

# IJST

## INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

VOL. (11), NO. (2)- JUNE 2016

ISSN:2305-9346

SJIF: 4.487/ICV:4.32/GIF:0.81

[www.ijst-jo.com](http://www.ijst-jo.com)

# IJST International Journal for Sciences & Technology

International Journal for Sciences and Technology

المجلة الدولية للعلوم والتكنولوجيا

---

Volume 11. No. 2/ June 2016 / ISSN: 2305-9346

---

***A Refereed Scientific Journal Since 2006***

مجلة علمية محكمة منذ عام 2006

***Issued By:***

***The International Centre for Advancement of Sciences and Technology***

***In a cooperation with TSTC - Jordan***

IJST Contact Information:

P.O. Box 2793 Amman 11953 Jordan

Tel. +962796543469

E-mails: info@ijst-jo.com / ijst.jordan@yahoo.com

URL: www.ijst-jo.com



**Al- Shammari , Abdul- Jabbar N.**

**(Editor-in- Chief)**

Professor of Microbiology / Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine / Faculty of Sciences / Al-Balqa' Applied University / Al- Salt / Jordan  
*shammari@ijst-jo.com*

**Abbas, Jamal A.**

Professor of Plant Ecophysiology / Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq  
*phdjamal@yahoo.com*

**Abdul- Ghani, Zaki G.**

Professor of Microbiology/ Faculty of Pharmaceutical Sciences / Amman Private University / Jordan  
*zaki\_abdulghani@yahoo.com*

**Abdul- Hameed, Hayder M.**

PhD in Environmental Engineering / Environmental Engineering Dept./ Faculty of Engineering/ University of Baghdad/ Iraq  
*hayderalmunshi@yahoo.com*

**Abdullah, Ahmed R.**

PhD in Cancer Immunology and Genetics /Biotechnology Research Centre / Al- Nahrain University / Baghdad / Iraq  
*ahmedrushdi1970@yahoo.com*

**Al- Daraji, Hazim J.**

Professor of Avian Reproduction and Physiology / Animal Resources Dept./ College of Agriculture / University of Baghdad / Iraq  
*prof.hazimaldaraji@yahoo.com*

**Al- Douri, Atheer A. R**

PhD in Microbiology/Faculty of Veterinary Medicine/ University of Baghdad / Iraq  
*aaldouri96@yahoo.com*

**Al- Faris, Abdulbari A.**

Professor of Surgery / Dept. of Surgery and Obstetrics / College of Veterinary Medicine / University of Basrah / Iraq  
*Vetedu2000@yahoo.com*

**Al- Jashami, Najim A.**

Professor of Nuclear Material Sciences / Dept. of Physics / College of Sciences / Kufa University / Iraq  
*na\_phys@yahoo.com*

**Al- Mashaykhi, Akram Othman**

PhD in IT / Amman Arab University for Graduate Studies / Jordan  
*akram.othman@gmail.com*

**Al- Mathkhoury, Harith J F.**

Professor of Medical Microbiology / Dept. of Biology / College of Sciences / University of Baghdad/ Iraq  
*harith\_fahad@yahoo.com*

**Al- Murrani, Waleed K.**

Professor of Genetics and Biostatistics / University of Plymouth/ UK  
*profmurrani@yahoo.com*

**Al- Noor, Nadia H.**

PhD. in Statistics, Mathematical Statistics / Dept. of Mathematics / College of Sciences / Al-Mustansiriya University / Baghdad / Iraq

**Al- Noor, Taghreed H.**

Professor of Chemistry / Dept. of Chemistry / College of Education – Ibn Al- Haitham / University of Baghdad / Iraq  
*drtaghreed2@gmail.com*

**Al- Samarrai, Taha H.**

PhD. in Microbiology / Dept. of Medical Laboratory Sciences / College of Applied Sciences / University of Samarra / Iraq  
*tahaalsamarrai@gmail.com*

**Al- Saqur, Ihsan M.**

Professor of Parasitology/ Faculty of Sciences / University of Baghdad / Iraq  
*drihsanalsagur@yahoo.com*

**Al- Shamaony, Loai**

Professor of Biochemistry / Faculty of Pharmacy / Misr University for Sciences and Technology / Egypt  
*loaialshamaony@yahoo.com*

**Al- Shebani, Abdullah S.**

PhD in Dairy Sciences and Technology / Food Sciences Dept./ Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq  
*Agrifood43@yahoo.com*

**Alwachi, Sabah N.**

Professor of Physiology / Biology Dept./ College of Sciences/ University of Baghdad / Iraq  
*sabahalwachi@yahoo.com*

**Khamas, Wael**

Professor of Anatomy and Histology / College of Veterinary Medicine / Western University of Health Sciences / Poma -California/ USA  
*wael\_khamas@yahoo.com*

**Editorial Board Secretary**

**Pharmacist. Nansi Elian**

Amman- Jordan  
*ijst.jordan@yahoo.com*

---

## FORWARD

---

*Dear Colleagues,*

*I used to start my message by the achievements we try always to do and by the idea that was born to put between your hands our journal – IJST. Today, I write you about how our journal is moving to the new volume as we are now in 2016, eleven years without stop, despite the challenges we faced, and despite all constraints that our beloved Arab countries have while they are looking for more development achievements. What I want to say, is that the only weapon, as well as the tool to proceed to the gate of development is science and how we can use and adopt all the ways that make our cultures, our thoughts and our talents and research efforts to be converted into practices to improve life for us and for the coming generations and let the other parts of the world listen to us very appreciately. By this year, IJST had been awarded a new scientific impact factor, **that is (the Global Impact Factor- GIF) of a value scored 0.81**. In addition, **IJST had awarded an increase of the value scored for SJIF to be 4.487**. By the beginning of the current year, **a new Editorial Board Member has joined IJST, and it is our pleasure to welcome Prof. Taha Al- Samarraï from University of Samarra** and wishing him the best times while in our IJST journey.*

*For all what we achieved, I would like to present my deepest thanking and great recognitions for all people and institutes who faithfully gave IJST their concerns, their cares, and their patiences to keep it as one of the leading journals in Arab and international worlds.*

*Thanks a lot for Prof. Jamal Abbas and Dr. Abdullah Al- Shebani from University of Kufa, Dr. Atheer Al- Douri , Prof. Hazim Al- Daraji from University of Baghdad, Prof. Waleed Al- Murrani for his endless support from Plymouth University, Prof. Abdulbari Abbas Al- Faris from University of Basrah, and finally to the one who stands always behind this great effort and performs her best with no disperse, non stopping, and with full of faith, loyalty and creative footprints at IJST, the Editorial Board Secretary of IJST. With you all, IJST is now here, and will continue as long as we breath, as we believe on our goal, and as we have the power from God to be with you.*

*IJST was a fruitful effort issued by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology – ICAST, which tries to take part in both globalization and revolution in information and communication technologies, because S&T development becoming not only the key elements of economic growth and industrial competitiveness, but also essential for improving the social development, the quality of life and global environment. ICAST took then a decision to establish a scientific alliance with TSTC (Tharwa for scientific Training & Consultations) and this alliance comes to support the efforts towards publishing IJST.*

*Today, we announce a new issue of our journal, that is the second issue from the eleven volume of IJST, June , 2016.*

*Finally, I hope that all significant figures of sciences whom joined the editorial board, the researchers, and the readers of our journal will keep IJST between their eyes and contribute in continuing its journey, with their remarks, valuable recommendations and their researching outcomes.*

*Thanks a lot for all who support IJST.*

**Editor-in-Chief**

**IJST**

**Abdul Jabbar Al- Shammari**

---

### The Referees for this Issue

---

*\* The referees and advisory group below are listed according to alphabetical order, with deep appreciation for all.*

**Prof. Abdul- Jabbar N. Al- Shammari**

*Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Abdulbari A. Al- Faris**

*College of Veterinary Medicine ,University of Basra. Iraq*

**Dr. Abdullah Sh. M. Al- Shebani**

*Dept. of food sciences, Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq*

**Dr. Abdul-Wahab R. Hamad**

*Al-Zarqa University College. Jordan*

**Dr. Ahmed A. Al- Darraji**

*College of Dentistry, University of Wassit. Iraq*

**Dr. Atheer A.R. Al- Douri**

*College of Veterinary Medicine, University of Baghdad. Iraq*

**Dr. Hala Al Daghistani**

*Dept. of Medical Laboratory Sciences , College of Sciences , Al- Balqa' Applied University. Jordan*

**Prof. Harith F. Al- Mathkhouri**

*College of Sciences, University of Baghdad. Iraq*

**Prof. Hazim J. Al- Darraji**

*Animal Resources Dept., College of Agriculture , University of Baghdad . Iraq*

**Dr. Ibraheem N. Al- Tarawneh**

*Dept. of Chemistry, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Jamal A. Abbas**

*Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq*

**Dr. Loay Rahman**

*Dept. of Chemistry, Howard University, Washington DC. 20060 USA.*

**Prof. Mahmoud M. Othman Matar**

*College of Medicine, Al- Najah National University. Palestine*

**Prof. Mjid A. Al- Attar**

*Turunto / Canda.*

**Dr. Moayyad Al- Khataybeh**

*Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Najim A. Al- Jashami**

*Dept. of Physics, College of Sciences , University of Kufa. Iraq*

**Dr. Ola Mohammad Al-Sanabra**

*Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Taha H. Al- Samarrai**

*College of Sciences, University of Samarra. Iraq*

**Prof. Waleed Al- Murrani**

*University of Plymouth , United Kingdom*

---

**TABLE OF CONTENTS**


---

*\* Articles in this issue are listed below according to field specialties order, starting by English section and followed by Arabic section.*

**(I) ENGLISH SECTION**

**ANIMAL PRODUCTION**

- Effect of vitamin E and PMSG in some hematological and biochemical parameters before and after parturition in Ewes** 6-11  
*Abdelkareem A. Babe*

**COMPUTER SCIENCES**

- Fast and accurate registration method for MRI images** 12-18  
*Ikhlas W. Ghindawi, Yossra H. Ali & Abdul Ameer Abdulla*

**DENTISTRY**

- The effect of low level laser therapy on the salivary IL-6, IL-10 and IgA in patients having oral candidiasis** 19-25  
*Hadeel S. Alazzawi & Jamal N. Ahmed*

**MICROBIOLOGY**

- The prevalence of pneumococci in patients with severe asthma: conventional and molecular diagnosis** 26-29  
*Ayad S. Mahdi, Amer R. Alnajjar, Amina N. Thwani & Abdul-Hameed A. Al-Qaseer*

**MEDICINE**

- The role of oral glucose tolerance test in detection of hyperglycemia among non-diabetic patients with acute myocardial infarction** 30-35  
*Mahir A. Jassim*

**VETERINARY MEDICINE**

- The effect of color light and stocking density on tibial measurements and levels of calcium and phosphorus in bone and serum of broilers and layers chickens** 36-42  
*Mudhar A. S. Abu Tabeekh & Rabia J. Abbas*

- The levels of Aflatoxin B1 residue in slaughtered chicken flesh and livers in Sulaimani City markets** 43-47  
*Hazhaow O. Murad, Emad A. Abdulahad & Ahmed Y. Hamadameen*

- Post - vaccinal reaction for some vaccines strains against infectious bursal disease used in Sulaimaniyah Province , Kurdistan- Iraq** 48-54  
*Emad A. Abdulahad*

**ARABIC STUDIES AND RESEARCHES SECTION – قسم الدراسات والبحوث العربية – (II)****الأحياء المجهرية**

- 61-56 تعيين قابلية البكتيريا المعزولة من الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية للمياه المعبأة على تكوين الغشاء الحيوي  
أمير خضير عباس، سهيلة غفوري علي، لبنى اياد اسماعيل، فرقد فرحان عبد الحميد، سارة خطاب اسماعيل

**علوم الحياة**

- 65 -62 تأثير عقار الليفيتراسيتام في بطانة الرحم في الفأر الأبيض  
نهلة عبد الرضا البكري، فائزة جبار جودة
- 72-66 تأثير المستخلص الميثانولي لقشور الرمان *Punica Granatum . L* على كبد وكلى ذكور الفئران البيضاء  
عبير محمد حسين، بسمة علي جاسم، نورس عبد المحسن مزاحم
- 79-73 دراسة تأثير عقار الليفيتراسيتام في عملية نشأة النطف وأعداد خلايا لايدك وسرطولي وأقطار وسمك النبيبات المنوية في الفأر البالغ  
نهلة عبد الرضا البكري، فائزة جبار جودة
- 85-80 دراسة نسجية مقارنة للغلالة الوعائية في مقل عيون بعض الفقريات في البيئة العراقية  
شيماء عواد عبد
- 90-86 الوصف العياني والتركيب النسيجي للكبد البنكرياسي والطحال البنكرياسي في سمكة الشبوط *Barbus grypus* في بغداد  
أفين رمضان محسن

**علوم زراعية**

- 97-91 تحضير ببتيدات ذات فعالية مناعية من بروتينات نخالة الحنطة  
منال عبد الواحد السراج، مكارم علي موسى

**علوم الغذاء**

- 101-98 تقدير نسبة القلويد والفلوفونيد والفيتامينات الذائبة في الدهون في جنين القمح  
عبد المنعم حمد مجيد السامرائي، نهى علي هادي السامرائي

**المناعة**

- 105-102 التحري عن أضداد البروسيلا باستخدام اختبارات التراص المصلي و2- ميركابتوايثانول لدى بعض المراجعين للعيادات الخارجية في مدينة سامراء وضواحيها  
أسماء عيسى محمود

## ***ENGLISH SECTION***



## Effect of vitamin E and PMSG in some hematological and biochemical parameters before and after parturition in Ewes

Abdelkareem A. Babe

Dept. of Animal Production / College of Agriculture/ University of Basrah / Republic of Iraq

E- mail: kareem\_abbis@yahoo.com

### ABSTRACT

Vitamin E and Selenium are essential for ewes, because of their ability to regulate the generation of free-radicals in ovarian cells. The aim of current study was to determine the effect of vitamin E and PMSG on some hematological and biochemical parameters.

The present study was carried out at Animal Field of Agriculture Collage of Basrah University. Twenty four Arabi and Najdi ewes were divided into two groups (12 ewes for each breed) aged 2.5 – 3.5 years. First group was kept as control, while the second group was treated with 300 mg vitamin E , 0.2 mg selenium orally/ daily for 25 days. The ewes were synchronized by (Ram effect method) at the end of treated period. The ewes were injected by 250 I.U PMSG S.C (subcutaneous). Blood samples were collected at breeding season pre parturition and 7 days post parturition (Post- parturition). The treated groups showed elevation in fertility rate in Arabi and twin rate in Najdi ewes. Significant increases were observed in total protein and globulin of najdi ewes at breeding season period. Pre- parturition showed significant increase in WBC, P, Zn, Fe, of Najdi ewes and WBC, Zn in Arabi ewes. The post parturition period revealed significant increased in total protein of Arabi ewes. There were significant differences between two breed in percentage of twin, fertility, hematological and biochemical parameters.

**Keywords:** vitamin E, PMSG, sheep, blood parameters, ewes.

### الملخص باللغة العربية

يعد كل من فيتامين E والسيلينيوم عنصرين أساسيين لخصوبة النعاج لما لهما من قدرة على السيطرة على تنظيم تكوين الجذور الحرة في خلايا المبايض، وقد هدفت هذه الدراسة لتحديد تأثير فيتامين E و PMSG في بعض المعايير الدموية والكيموحيوية في عينة من النعاج، حيث أجريت الدراسة في الحقل الحيواني التابع لكلية الزراعة في جامعة البصرة.

تم اختيار عينة مكونة من 24 نعجة من سلالاتي العرابي والنجدي قسمت إلى مجموعتين ( بواقع 12 نعجة لكل مجموعة ) تراوحت أعمارها بين 2.5- 3.5 سنوات . اعتبرت المجموعة الأولى مجموعة سيطرة، بينما تمت معاملة المجموعة الثانية بجرعة مقدارها 300 ملغم من فيتامين E مع 0.2 ملغم سيلينيوم يوميا، ولمدة 25 يوما. بعد انتهاء فترة المعاملة حققت النعاج بمقدار 250 وحدة دولية من هرمون PMSG تحت الجلد. جمعت عينات الدم عند الموسم التناسلي وقبل الولادة وبعدها. أظهرت النتائج ارتفاع نسبة الخصوبة لدى النعاج العرابي وارتفاع نسبة التوائم في نعاج سلالة النجدي . كما لوحظ حدوث زيادة معنوية في البروتين الكلي والجلوبيولين في نعاج النجدي عند فترة الموسم التناسلي . وقد أظهرت المرحلة الأخيرة من الحمل زيادة معنوية في كريات الدم البيضاء وتركيز الفسفور والزنك والحديد في النعاج النجدية، وكريات الدم البيضاء وتركيز الزنك في النعاج العرابية. بالإضافة إلى حدوث زيادة معنوية في مرحلة بعد الولادة في تراكيز البروتين الكلي في النعاج العرابية. أوجدت نتائج التجربة وجود فروقات معنوية بين السلالتين في نسب الخصوبة والتوائم.

## INTRODUCTION

Vitamin E is a fat-soluble vitamin and is not synthesized in the rumen. Fresh grass has high concentrations of vitamin E (1). Vitamin E and selenium regulate the generation of free radicals in the ovarian cells (2). Vitamin E saves steroidogenic enzymes from oxidative degeneration (3). The generation of free radicals acts as a potential influence of abnormal embryonic development (4). Vitamin E assists the release of follicle stimulating hormone (FSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and luteinising hormone (LH) (5). Ewes pass through several stages during pregnancy, parturition and lactation represent a physiological load to the female body (6). Synchronization is produced by using intra vaginal impregnated sponges, which contain synthetic progestagen as fluorogeston acetate, FGA. Synchronization maybe the most popular method used to improve conception rate during season and out season breeding (7,8). Several synchronization procedures incorporate with injection of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) at the end of the progestagen treatment in order to improve occurrence of ovulation and fertility in small ruminants (9). The treatment of ewe lambs with PMSG and progesterone had improved the percentage of ovulation (9). It was found that there is a relationship between the dosage of PMSG (250-500 I.U.) and the percentage of ovulation, reproductive performance of ewe lambs (10, 11). Metabolism of mineral substances plays an important role in maintaining physiological functions of the puerperal period. Minerals are important as essential nutrients in the food of animals. Physiological status might modify animals' requirement to these minerals (12). Moreover, blood biochemical parameters including total protein, triglycerides, free fatty acids and urea are important indicators of the healthy and nutritional status of the animals (13).

### Aim of the study

The present study aimed to determine the effect of vitamin E and selenium on the fertility of ewes and changes in some hematological, biochemical, and minerals through different stages of pregnancy and after parturition.

## MATERIALS AND METHODS

The present study was carried out at the Animals field/ College of Agriculture / Basrah University, Iraq. Two breeds of ewes namely; Najde and Arabi were used. Each breed consisted of twelve dry ewes aged 2.5-3.5 years, and were divided randomly into two groups (control and treated). The treated group was manipulated with vitamin E and selenium (Arvit E-S/The Arab company for manufacturing Veterinary and Agricultural product Ltd pharmaceutical, Jordan) were used daily at dose of 300 mg vitamin E and 0.2 mg selenium orally at time of isolation (14).

The ewes were isolated for 18 days in breeding season to synchronize estrus cycle by (effect of ram) at last day. All animals were treated with PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (Product of Inter Vet International B.V Manufactured in the European Union) injected S.C at dose of 250 i.u. The ewes were mixed with ram for mating (10,15). Blood samples were collected after 3 days of mating and one month before and week after parturition. Seven ml of blood was taken from each animal. Two ml was poured in sterile test tube with anti-coagulant EDTA (Ethylene Di amine Tetra Acetic Acid) used for hematological analysis. Five ml was counterfeited to isolate blood serum to estimate biochemical measurement (16).

