فاعلية انزيم L-Asparginase المنتج من عزلة *E.coli* المحلية في تثبيط التاثير السلبي لاشعة UV في الارانب المختبرية

مروة حسن عبدالوهاب[1] ، كركز محمد ثلج[2]

[1]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2]كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

انجزت الدراسة بهدف تحديد فاعلية الانزيم المنتج من العزلة المحلية لبكتريا E.coli في تحسين معايير الدم الطبيعية والكيموحيوية بعد حقنه في الارانب المختبرية المستحث فيها التورم من خلال التعرض لأشعة UV عند طول موجي 256 نانوميتر لمدة 28 يوما. بينت النتائج ان التعرض للاشعة فوق البنفسجية للارانب المختبرية قد سبب في التاثير في خفض الاعداد الكلية لكريات الدم الحمر (4.9×10^{6}/ملم^{3}) وتركيز خضاب الدم (9.1 غم/ دسيلتر) ومعايير الدم الطبيعية الاخرى معنويا ($p<0.05$) مقارنة مع اعدادها في حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت عند 6.5×10^{6}/ملم^{3} و 13.2 غم/ دسيلتر على التوالي، وكذلك زيادة الاعداد الكلية لخلايا الدم البيض وارتفاع نسبة الخلايا اللمفية منها على حساب نسبة خلايا العدلات، كما سبب في الانخفاض المعنوي لتركيز البروتين الكلي والالبومين والكلوبيولين في بلازما الارانب فضلا عن زيادة نشاطية انزيمات الكبد من Aspartate amino transferase (AST)، Alanine amino transferase (ALT) و Alkaline phosphatase (ALP)، التي اصبحت عند 52.3 ، 48.7 و 207 وحدة دولية/مل على التوالي مقارنة مع قيمها في مجموعة السيطرة التي كانت 32.0 ، 43.6 و 141 وحدة دولية/مل على التوالي. ان الحقن من انزيم L-asparginase بحجم 1 و 2مل عند فاعلية **72 وحدة دولية/ مل** قد سبب في تثبيط التاثير السلبي للترض لاشعة UV في الارانب المختبرية وتحسن معايير صورة الدم الطبيعية لاعداد كريات الدم الحمر واعداد خلايا الدم البيض ومعايير البروتينات وانزيمات الكبد الى مستوى قريب معنويا من مستوياتها في حيوانات مجموعة السيطرة.

الكلمات الدالة: *E.coli*، المعايير الفسلجية، انزيم L-asparginase، الارانب المختبرية. اشعة

المقدمة

اكتشف انزيم L-asparginase وفاعليته العلاجية بعد ان تم استخلاصه من خنازير غينيا. وقد اتجهت الدراسات الى انتاج انزيم هذا الانزيم من تنمية الاحياء المجهرية بعد ان تبين انه ايضا ذا فاعلية في تثبيط الاورام السرطانية وكانت فاعليته مشابهة لفاعلية الانزيم المستخلص من مصل خنازير غينيا [7] .ان خلايا الورم بطبيعتها لاتتمكن من انتاج حامض الاسباراجين وذلك لعدم امتلاكها انزيم Aspargine synthase لذلك فان بقائها وفاعليتها تكون من خلال حصولها عليه والذي يتم من خلال نضوحه من خلال جهاز الدوران بكميات محددة Circulating pools اعتمادا الى حصول الخلل فيها الذي يفيدها في النمو واستمرار التكاثر وبالتالي الزيادة في الورم. مما تقدم في الحقيقة العلمية السابقة فان الاساس في استخدام انزيم الاسبارجينيز في العلاج من الاورام يكون من خلال قدرته في تحلل الاسبارجين الناضح من جهاز الدوران الى حامض الاسبارتك Aspartic acid والامونيا مسببا في بقاء خلايا الورم غير قادرة في الحصول عليه وبالتالي فقدانها القدرة على اكمال بناء البروتين خلافا للخلايا الطبيعية التي تتمكن من تخليق الاسبارجين [9,10]

بالنظر لما تم ذكره ولعدم التوصل لحد الان الى علاج ناجح يتم من خلاله السيطرة على تلك الامراض وشفائها النهائي فان الدراسات لازالت جارية للوصول الى علاج يمكن من خلاله تحقيق الشفاء. وكان من بين العلاجات الحديثة والتي يؤمل منها في الوصول الى مستوى علاجي ناجح مضاد لحالات السرطان هو في استعمال انزيم الاسباراجينيز البكتيري Bacterial Aspargenase الذي اشارت حالات استعمالاته الاولية الى تاثيره الفعال في معالجة الاورام لدى الاطفال لاسيما منها المتعلقة في سرطان الدم اللمفاوي الحاد. فضلا عن المؤشرات العلاجية الاكثر له التي تبين امكانية علاجه لحالات سرطان الدم النقوي الحاد وسرطان الدم اللمفاوي المزمن [15].

مما تقدم فان هدف الدراسة كان في الحصول على العزلة الميكروبية المنتجة لتراكيز مقبولة من انزيم L-Asparginase وبيان فاعليته في تثبيط التاثيرات الكيموحيوية السلبية للتعرض لأشعة UV في الارانب المختبرية من خلال تحديد فاعلية انزيم L-Asparginase المنتج في تاثيره على معايير الدم الطبيعية والكيموحيوية للارانب المختبرية المعرضة لاشعة UV.

مواد وطرائق العمل

انتاج الانزيم Enzyme production:

سحب 1 مل من معلق البكتريا بعمر 24 ساعة ولقح به 100 مل من وسط الانتاج الذي تكون من غم/لتر: 5 غم من NaCl ، 100 غم من L-asparagine، 10 غم من Maltose، 0.75 غم من KH2PO4 وكان مستوى الـ pH عند 7.0 المعقم باستعمال الموصدة عند 121 ° م لمدة 15 دقيقة في دورق حجمي بسعة 250 مل. تم التحضين عند 35 ° م لمدة 48 ساعة مع التحريك عند 100 دورة/ دقيقة في حاضنة هزازة.

تنقية الانزيم: Enzyme purification:

اعتمدت الطريقة المحورة من قبل [2] التي تضمنت اجراء الطرد المركزي عند 10000 دورة لمدة 12 دقيقة للحصول على الراشح الذي تم احتسابه لتحديد كمية سلفات الامونيوم اللازمة لتمليحة وهي عند 70% . نقل الراشح الى دورق حجمي وادخلت معه قطع ممغنطة (Magnatic stirrer) في ظرف تجميد باستعمال صندوق ثلجي. مسحوق سلفات الامونيوم تم اضافته تدريجيا لحين اكمال سحب الماء بالكامل من قبلها ثم تركت للترسيب والتكتل في الثلاجة لمدة 24 ساعة. بعدها جمعت القطع المترسبة واعيد اذابتها في 10 مل من 50 mM لمحلول Tris hydrochloric . المحلول المتحصل عليه تم تنقيته باستعمال الديلزه من خلال تقنية كروماتوكرافيا التبادل الايوني التي استعمل فيها عمود معبأ مع 2% DEAE cellulose وتم غسله مرتين باستعمال الماء المقطر. استعمل لتنشيطة محلول منشط يتكون من 25 mM HCl و 25 mM NaCl . محلول الانزيم تم اضافته الى العمود مع المحلول المنظم المخفف المتكون من 25 mM من Tris HCl ثم تمت ازاحة الانزيم من خلال اضافة تركيز محلول NaCl المتسلسل التركيز بين (50, 75 and 150 mM) وتم جمع الانزيم المزاح في نفس انابيب الجمع.

تقدير نشاطية الانزيم Assay of Enzyme activity:

قدرت نشاطية الانزيم اعتمادا الى ماجاء في [11] حيث سحب 0.5 مل من محلول الانزيم المنقى واضيف اليه 0.5 مل من محلول L-Aspargine و 0.5 مل من داريء الفوسفيت 0.1 مولاري (pH 8) و 0.5 مل من الماء المقطر ليتكون محلول بحجم 2 مل الذي تم تحضينه عند 37 ° م لمدة 30 دقيقة. تم ايقاف التفاعل بعدها باضافة 0.5 مل من 1.5 مولاري من حامض Tri chloro acetic . بعدها اضيف 3.7 مل من الماء المقطر الى 0.1 مل خليط المحلول و 0.2 مل من محلول Nessler's . اللون المتطور عن تفاعل المضافات في المحلول تم قراءته بعد حضن المزيج عند 20 ° م لمدة 20 دقيقة عند الطول الموجي 450nm باستعمال جهاز Spectrophotometer. استعمل الانزيم مع المادة الخاضعة كمجموعة قياس. وتم اعداد سبعة انابيب لتراكيز متسلسلة من L-Aspargine لاستعمالها في اعداد المنحنى القياسي.كما اعتبر الانبوب الاول في انه القياسي. رسم المنحنى القياسي من خلال العلاقة بين الامتصاصية عند 450 نانوميتر مع تركيز الاسبارجين L-Aspargine (ملغم/مل) بعدها تم قياس نشاطية الانزيم المنتج باستعمال المنحنى القياسي. القياسات تم تحديدها باستعمال 3 مكررات لكل عينة وقيست النشاطية بالوحدة الدولية/ مل (IU/ml).

حيوانات التجربة Animals of Experiment :

أُستعملت في هذه الدراسة 24 أرنب أبيض من نوع Albino تراوحت أوزنها ما بين 750–800 غم، تم الحصول عليها من إدارة البيت الحيواني في كلية الطب البيطري جامعة الموصل. نقلت الأرانب إلى البيت الحيواني الخاص بالدراسة لتربيتها تحت الظروف البيئية الملائمة من حيث التهوية والاضاءة ودرجة الحرارة 23–25 مْ وتوفير مياه الشرب والغذاء المناسب فضلاً عن الأهتمام بنظافة الأقفاص وتبديل نشارة الخشب دورياً خلال فترة التربية كما ورد في (NAS-NRC,2002). وزعت حيوانات التجربة عشوائياً إلى ست مجاميع كل مجموعة منها مكونة من أربعة حيوانات. تم حقن الحيوانات يوميا من انزيم L-Asparginase بالتراكيز الموصى بها وريديا لكل مجموعة. قسمت الجرعة مرتين كل 12ساعة. اما الحيوانات المعرضة للاشعة فوق البنفسجية UV-Lights فقد تم تعريضها للاشعة عند طول موجي 256 نانوميتر وبمعدل 8 ساعة/ يوم لمدة اسبوع واحد. أستمرت التجربة لمدة اربعة اسابيع وكما في الجدول (1).

جدول 1. توزيع مجاميع حيوانات التجربة اعتمادا الى حالات المعاملة ومدة التعرض

رقم المجموعة	المعاملة	التركيز	مدة المعاملة (اسبوع)	
			1	4-2
1	مقارنة	0.0	0.0	0.0
2	التعرض UV	256 nm	UV	0.0
3	انزيم AS	1 مل AS	1 مل AS	1 مل AS
4	انزيم AS	2 مل	2 مل AS	2 مل AS
5	UV+AS	1+256 nm مل	UV	1مل AS
6	UV+AS	2+256 nm مل	UV	2مل AS

UV=الاشعة فوق البنفسجية AS= انزيم L-Asparginase

تشريح حيوانات التجربة Experimental Animals Dissection:

بعد إنتهاء فترة التجربة مباشرةً تم تخدير حيوانات التجربة بحقنها عضلياً بمادة الكيتامين المخدرة Ketamine بجرعة مقدارها(10 ملغم/كغم) ، بعدها شرحت الحيوانات من منطقة الرقبة لإظهار الوريد الوداجي Jugular vein وسحب الدم لأجراء الفحوصات المطلوبة. تم وضع الدم المسحوب من الحيوانات في مجموعتين من أنابيب جمع الدم وكالأتي :

- **المجموعة الأولى** من الأنابيب أحتوت على مادة مانعة لتخثر الدم (EDTA) Ethyl diamine tetra acetic acid . وضع في كل أنبوبة 2.5 مل من الدم وحفظت الأنابيب تحت التبريد بدرجة حرارة 4 مْ لحين إجراء فحوصات الدم اللازمة.
- **المجموعة الثانية** من الأنابيب لاتحتوي على مادة (EDTA) . وضع في كل أنبوبة 10 مل من الدم وتركت الأنابيب لحين تجلط الدم ثم أجريت لها عملية النبذ المركزي عند سرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة للحصول على مصل الدم . تم حفظه تحت التجميد عند درجة حرارة (−20 مْ) لحين إجراء التحاليل الضرورية.

معايير الدم المقاسة HEMATOLOGICAL EXAMINATION

تعداد كريات الدم الحمر Erythrocyte Count:

لغرض عد كريات الدم الحمر تم تخفيف عينة الدم بنسبة (1:200) بأستعمال محلول هايمس Hyme's Solution, وبعد مزج الدم جيداً مع محلول التخفيف وضعت قطرة من معلق الخلايا في حجرة التعداد المخصصة لهذا الغرض وبعد تثبيت الغطاء الزجاجي على شريحة

العد تركت لمدة (1–2) دقيقة لكي تستقر الخلايا. تم حساب عدد كريات الدم الحمر(**n**) في خمس مربعات متوسطة ثم أستخرج العدد الكلي بأستعمال المعادلة الأتية:

RBCs ($\times 10^6/mm^3$) = n× 10000 [1].

قياس حجم خلايا الدم المتراصة Packed Cell Volume: حجم الخلايا المتراصة Packed Cel Volume (PCV) (%) تم تقديرها بأستعمال أنابيب شعرية زجاجية مفتوحة الطرفين إذ تم ملئوها بالدم إلى الثلثين , بعدها سدت أحدى نهايتيها بواسطة الصلصال ووضعت في جهاز الطرد المركزي الخاص بها عند بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، بعدها قُرئ الأنبوب الشعري في مِقراء الراسب الدموي Heamatocrit reader إذ يمثل النسبة المئوية لحجم الخلايا المتراصة [1].

قياس كمية خضاب الدم Estimation of haemoglobin : لتقدير خضاب الدم تم أخذ أنبوبة أختبار حاويه على 5 مل من محلول درابكن المحضر في الفقره (3-5-1-14) وأضيف إلى الأنبوبة 0.02 مل من الدم ثم مزجت المحتويات جيداً بأستخدام المازج الدوار وتركت لمدة 10 دقائق . بعدها تم قياس النفاذيه بأستخدام جهاز المطياف عند طول موجي 540 نانوميتر بعد تصفير الجهاز بوساطة محلول درابكن.تم حساب كمية خضاب الدم بأستعمال المنحني القياسي الذي يمثل العلاقه بين النفاذيه وكمية خضاب الدم لكل 100 مل [13]

حجم كرية الدم الحمراء (MCV):

تم الحصول على معدل حجم كرية الدم الحمراء Mean Corpuscular Volume(MCV) حسابياً بأستعمال المعادلة الأتية

MCV $(\mu m)^3$ = (PCV / RBC)×10 [17].

معدل خضاب الكرية (MCH):

تم الحصول على معدل خضاب الكرية (MCH) Mean Corpuscular Hemoglobin حسابياً بأستعمال المعادلة الأتية

MCV (Pg/cell) = (Hb / RBC)×10 [17].

معدل تركيز خضاب الكرية (MCHC): تم الحصول على معدل تركيز خضاب الكرية Mean Corpuscular Hemoglobin C. حسابياً بأستعمال المعادلة الأتية MCHC (g/dl) = (Hb / PCV)×100 [17].

التعداد الكلي لكريات الدم البيض(WBCs) Total Count of : لغرض عد كريات الدم البيض تم تخفيف عينة الدم بنسبة (1:20) بأستعمال محلول تركي Turkey's Solution, وبعد مزج الدم جيداً مع محلول التخفيف وضعت قطرة من معلق الخلايا في حجرة التعداد المخصصة لهذا الغرض وبعد تثبيت الغطاء الزجاجي على شريحة العد تركت لمدة (1–2) دقيقة لكي تستقر الخلايا. تم حساب عدد كريات الدم البيض(**n**) في المربع المركزي الكبير(أي في25 مربع متوسط).ثم أستخرج العدد الكلي بأستخدام المعادلة الأتية. **200**

WBCs($\times 10^3/mm^3$) = n× [1].

التعداد التفريقي لكريات الدم البيض Differential Count of (WBC):

حضرت مسحات رقيقة من فلم الدم Thin blood film ثم عرضت للهواء الطلق لتجف بعدها صبغت بصبغة ليشمان Leishman stain ولمدة1-2 دقيقة، ثم أضيفت إلى الشريحة ضعف كمية الصبغة من الماء المقطر وتركت لمدة 10-20 دقيقة، ثم غسلت الشريحة بالماء المقطر وبلطف وتركت لتجف في درجة حرارة الغرفة وفحصت الشريحة تحت المجهر الضوئي وتم حساب النسبة المئوية لكل نوع [13].

تقدير البروتين الكلي في مصل الدم Estimation of Total Protein:

أُستخدمت عدة التحليل الجاهزة المصنعة من قبل شركة RANDOX البريطانية لتقدير كمية البروتين الكلي في مصل الدم Serum بالأعتماد على طريقة البايوريت Biuret Method المُعتمِدة على تفاعل أيونات النحاس مع الأواصر الببتيدية للبروتين لتكوين معقد لوني يمكن قياس شدته بأستخدام المطياف الضوئي [5]. تم حساب تركيز البروتين الكلي في العينة(مصل الدم) بأستعمال القانون الأتي :

تركيز البروتين الكلي (g/dl)= إمتصاصية العينة (Sample)×19

تقدير الالبومين في مصل الدم Estimation of Albumin:

لتقدير كمية الالبومين في مصل الدم Serum، أُستخدمت نفس العدة المستخدمة لتقدير البروتين وذلك بالأعتماد على طريقة البايوريت Biuret Method المُعتمِدة على تفاعل أيونات النحاس مع الأواصر الببتيدية للالبومين لتكوين معقد لوني يمكن قياس شدته بأستخدام المطياف الضوئي [5]. تم حساب تركيز الالبومين في مصل الدم حسب المعادلة التالية:

تركيز الالبومين (g/dl)= إمتصاصية العينة ×19 .

تقدير فعالية إنزيمات الدم:

أُستعملت عدة التحليل الجاهزة المصنعة من قبل شركة RANDOX البريطانيه لقياس فعالية إنزيمات الدم للارانب وكما ذكر في [17] التي تضمنت تقدير فعالية انزيم Aspartate amino transaminase (AST) أعتماد على الطريقة اللونية وأستند مبدأ عمل هذه الطريقة على قدرة هذا الإنزيم بالعمل على المادة الأساس حامض الأسبارتيك L-Aspartate وحامض الفا–كيتوكلوتاريك (α- Ketoglutarate).

اما لتقدير فعالية إنزيم ALT Alanine amino transaminase فقد أستند مبدأ عمل هذه الطريقة على قدرة هذا الإنزيم بالعمل على المادة الأساس (حامض الالنين L-alanine) ، (وحامض الفا–كيتوكلوتاريك) α-ketoglutarate حيث يتحول حامض الالنين إلى حامض البايروفيك مباشرة. حددت الفعالية الإنزيمية بالوحدة العالمية لكل لتر(IU/L). **اما لتقدير فعالية إنزيم Alkaline Phosphatase (ALP)** فقد أُستعملت الطريقة اللونية المتبعة من قبل [8]. إذ يعمل إنزيم (ALP) على تحليل المادة

الاساس فوسفات الفينول Phenyl Phosphate إلى فوسفات وفينول في المحيط القاعدي .تم حساب فعالية إنزيم (ALP) مقدرة بـ(IU/L). تم تنفيذ التجربة بموجب التصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design) وأُجري تحليل التباين بإستخدام النموذج الخطي العام (General Linear Model) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز[12]، وفي حالة وجود فروقات معنوية استخدم إختبار دنكن [3] لتحديد معنوية الفروقات مابين المتوسطات المختلفة عند مستوى إحتمالية 0.05 .

النتائج والمناقشة

التاثير في معايير الدم الطبيعية: يبين الجدول (2) تاثير التعرض لاشعة UV والحقن بانزيم L-asparginase في معايير الدم الطبيعية في الارانب المختبرية بعد معاملتها لمدة 28 يوما. تبين من النتائج ان تعرض الارانب المختبرية الى الاشعة فوق البنفسجية سبب في الانخفاض المعنوي ($p<0.05$) للاعداد الكلية من كريات الدم الحمر التي اصبحت عند 4.9×10^{6}/ملم^{3} مقارنة مع اعدادها الكلية في حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت عند 6.5×10^{6}/ملم^{3} . ان حقن الارانب المختبرية من الانزيم بالحجم 1 او 2 مل لم توثر معنويا في الاعداد الكلية لكريات الدم الحمر وان اضافتها الى مجاميع الحيوانات المختبرية المعرضة لاشعة UV قد سببت في تعديل قيم الاعداد الكلية من كريات الدم الحمر الى حالتها الطبيعية وبالتالي اصبحت غير مختلفة معنويا عن قيم اعدادها الكلية في مجموعة الارانب المختبرية في مجموعة السيطرة. وكان الحال نفسه في حالة قيمة خضاب الدم (Hb) حيث ان تعرض الارانب المختبرية الى اشعة UV قد سبب في انخفاض قيمته معنويا واصبح عند9.1 غم/ دسيلتر مقارنة مع قيمته في الارانب في مجموعة السيطرة التي كانت عند 13.2 غم/ دسيلتر وان الحقن من الانزيم بالحجم 1 و 2 مل قد سبب في رجوع قيم خضاب الدم الى حالتها الطبيعية ولم تختلف معنويا عن قيمتها في حيوانات مجموعة السيطرة. ان تاثير التعرض لاشعة UV لم يقتصر على الاعداد الكلية لكريات الدم الحمر وتركيز خضاب الدم انما كان ايضا شاملا لمعظم معايير الدم فقد انخفضت معنويا ايضا حجم الخلايا المرصوصة ونعدل حجم الكرية حيث كانا عند 34.5% و 46.9 3µm على التوالي مقارنة مع قيمها في حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت عند 45.5 % و 67.6 3µm على التوالي. وان حالة الحقن من الانزيم بالحجمين 1 و2 مل قد سبب في استعادت الارانب المختبرية للمستويات الطبيعية للمعيارين المقاسين اللذان لم يختلفا معنويا عن قيمها في حيوانات مجموعة السيطرة. ان حالة معايير كل من MCH و MCHC اللذان تشير قيمهما الى مدى تعرض الحيوانات المختبرية الى الاجهاد في حالة زيادة تركيزهما وهذا ماحصل في حالة تعرض الحيوانات الى اشعة UV حيث ارتفعت معنويا قيمهما الى 28.3 pg/cell و 41.5 g/dl على التوالي مقارنة مع قيمهما في حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت عند 19.7 pg/cell و 28.6 g/dl على التوالي. وقد كانت معاملة الارانب المختبرية بحقنها بالانزيم في حالة معاملتها بالاشعة UV قد سبب في تعديل قيم كل من MCH و MCHC لتكون غير ذا اختلاف معنوي عن مجموعة السيطرة لاسيما في حالة الحقن لمجموعة الارانب بـ 2 مل من الانزيم. إن استعمال الفحوصات الدموية ما هو إلا للاستدلال على التغيرات الفسلجية التي تحصل في انسجة وخلايا الجسم، لاسيما بعد الإصابات الجرثومية او الاجهاد بسبب الامراض الاخرى, وهي ذات أهمية لكونها تتغير بدرجة كبيرة تحت أي مؤثر [5]. أن عدم التغيير المعنوي في خضاب الدم وأعداد كريات الدم الحمر وحجم ومعدل خضاب الكريات في حالة الحقن من انزيم L-asparginase مع التعرض للاشعة UV , قد يكون ناتجاً من فعل الانزيم التضادي للفاعلية السلبية من التعرض للاشعة والمتمثلة في حصول الطفرات او حالات التسرطن وتغير في تعاقب النيوكلوتيدات المكونة للحامض النووي DNA التي تستمر في بقائها وفاعليتها من خلال تغذيتها وحاجتها الى الحامض الاميني L-aspargine وبالتالي التاثير في التعبير للجينات المسؤولة عن انتاج المركبات البروتينية التي منها الانزيمات او الهورمونات المحفزة لتكوين كريات الدم الحمر ومكونات الدم الاخرى من نخاع العظم كهورمون Erthropoietin [14].

جدول 2. تاثير التعرض لأشعة UV والحقن بانزيم L-Asparginase في معايير الدم الطبيعية في الارانب المختبرية.

رقم المجموعة	المعاملة	التركيز	RBCs ($\times 10^{6}$ /mm^{3})	Hb (g/dl)	PCV (%)	MCV (µm^{3})	MCH (Pg/cell)	MCHC (g/dl)
1	السيطرة	0.0	6.5±0.44 a	13.2±0.6 a	45.5±2.0 A	67.6±2.7a	19.7±0.6 c	28.6±0.6 C
2	التعرضUV	256 nm	4.9±0.22b	9.1±0.2b	34.5±0.6c	46.9±1.3C	28.3±0.5a	41.5±0.A
3	انزيمAS	1 مل AS	6.2±0.17a	13.2±0.5a	45.0±1.5a	64.7±1.1b	22.8±0.3b	35.3±0.5b
4	انزيمAS	2 مل	6.5±0.29a	13.1±0.2a	44.3±0.5a	66.6±1.3a	22.3±0.4b	33.4±0.2b
5	UV+AS	1+256 nm مل	6.4±0.42a	13.8±1.2a	43.1±3.8b	67.9±0.1a	23.1±0.2b	34.1±0.3b
6	UV+AS	2+256 nm مل	6.3±0.08a	13.2±0.2a	43.6±0.4b	65.9±0.9b	20.7±0.5c	27.9±0.4C

UV=الاشعة فوق البنفسجية AS= انزيم L-Asparginase ، –كانت فعالية انزيم L-asparginase عند 72 وحدة دولية/ مل،

a–c: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

وان فاعلية انزيم L-asparginase تكون في حجب تلك التاثيرات السلبية من خلال فعله في تحليل L-aspargine الموجود في الدم وجعله غير متوفرا لتلك الخلايا مما يسبب موتها وعدم فاعليتها، وان ذلك يكون ناتجا من عدم قدرتها على بناء البروتينات الخاصه بها [4]. ان حالة التخلص من فاعلية الخلايا المطفرة او المتسرطنة ستسبب في تثبيط فاعليتها وبالتالي في السماح لانجاز الغعاليات الايضية واليات انتاج كريات الدم الحمر بالشكل الاعتيادي وبالتالي عدم انتاج خلايا غير ناضجة من كريات الدم الحمر في نخاع العظم. الذي ظهر في النتائج في عدم حصول تغيير في معايير صورة الدم ,وقد اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره [16].

التاثير في خلايا الدم البيض:

ان تاثير التعرض لأشعة UV والحقن بانزيم L-Asparginase في الاعداد الكلية ونسب خلايا الدم البيض في الارانب المختبرية بعد التعرض لمدة 28 يوما قد وضحها الجدول (3). تبين من النتائج ان حالة العرض لاشعة UV قد سببت في ارتفاع اعداد خلايا الدم البيض الكلية معنويا ($p<0.05$) وكانت عند 10×12.20 ^{3}/مايكروليتر عند المقارنة مع اعدادها الكلية في حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت عند 10×8.17 ^{3}/مايكروليتر. ان حالة الحقن من الانزيم قد سببت عدم الاختلاف المعنوي في اعداد خلايا الدم البيض سواء في المجاميع من الحيوانات التي حقنت بالانزيم لوحده او المحقونة بالانزيم والمعرضة لاشعة UV. ان مايؤكد التاثير السلبي للتعرض للاشعة هو الزيادة المعنوية لنسبة كريات الدم البيض اللمفية Lymphocytes وكذلك وحيدة الخلية Monocytes حيث كانت نسبتها في مجموعة الحيوانات المعرضة للاشعة هي عند 75.3 و 3.6% على التوالي مقارنة مع نسبتها في حيوانات مجموعة السطيرة التي كانت عند 63.8 و 1.4% على التوالي وقابلها انخفاض معنوي في نسبة خلايا العدلات Neutrophils التي كانت 20.2% مقارنة مع نسبتها في حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت عند 33.9% وان الحالات المشار اليها قد تم تحسن نسبتها واصبحت غير ذا اختلاف معنوي مع مجموعة السيطرة في حالة الحقن بانزيم L-asparginase لمجاميع الحيوانات المعرضة باشعة UV. كما لم تختلف نسبة كل من الخلايا البيض القعدية والحامضية في جميع المعاملات لحيوانات التجربة.

جدول 3. تاثير التعرض لأشعة UV والحقن بانزيم L-Asparginase في اعداد ونسب خلايا الدم البيض في الارانب المختبرية

رقم المجموعة	المعاملة	التركيز	WBCs (× 103/µL)	Lym	Net	Mon	Eso	Bas
				(%)				
1	السيطرة	0.0	8.17±0.91 B	63.8±0.3 d	33.9±0.2 A	1.4±0.2 c	1.0±0.1 a	0.0±0.0 a
2	تعرض UV	256 nm	12.20±0.5 A	75.3±0.4 a	20.2±0.3 D	3.6± 0.2 a	1.0±0.1b	0.0±0.0 a
3	انزيم AS	1 مل AS	8.87±0.3 B	66.1±0.5 c	32.1±0.5 B	1.1±0.1c	0.7±0.1c	0.0±0.0 a
4	انزيم AS	2 مل	8.45±0.26 B	68.1±0.1 b	28.8±0.1 C	2.0±0.2b	1.1±0.1a	0.0±0.0 a
5	UV+AS	1+256 nm مل	9.15±0.3 B	67.0±0.4 De	31.3±0.5 B	1.1±0.04c	0.7± 0.1 c	0.0±0.0 a
6	UV+AS	2+256 nm مل	8.80±0.6 B	63.0±0.2 d	34.7±0.3 A	1.9±0.1c	0.5±0.1d	0.0±0.0 a

UV=الاشعة فوق البنفسجية AS= انزيم L-Asparginase، –كانت فعالية انزيم L-asparginase عند 72 وحدة دولية/ مل.

a–d: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

ان تاثير انزيم L-asparginase في تحسن الاعداد الكلية من خلايا الدم البيض لمجاميع الارانب المختبرية المعاملة باشعة UV يكون ناتجا عن فعله التثبيطي للتاثيرات السلبية المحدثة من التعرض للاشعاع والمتمثلة في حصول حالات التطفير او التسرطن وهي من خلال تحطيم الحامض الاميني L-aspargine المختص في تغذية تلك الخلايا وحرمانها من المصدر البروتيني الاساس لتغذيتها وبالتالي في التسبب بموت تلك الخلايا وزوال التاثير السلبي لوجودها وكما ذكر في مناقشة التاثير في اعداد كريات الدم الحمر. وان حالة التحسن في نسب الخلايا اللمفية والعدلات ووحيدة الخلية يكون ناتجا عن نفس الفاعلية للانزيم.

التاثير في معايير البروتين:

يبين الجدول (4) تاثير التعرض لأشعة UV عند الطول الموجي 254 نانوميتر والحقن بانزيم L-Asparginase في معايير بروتين بلازما الدم في الارانب المختبرية. تبين من النتائج ان تاثير التعرض لاشعة UV عند الطول الموجي المشار اليه قد سبب في انخفاض تركيز البروتين الكلي والالبومين والكلوبيولين معنويا ($p<0.05$) في بلازما الدم وكانت عند 4.27 و 2.35 و 1.92 غم/ديسليتر على التوالي مقارنة مع قيم تركيزها في دم حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت عند 5.75 و 3.47 و 2.27 غم/ديليلتر على التوالي. ان حالة المعالجة بالحقن بانزيم L-asparginase قد سببت في تحسن المعايير اعلاه معنويا لتكون قريبة من قيمتها في مجموعة السيطرة لاسيما في حالة البروتين الكلي. اما قيم الالبومين فان حالة الحقن بحجم 1 مل من الانزيم لمجموعة الحيوانات المعرضة للاشعة فانها لم

تسبب في احداث تحسن معنوي في قيمته وكان عند 2.32 غم/ديسليتر ولكن الحقن بمستوى 2 مل منه لمجموعة الحيوانات المعرضة للاشعة فانها قد سببت في التحسن المعنوي من تركيز الالبومين ليكون عند 2.68 غم/ديسليتر. اما حالة الحقن من الانزيم لمجاميع الحيوانات المعرضة للاشعة فانها سببت في الزيادة المعنوية في قيم الكلوبيولين حيث كانت في حالة الحقن بالحجم 1 و 2 مل للحيوانات المعرضة للاشعة عند 3.48 و 3.22 غم/ديسليتر على التوالي. كما ان قيمة الكلوبيولين في مجاميع الحيوانات المحقونة بالانزيم بالحجمين 1 و2 مل وكانت غير معرضة للاشعة قد ارتفع معها تركيز الكلوبيولين لتكون عند 2.72 و 2.92 غم/ ديسليتر على التوالي.

ان تاثير التعرض للاشعة UV للارانب المختبرية قد سبب في الخفض المعنوي لجميع معايير البروتين في الدراسة ويمكن ان يكون ذلك من التاثير التثبيطي او المسرطن الذي احدثته حالة التعرض للاشعة اعلاه اذ ان تاثيرها يكون في التاثير على الحالة الجينية وترتيب النيوكلوتيدات في شريط الحامض النووي DNA وبالتالي في ان التشفير سيكون لانواع من البروتين غيرها المشفر لها اصلا في شريط DNA.

جدول 4. تاثير التعرض لأشعة UV والحقن بانزيم L-Asparginase في معايير بروتين البلازما في الارانب المختبرية

رقم المجموعة	المعاملة	التركيز	Total proteins	Albumins	Globulin
			(g/dl)		
1	السيطرة	0.0	5.75±0.20 A	3.47±0.02 a	2.27±0.11 C
2	التعرضUV	256 nm	4.27±0.22 B	2.35±0.02 c	1.92±0.13 D
3	انزيمAS	1 مل AS	5.67±0.22 A	2.95±0.08 a	2.72±0.04 B
4	انزيمAS	2 مل	6.05±0.17 A	3.13±0.04 a	2.92±0.11 B
5	UV+AS	1+256 nm مل	5.80±0.14 A	2.32±0.07 c	3.48±0.06 A
6	UV+AS	2+256 nm مل	5.90±0.12 A	2.68±0.04 b	3.22±0.02 A

UV=الاشعة فوق البنفسجية AS= انزيم L-Asparginase ، –كانت فعالية انزيم L-asparginase عند 72 وحدة دولية/ مل.

a–d: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

وان التحسن في تركيز كل من البروتين الكلي والالبومين تاتي من الالية المثبطة لحالات التطفير والحالات السرطانية من قبل انزيم L-asparginase المحقون وكما ذكر سابقا. اما ارتفاع تركيز الكلوبيولين معنويا اكثر من مستواه في مجموعة السيطرة فان ذلك يشير الى حصول نوع من الاستجابة المناعية ناتجة عن الحقن بالانزيم التي ظهرت بشكل الارتفاع المعنوي في تركيز الكلوبيولين وكما ذكر [4].

التاثير في نشاطية انزيمات الكبد:

ان فاعلية الحقن بانزيم L-Asparginase لمدة 28 يوما لمجامع الارانب المختبرية المعرضة وغير المعرضة لاشعة UV في نشاطية انزيمات الكبد قد وضحها الجدول (5). وجد من النتائج ان حالة تعرض الارانب المختبرية الى اشعة UV قد سببت في زيادة نشاطية انزيمات كل من AST و ALT و ALP معنويا عند ($p<0.05$) اذا كانت قيمها عند 52.3 و 48.7 و 207 (IU/ml) على التوالي مقارنة مع قيمها في مجموعة حيوانات السيطرة التي كانت عند 32 و 43.6 و 141 (IU/ml) على التوالي. ان حالة حقن الحيوانات المختبرية بالانزيم قد سببت في التحسن المعنوي لقيم الانزيمات المشار اليها واصبحت غي مختلفة معنويا عن قيمها في مجموعة السيطرة. ان حالة زيادة قيم انزيمات الكبد المشار اليها في حالة التعرض لاشعة UV يمكن ان تكون ناتجة عن فعل التسرطن او التطفير الناتجة عن التعرض لها وماتسببة في خلل في الفعاليات الايضية وحالة ومستويات الانزيمات في الكبد. اما حالة التحسن المعنوي الناتجة عن الحقن بالانزيم فانها ناتجة عن فعالية الانزيم التي ذكرت سابقا في تحديد الخلايا السرطانية وقتلها من خلال منع وصول المصدر البروتيني لها وهو حامض L-aspargine الذي سيتسبب في موت تلك الخلايا وبذلك ازالة الاجهاد الناتج عنها في تلك الخلايا مما يتنج عنه عودة مستويات انزيمات الكبد الى حالتها الطبيعية في الكبد وكما ذكر [6 ، 18].

جدول 5. تاثير التعرض لأشعة UV والحقن بانزيم L-Asparginase في نشاطية الانزيمات في الارانب المختبرية.

رقم المجموعة	المعاملة	التركيز	AST	ALT	ALP
			(IU/ml)		
1	السيطرة	0.0	32.0±2.1b	43.6±2.6b	141±3.5b
2	التعرضUV	256 nm	52.3±1.0a	48.7±2.3a	207±4.7a
3	انزيمAS	1 مل AS	33.6±1.1b	43.2±1.3b	140±2.6b
4	انزيمAS	2 مل	33.2±3.4b	43.5±2.6b	±4.9b143
5	UV+AS	1+256 nm مل	34.5±1.7b	44.2±1.3b	9±1.8b13
6	UV+AS	2+256 nm مل	33.2±1.4b	44.3±2.0b	±2.5b140

UV=الاشعة فوق البنفسجية AS= انزيم L-Asparginase ، –كانت فعالية انزيم L-asparginase عند 72 وحدة دولية/ مل.

a–b: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

المصادر

1) Bregman, A.S. 1978. The formation of auditory streams.In J.Requin (Ed),Attention and Performance Vll.Hillsdale,New Jersey: Lawrence Erlbaum.

2) Dhevagi, P. and E. Poorani, 2006. Isolation and characterization of L-Asparaginase from marine actinomycetes. Ind. J. Biotech., 5: 514-520.

3) Duncan.D .B. 1955.Multiple range and multiple Ftest,Biometric,11,1-42.

4) Graham, M.L. 2003. Pegaspargase: A review of clinical studies. Adv. Drug Delivery Rev., 55: 1293-1302.

5) Guyton, Arthur C.; Hall, John E. 2006. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology with Student Consult Online Access (11th ed) Philadephia :Elsevier Saunders ISBN :216-240.

6) Hosamani, R., 2012. Studies on the production of L-asparaginase an antitumor agent from filamentous fungus-Fusarium equiseti. Ph.D. Thesis, Karnatak University, Dharwad, India.

7) Jain, R., K.U. Zaidi, Y. Verma and P. Saxena, 2012. L-Asparaginase: A promising enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukiemia. People's J. Sci. Res., 5: 29-35.

8) Kind, P.R.N. and King, E.J. 1954. Estimation of plasma phosphate by determination of hydrolysed phenol with amino antipyrine. J. Clin. Pathol., 7: 322-326.

9) Kumar, K. and N. Verma, 2012. The various sources and application of L-asparaginase. Asian J. Biochem. Pharma. Res., 3: 197-205.

10) Pedreschi, F., K. Kaack and K. Granby, 2008. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. Food Chem., 109: 386-392.

11) Pourhossein, M. and H. Korbekandi, 2014. Cloning, expression, purification and characterisation of Erwinia carotovora L-asparaginase in Escherichia coli. Adv. Biomed. Res., Vol. 3. :10-41.

12) SAS, (2004). Gaide personal computer (ver.7) inst. Inc. Cary.Nc. USA.

13) Schottelius J, Gerken J,Centurion_Lara A. 1988. Comparative Studies on new world Leishmania and Trypanosoma by lectin tests and concanavalin A precipitation of /labelled cells.J.clin Chem Clin Biochem 26:834-835.

14) Serin, R.C. 2001. Intermediate measures of treatment success. Compendium 2000, pp. 198-201. Correctional Service of Canada, Ministry of Supply and Services.

15) Stecher, A.L., P.M. de Deus, I. Polikarpov and J. Abrahao-Neto, 1999. Stability of L-asparaginase: An enzyme used in leukemia treatment. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 74: 1-9.

16) Thongsong,S.K;Thongsong.B.&Chavananikul,V. 2008. Blood haematological-cholesterol profile and antibody titer response of Broilers with added probiotic Containing both bacteria and yeast. J. Biochem, 12: 104-112.

17) Tietz, Y. 2005. Clinical Chemistry, 6 th ed. McGraw- Hill, New york. 825.

18) Verma, N., K. Kumar, G. Kaur and S. Anand, 2007. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. Crit. Rev. Biotechnol., 27: 45-62.

Ability of L-Asparginase Produced from Locally *E.coli* Isolates on Negative Effect of UV Rays on Laboratory Rabbits

Marwa H. AbdAlwahab [1] , Karkaz M. Thalij [2]

[1] *Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, Tikrit, Iraq*
[2] *College of Agriculture , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract

This study was carried out to illustrate the effective of injected L-asparginase enzyme produced from E.coli isolate at 1 and 2 ml on natural and biochemical blood characterized in laboratory rabbits induced tumor through exposure to UV rays with a wavelength 256 ηm for 28 days. Results indicated that the exposure to UV arrays from laboratory rabbits have caused an significantly ($p< 0.05$) reducing the total count of red blood corpuscular RBCs which became at $3.0\times10^6/mm^3$ and the hemoglobin concentration at 9.1 g/dl compared with the same value at animals control group which was at $6.5x10^6/mm^3$ and 13.2 g/dl, respectively, as well as increased the total count of white blood cells WBCs and lymphocytes percentage deposited neutrophils percentage. Also, was caused significantly decline of total protein, albumin and globulin concentration in rabbits plasma and increase its liver enzymes activates for Aspartate amino transferase (AST), Alanine amino transferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP), which became at 52.3, 48.7 and 207 IU/ml, respectively, compared with the control group values at 32.0, 43.6, 141 IU/ml, respectively. The injection of an L-asparginase enzyme at 1 and 2 ml contains (72 IU/ml) due to inhibition of negative influence of UV rays altered in laboratory rabbits and improved the natural blood picture as red blood corpuscular, white blood cells, proteins parameters and liver enzymes activities significantly to close levels in control group animals. It can be concluded that bacterial isolates from E.coli species were as efficient in the L-asparginase enzyme production and the effectiveness of this enzyme were high in improving physiological parameters of laboratory rabbits exposed to UV rays.

Key words: *E.coli*, Physiological parameters, L-asparginase enzyme, Rabbits animals.