`sDiagnosticMicrobiology.Laboratory Manual.(Ed).Mosby-yearbook,Inc.USApp:203-210.

8.Kumar,S.S.;Sankaran,K.;Hiagh,R.;Williams,R.H.andBalakrishnan,A .(2001) J.Med.Microbiol.,50:602-621.

9.Gusti,G.(1974).:Adenosinedeaminase.In:BergmeyerH.V.(Ed).MethodsofEnzymaticAnalysisVol.22nd(ed)Academic press,NewYork.pp:1029.

10. Nishikawa,H.Suga,M.and Audo,M.(1988).Chest,94:1315.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

-Amery,E.W.H.(1999).Enzymatic Cytogentic and Drug
stanceStudiese on Blood fromPaitients with
stCancer.M.Sc,Thesis,University Baghdad.
odl-Hakim,A.M.;Salem
.,Kamel,H.F.,SharafEldin,M.;Sobhy,K.E.and
d,W.(1993),the new Egyp.J.Med.8(5):1310-1315.
bbas,T.A.(2001).Some Immunological Effects of KilledGroup A
ptococcus pyogenes in AlbinoMice.Thesis. Collage of
cation(Ibn-Al-haitham).University Baghdad.

جدول (1) تأثير مستضد (Sp_1) لجرثومة *Proteus mirabilis* في ال
الانظيمية لل(ADA) في مصل دم الارانب(المعاملةوالسيطرة)

المجاميع/الجرع	عدد الحيوانات	الجرعة ملغم/ حيوان	المعدل ± الانحر المعياري وحدةعالمية/مل
السيطرة	3	0.00	0.006±0.0175
الاسبوع الثاني	3	1.00	* 0.045±0.283
الاسبوع الرابع	3	1.00	0.022±0.195*
الاسبوع الخامس	3	1.00	0.038± 0.285*
الاسبوع السادس	3	1.00	0.021±0.137*

*: زيادة معنوية (أ <0.01)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

جدول (2) تأثير مستضد (Sp_2) لجرثومة *Proteus mirabilis* في الفعالية الانظيمية لل(ADA) في مصل دم الارانب(المعاملةوالسيطرة)

المجاميع/الجرع	عدد الحيوانات	الجرعة ملغم/ حيوان	المعدل ± الانحراف المعياري وحدةعالمية/ملغم
السيطرة	3	0.00	0.006±0.0175
الاسبوع الثاني	3	1.00	0.0205±0.056*
الاسبوع الرابع	3	1.00	0.070±0.153*
الاسبوع الخامس	3	1.00	0.007±0.268*
الاسبوع السادس	3	1.00	0.011±0.221*

*: زيادة معنوية (أ <0.01)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

study of Soluble Proteins(Sp1 and Sp2) ffect extracted from *Proteus mirabilis* on level of Specific Activity of Adenosine Deaminase In The Sera of albino rabbit

Al-kashaly
rtment of Biology, College of Education, Ibn-Al-Haitham,
ersity of Baghdad

stract

he aimed of present study is to shed some light on the unological effect of soluble proteins extracted from *Proteus bilis* through employing the Specific Activity of Adenosine minase ; ADA.

Soluble proteins;Sp1 and Sp2,was extracted by using the yme enzyme ,The rabbits were divided into Three groups ,the one was injected with Sp1, the second with Sp2 for four weeks the third one was control group.

e results revealed that specific activity of Adenosine Deaminase significantly increased in the second and fifth weekes of injected p with Sp1 compared with control group.The same effectes of the was observed in specific activity of Adenosine minase.Therfor,the extrated soluble proteins had an effects on the mune response of the rabbits.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner