

**فعالية انزيم الادنوسين دي امينيز في دم الاطفال المصابين بالبيتا-ثلاسيميا
الكبيرة في محافظة نينوى**

سعد غاتم صالح	ولاء عبد الواحد الجوادي
قسم علوم الحياة	قسم صحة المجتمع
كلية العلوم	المعهد التقني
جامعة الموصل	الموصل

(تاريخ الاستلام 2002/2/25 ؛ تاريخ القبول 2002/9/1)

الملخص

تم دراسة فعالية انزيم الادنوسين (EC:3.5.4.4.) في دم (20) طفل مصاب بالبيتا-ثلاسيميا الكبيرة غير المعالجة تراوحت اعمارهم بين ستة اشهر إلى سنة واحدة ومن كلا الجنسين و(52) طفل مصاب بالبيتا-ثلاسيميا الكبيرة والمعالجين بنقل الدم والادوية تراوحت اعمارهم بين سنة ونصف إلى احدى عشرة سنة ومن كلا الجنسين مع (50) طفل طبيعي تراوحت اعمارهم بين ستة اشهر واثننا عشر سنة ومن كلا الجنسين أيضاً .

اظهرت النتائج ان معدل فعالية الادنوسين دي امينيز التي عبر عنها بتانومول من الادنوسين المزال منه الامين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين في متحلل كريات الدم الحمراء والمصل في المرضى غير المعالجين هي (0.9±35.1) و (5.9 ± 164.21) على التوالي، بينما كان معدل الفعالية في المعالجين (0.46±25.06) و (2.53±86.32) في متحلل كريات الدم والمصل على التوالي، وبالمقارنة مع الاطفال الطبيعيين (0.3-16.66) و (1.26-62.8)، كما اظهرت النتائج وجود زيادة معنوية كبيرة.

Adenosin Deaminase Activity in Children Blood Affected by Major β -Thalassaemia in Nenava Governorate

Saad G. Salih
Department of Biology
College of Science
Mosul University

Wala A. Al-Jawadi
Department of Community Health
Institute of Technology
Mosul

ABSTRACT

Adenosine deaminase (EC:3.5.4.4.) activity in serum of (20) cases of untreated β -thalassaemia major, aged six month to one year of both sexes, and (52) children of treated β -thalassaemia major, aged 1.5 to 11 years of both sexes, and (50) normal children, aged six month to 12 years of both sexes also.

In the present investigation the activity of adenosine deaminase in blood of untreated and treated cases of β -thalassaemia major was compared with that in normal children. The results obtained showed adenosine deaminase specific activity in haemolysate of red cells and serum of untreated children was (164.14 ± 5.6) and (35.1 ± 0.9) n.mole of adenosine deaminated/min/mg protein respectively, while the mean value of activity in treated children was (86.4 ± 2.53) and (25.06 ± 0.46) in the haemolysate and serum respectively compared with (62.80 ± 1.26) and (16.66 ± 0.3) n.mole. Statistical analysis showed a significant increase of activity in both cases.

المقدمة

يعد مرض فقر دم البحر المتوسط (الثلاسيميا) Thalassaemia من الأمراض الوراثية للهيموكلوبين Haemoglobinopathies الأكثر انتشاراً في العالم . ولوحظ ازدياد وسرعة في حجم مشكلة هذا الخلل الوراثي وتفاقم عباها خصوصاً في منطقة شرق المتوسط الذي يتسم بخصائص ثقافية وديمغرافية تتطلب دراسة خاصة في مثل هذا النوع من الأمراض الوراثية (منظمة الصحة العالمية، Cappellini et al., 2000; 1999).

تعد الثلاسيميا نوع من فقر الدم الحاد الذي يتميز بنقص في إنتاج سلسلة معينة من سلاسل الكلوبين (Olivieri, 1999; Al-Awamy, 2000) إذ غالباً ما يكون هناك خلل في الجينات يؤدي إلى نقص وراثي في نسبة إنتاج واحد أو أكثر من سلاسل متعدد الببتيد الطبيعية للهيموكلوبين . وهكذا عندما تكون سلسلة α هي المختزلة فإن الحالة تسمى الفا - ثلاسيميا (α -Thalassaemia)، وإذا كانت السلسلة المختزلة β فإن الحالة الناتجة هي بيتا-ثلاسيميا (β -Thalassaemia) هذا ما اتفق عليه كل من (Clegg and Weatherall, 1980; Weatherall, 1999). وان بيتا ثلاسيميا الكبيرة هي أكثر أنواع الثلاسيميا أهمية حيث يصاب الطفل بالثلاسيميا الكبيرة عندما يكون أبواه حاملين للصفة الوراثية المسؤولة عن

المرض، وتظهر علامات المرض بين الشهر الثالث والشهر الثامن عشر من العمر. والعلامات الرئيسية هي فقر دم تحللي مزمن يؤدي إلى هبوط في مستوى الهيموكلوبين (فقر دم حاد) يحتاج معه المريض إلى نقل دم بصورة مستمرة (Hoffbrand and Pettit, 1988) مما يؤدي إلى زيادة ترسب الحديد بسبب تكسر كريات الدم الحمر وزيادة إمتصاص الحديد في الامعاء الذي يؤدي إلى تأخر في النمو وتشوه العظام واضطراب عمل الغدد الصم وهبوط القلب والتهاب الكبد الفايروسي الذي ينتهي بتشمع الكبد، إذ يؤثر بصورة عامة وشاملة على جميع اجزاء الجسم ويؤثر في فعالية الكائن الحي مما يؤثر سلباً على دوره الفعال باعتباره كائناً حياً في المجتمع. وتنتهي الحالة بالموت باعمار دون الثلاثين (Cappellini et al., 2000).

يعتمد تشخيص التلاسيميا من خلال العلامات السريرية التي تظهر على المريض وبالأخص علامات فقر الدم الحاد ثم فحص صورة الدم الكاملة ودراسة نسب متغيرات الهيموكلوبين خصوصاً زيادة نسبة هيموكلوبين F وهيموكلوبين A₂. ولقد سجلت حالات عديدة من التلاسيميا في العراق. وبما ان هذا المرض الوراثي المميت يعدّ حالة اجتماعية خطيرة فقد انصبت الدراسات حول هذا المرض ان انزيم (Adenosine deaminase) ويختصر (ADA) احد الانزيمات الرئيسية في ايض البيورينات والذي يحفز الازالة الامينية غير العكسية بتفاعل التحلل المائي للادينوسين وبحولته الى الاتوسين مع تحرر الامونيا (Franco and Centelles, 1989; Mikaeil and Al-Chalabi, 2000). يقع هذا الانزيم في وسط مسار معقد يؤدي الى تكوين حامض اليوريك من نيكليوتيدات البيورين. الادينوسين دي امينيز من الانزيمات واسعة الانتشار في العديد من الانسجة والخلايا. وتم التعرف على فعالية الانزيم في معظم انسجة الانسان. فقد اشار العديد من الباحثين (Hamill and Tristch, 1976 ; Schrader and Pollara, 1978 ; Mikaeil and Al-Chalabi, 2000) الى وجود فعالية انزيم الادينوسين دي امينيز في الطحال والكبد والكلية فضلاً عن وجوده في مصل وكريات الدم الحمراء للانسان.

يعد الادينوسين دي امينيز ذو أهمية خاصة إذ يوجد هناك عدد من الدلائل التي تدعم دوره في عملية التنظيم والتمايز والنمو الخلوي (Franco and Centelles, 1989). وان للقياس الكمي للادينوسين دي امينيز فوائد من الناحية السريرية، فهو مفيد لتشخيص العديد من الأمراض، ويعتقد ان الانزيم من الانزيمات المستهدفة للمعالجة الكيماوية. وحيث لا توجد معلومات عن دراسة انزيم الادينوسين دي امينيز في مرضى التلاسيميا لذا استهدف البحث الحالي كمحاولة اولى لدراسة هذا الانزيم في مصل ومتحلل كريات الدم الحمراء لحالات مرضى التلاسيميا المعالجين وغير المعالجين بالمقارنة مع الحالات الطبيعية.

طرائق العمل

1- العينات وجمع المصل:

تم جمع الدم الوريدي وبدون استعمال التورنيكا (Tourniquet)، من (20) طفل شخصت اصابته بالبيتا - ثلاسيميا الكبيرة حديثا وغير معالجين بنقل الدم ومن كلا الجنسين تراوحت اعمارهم بين (6-12) شهر، وجمع الدم من (52) طفل مصاب بالبيتا-ثلاسيميا الكبيرة ومن المسجلين في مركز الثلاسيميا في مستشفى ابن الاثير التعليمي للاطفال بالموصل والمستمرين على العلاج، وباعمار تتراوح بين (1-11) سنة، مع مراعاة عدم تحلل الدم (Maiti,1995) ويتم اهمال أي عينة دم متحللة في جميع الفحوصات وخصوصا قياس الانزيمات. وللحصول على المصل بوضع (5-4) مللتر من الدم في درجة حرارة (25) درجة مئوية لحين تخثره ومن ثم يفصل المصل عن باقي مكونات الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي لمدة (15) دقيقة وبسرعة (3000 X g) ويتم سحب المصل (الراشح) بواسطة الماصة الدقيقة micropipette.

2- فصل كريات الدم الحمراء:

لفصل كريات الدم الحمراء لوحدها يستخدم دم غير مختثر، ويتم ذلك بوضع (5-4) مللتر من الدم المسحوب في انبوب بلاستيكي ذو غطاء محكم وحاوي على سترات الصوديوم sodium citrate مسانع للتخثر بحجم (0.5) مللتر والرج برفق، ثم وضعه في جهاز الطرد المركزي لمدة (15) دقيقة وبسرعة (X g 3000) وذلك لفصل الكريات الحمراء.

بعد ذلك تم غسل كريات الدم الحمراء المعزولة بمحلول كلوريد الصوديوم (0.9%). ولثلاث مرات وفي كل مرة يزال الراشح وتصبح كريات الدم الحمراء جاهزة للتحلل (Beulter et al., 1977). واذيف اليها (19) حجما من محلول (0.9% كلوريد الصوديوم) ومزج جيدا ثم وضع في الحاضنة المبردة بدرجة (4) درجة مئوية لمدة (4) ساعات، وطرقت بجهاز الطرد المركزي لمدة (20) دقيقة وبسرعة (X g 9000) لغرض ترسيب اغشية كريات الدم الحمراء، واخذ الراشح الحاوي على الاتزيم (Price and Stevens, 1989).

3- قياس فعالية الادينوسين دي امينيز:

استخدمت طريقة (Al-Chalabi and Mikaeil, 2000) وذلك باضافة (100) μ من الراشح المحضر من كريات الدم الحمراء كما في الفقرة اعلاه الى خليط التفاعل، وتحضن في الحمام المائي بدرجة (37) درجة مئوية ولمدة (60) دقيقة. ثم بعد ذلك تحديد كمية الامونيا الناتجة لونييا باستخدام كواشف مارباخ Marbach's، وذلك باضافة (3) مل من محلول الفينول (100 ملي مولار فينول و 0.19 ملي مولار صوديوم نايتربروسايد) و (3) مللتر من محلول هايبيوكلورايد الصوديوم القاعدي (11ملي

مولار من هايبوكلورايد الصوديوم NaOCl و 125 ملي مولار من هيدروكسيد الصوديوم) ومزج المحلول جيدا ووضع في الحمام المائي مرة ثانية بدرجة حرارة (37) درجة مئوية ولمدة (30) دقيقة وتمت قراءة شدة الامتصاص عند الطول الموجي (630) نانومتر. كما تم التعبير عن الفعالية النوعية للأدينوسين دي أمينيز بنانومول من الأدينوسين المزال منه الأمين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين واستنادا إلى منحنى قياسي لكبريتات الأمونيوم أعد لغرض الحساب.

4- تقدير البروتين :

تم تقدير البروتين الكلي في مصل ومتحلل كريات الدم الحمراء في مرضى التلاسيميا المعالجين وغير المعالجين والطبيين بطريقة لوري (Lowry et al., 1951). وذلك باستخدام تركيز مختلفة من محلول البومين المصل البقري لتحضير منحنى قياسي لغرض حساب كمية البروتين.

النتائج والمناقشة

تم تحديد مقارنة فعالية أنزيم الأدينوسين دي أمينيز (ADA) في مصل ومتحلل كريات الدم الحمراء للأطفال المصابين بالبيتا-تلاسيميا الكبيرة غير المعالجين والمعالجين والأصحاء وذلك باستخدام الطريقة اللونية للقياس (Al-Chalabi and Mikaeil, 2000).

يوضح الجدول (1) فعالية أنزيم الأدينوسين دي أمينيز في مصل ومتحلل كريات الدم الحمراء للأطفال الطبيعيين غير المصابين والمعالجين وغير المعالجين من المصابين بالبيتا-تلاسيميا حيث كانت في الأطفال الطبيعيين (0.30 ± 16.66) و (1.26 ± 62.80) نانومول من الأدينوسين المزال من الأمين /دقيقة /ملغم بروتين في مصل ومتحلل كريات الدم الحمراء على التوالي. وازدادت لتصبح (0.93 ± 35.09) و (5.64 ± 164.14) نانومول من الأدينوسين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين في مصل ومتحلل كريات الدم الحمراء للمرضى غير المعالجين على التوالي ثم انخفضت قيمة الأدينوسين في المرضى المعالجين (0.46 ± 25.06) و (2.53 ± 86.37) نانومول من الأدينوسين المزال منه الأمين /دقيقة /ملغم بروتين في مصل ومتحلل كريات الدم الحمراء على التوالي.

وعند اجراء المقارنة والتحليل الإحصائي بين الأطفال الطبيعيين والأطفال المصابين غير المعالجين والأطفال المصابين المعالجين ظهرت زيادة معنوية في الفعالية وكما مبينة في الجدول (1) وكانت النسبة المئوية للزيادة كبيرة حيث بلغت (111%) لمصل الدم و (161%) لمتحلل كريات الدم الحمراء في المرضى غير المعالجين مقارنة مع الأطفال الطبيعيين وانخفضت الزيادة بعد العلاج لتصل إلى (50%) في مصل الدم و (37%) في متحلل كريات الدم الحمراء في الأطفال المعالجين مقارنة مع الأطفال الطبيعيين.

إن أنزيم الأدينوسين دي أميناز من الأنزيمات المهمة في التشخيص (Al-Chalabi and Mikaeil, 2000) وهو واسع الانتشار في العديد من الأنسجة والخلايا، وإن تحديد فعالية هذا الأنزيم في حالات البنتا-تلاسيميا الكبيرة تعد الدراسة الأولى من نوعها ولم يسبق أن تنشر أية معلومات عن فعالية هذا الأنزيم في حالات التلاسيميا بصورة عامة، هناك بحوث تشير إلى زيادة فعاليته في كريات الدم الحمراء في حالات فقر الدم التخللي وأمراض السرطان (Chottiner, et al., 1987; Kabayashi et al., 1993). اشارت النتائج الحالية (الجدول 1) وجود زيادة معنوية كبيرة في فعالية الأنزيم لمتحلل كريات الدم الحمراء وكذلك مصلى الدم للأطفال المصابين غير المعالجين مقارنة مع الأطفال الطبيعيين، وكانت الزيادة في الفعالية بنسبة اقل في الأطفال المعالجين مقارنة مع الأطفال الطبيعيين وربما يعود هذا نتيجة لنقل واصفاة دم جديد. ان هذه الزيادة في فعالية الأدينوسين دي أميناز تؤكد حدوث اضطرابات في اجهزة الجسم ولاسيما الكبد والطحال مما ادى الى اصابتها وبالتالي تتخر خلاياها وتسرب محتوياتها من الأنزيم الى المصل وبالتالي إزدياد فعالية الأنزيم بالشكل الملحوظ في النتائج .

الجدول 1 : فعالية أنزيم الأدينوسين دي أميناز في مصلى و متحلل كريات الدم الحمراء في الاطفال المصابين بالبنتا-تلاسيميا الكبيرة غير المعالجين والمعالجين والحالات الطبيعية.

معدل الفعالية النوعية/ نانومول ادينوسين مزال منه الامين /دقيقة /ملغم بروتين ± الخطاء القياسي				الحالات المدروسة
مصل الدم	النسبة المئوية للزيادة	متحلل RBC	النسبة المئوية للزيادة	
0.30±16.66	صفر	1.26±62.8	صفر	الحالات الطبيعية
0.9±35.1	111	5.6±164.14	161	المرضى غير المعالجين
*0.001	----	0.001	---	قيمة P بين المعالجين والحالات الطبيعية
0.46±25.06	50	2.53±86.32	37	المرضى المعالجين
*0.001	----	*0.001	---	قيمة P بين المعالجين والحالات الطبيعية

* هنالك فرق معنوي عند مستوى المعنوية $P \leq 0.05$

لقد كانت الزيادة في الفعالية في جميع حالات الإصابة بالبنتا-تلاسيميا الكبيرة وعلى العكس مما وجدته (Al-Chalabi and Mikaeil, 2000) من كون الزيادة محدودة في بعض حالات الحمى التيفوئيدية وحمى مالطا. إن وجود أنزيم ما وبتركيز معين في المصل الطبيعي والذي تعكسه فعاليته، وقياساً بالمستوى الذي يبلغه في المصل عند حدوث الإصابة بمرض معين يعكس مدى الضرر الذي لحق بأجهزة الجسم المحتوية لذلك الأنزيم، فكلما وجدت فعالية عالية في المصل كلما كانت شدة الضرر كبيرة. ومن

خلال المعلومات التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة يمكن الاستنتاج الى انه بالإمكان اعتبار أنزيم الأدينوسين دي أميناز احد الأنزيمات التشخيصية التي تختلف قيم فعاليتها في حالات البتا - ثلاسيميا الكبيرة مقارنة بقيمها في الحالات الطبيعية مما يعني أنه بالإمكان استخدام الأنزيم في تشخيص هذه الحالة بالإضافة الى إمكانية التكهن بمقدار الضرر اللاحق عند الإصابة.

المصادر العربية

منظمة الصحة العالمية (WHO)، 1999. التقرير السنوي للمدير الاقليمي لشرق المتوسط (اعمال منظمة الصحة العالمية).

المصادر الاجنبية

- Al-Awamy, B.H., 2000. Thalassaemia syndroms in Saudi Arabia, Meta-analysis of local studies. Saudi. Med. J. 21 : pp.8-17.
- Al-Chalabi, K. and Mikaeil, M.H., 2000. Adenosine deaminase activity in Typhoid fever, Malta fever and Malaria. Rafid. J. of Sci., (Accepted for publication).
- Beulter, E., Biime, K.G., Valentine Kaplan, J. C., Loka, G.W., Ramot, B. and Valentine, W.N., 1977. International Committee for Standardization in Haematology. Recommended Method for Red-cell Enzyme Analysis, J. Haematol.35: pp.331-340.
- Cappellini, N., Cohen, A., Eleftheriou, A., Piga, A. and Porter, J., 2000. Guide lines for the clinical Managements of Thalassaemia. Published by Thalassaemia International Federation (TIF). Cyprus.
- Chottiner, E.G., Cloft, H.J., Tartaglia, A.P. and Mitchel, B.S., 1987. Elevated adenosine deaminase activity and hereditary hemolytic anemia. Evidence for abnormal transiational control of protein synthesis. J. Clin. Invest. 49 : pp.1001-1005.
- Clegg, J.B. and Weatherall, D.J., 1967. Haemoglobin synthesis in α -Thalassaemia (Haemoglobin H disease). Nature, 215, 1241 p.
- Franco, R. and Centelles, J.J., 1989. Adenosine deaminase inhibitors as therapeutic agents. Drugs and Today 25 : pp.155-170.
- Hamill, S. and Tritsch, G.L., 1976. Adenosine aminohydrolase from human spleen : partial purification and some kinetic properties. J. Med. 7 : pp.227-232.
- Hoffbrand, A.V. and Pettit, J.E., 1988. Sandoz Atlas of Clinical haematology. pp.81-98. Sandoz Ltd., Basle Gower medical publishing London and New York.
- Kobayashi, F., Ikeda, T., Marumo, F. and Sato, C., 1993. Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. Am. J. Gastroenterol, 88 : pp.200-271.
- Lowry, D.H., Rose brough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951 Protein measurements with folin - phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: pp.265-275.
- Maiti, C.R., 1995. A concise note on medical laboratory technology" New central book agency Ltd. Calcutta.
- Mikaeil, M.H. and Al-Chalabi, K., 2000. Comparative study of properties and activity of adenosine deaminase from human serum and erythrocytes. Rafidian J. Sci. 11: pp. 23-37.
- Olivieri, N.F., 1999. The α -Thalassaemia. The New England J. of Medicine.341: pp.99-109.

- Price, N.C. and Stevens, L., 1989. Fundamentals of enzymology, 2nd ed. Oxford University press., UK.
- Schrader, W.F. and Pollara, B., 1978. Localization of an adenosine deaminase binding protein in human kidney. *J. Lab. Clin. Med.* 92 : pp.656-662.
- Van Der Weydea, M.B. and Kelley, W.N., 1976. Human adenosine deaminare: Distribution and properties. *J. Biol. Chem.* 25: pp.5448-5456.
- Weatherall, D.J., 1999. In: Postgraduate Haematology. Fourth edition. Edited by Hoffbrand, A.V., Lewis, S.M. and Tuddehans E.G.D. pp.91-114. Butterworth and Heinemann. Oxford.