### Hematological analysis

Complete blood count was performed according to standard laboratory procedures. Red Blood Cells were determined by hematocytometer (Neubaure slide), Packed cell volume and white blood cells were determined as described by (16).

### Biochemical measurements

Total protein concentrations were determined by using chemical kit (Bio Merieux – France). Concentrations of albumin, ferrous (iron) (Fe), phosphate (p) and calcium (Ca) were determined by using chemical kit (biochemical – Germany). Zinc (Zn) concentration was determined by using chemical kit of (Egyptian Company for Biotechnology- Egypt). The value of globulin was obtained by subtracting albumin from total protein. Data was statistically analyzed by using SPSS program (17).

## RESULTS

Table (1) showed the results of treatment with vitamin and PMSG. There were elevation of Arabi ewes fertility and twin rate percentages (83.3% and 63% respectively) compared with control fertility and twin rate percentages (40 % and 0.00%). Najdi ewes showed decline in fertility and rise in twin rate percentages (33% and 100.% respectively) compared with control fertility and twin rate percentage 40 % and 0.00% .respectively.

**Table (1): Effect of breed and vitamin E on reproductive performance of ewes (Mean  $\pm$  SE)**

Breed	Treatment	No.	Twin %	Fertility %
Arabi	Control	2	0.00	40.0
	Vit .E	5	63.0	83.3
<b>Mean</b>			<b>31.5</b>	<b>61.65</b>
Najdi	Control	2	0.00	40.0
	Vit .E	2	100.0	33.3
<b>Mean</b>			<b>50.0</b>	<b>36.65</b>

Table (2) showed significant increase at ( $P<0.05$ ) in RBC count in post parturition period compared with other two periods. WBC was significantly increased at ( $P<0.05$ ) in pre parturition compared with post parturition with early stage in two breeds. PCV

showed no significant changes among stages or between breeds.

**Table (2): Effect of breeds and different physiological periods on some blood parameters of ewes (Mean  $\pm$  SE)**

Breed Period Parameter	Arabi			Najdi		
	RBC ( $10^6/\text{ml}$ )	PCV (%)	WBC ( $10^3/\text{ml}$ )	RBC ( $10^6/\text{ml}$ )	PCV (%)	WBC ( $10^3/\text{ml}$ )
Breeding season	5.67 b $\pm 0.24$	27.13 $\pm 0.50$	8.49 c $\pm 2.79$	5.17 b $\pm 0.24$	27.06 $\pm 0.50$	9.67 c $\pm 2.79$
Pre-parturition	5.83 b $\pm 0.24$	28.18 $\pm 0.50$	16.5 a $\pm 3.97$	5.08 b $\pm 0.24$	28.32 $\pm 0.50$	11.66 a $\pm 2.87$
Post – parturition	6.89 a B $\pm 0.31$	28.97 $\pm 0.97$	11.58 b $\pm 3.50$	8.48 aA $\pm 1.21$	29.32 $\pm 0.83$	10.30 b $\pm 1.61$

*Different small letters refer to significant differences at ( $P<0.05$ ) between periods, and capitals letters between breeds*

Table (3) shows significant elevation at ( $P<0.05$ ) in total protein during post parturition compared with other periods and no significant different in ewes of Arabi. Najdi sheep showed significant ( $P<0.05$ ) increased in total protein and globulin in early stage compared with other period. The different between

breed in early stage was significant ( $P<0.05$ ) as total protein, albumin and globulin of Najdi breed were higher in comparison with Arabi ewes. However, there was no significant difference between the two breeds during the other two periods.

**Table (3): Effect of breeds and different physiological periods on some serum biochemical parameters of ewes (Mean  $\pm$  SE)**

Breed Period Parameter	Arabi			Najdi		
	Total protein (mg/100ml)	Albumin (mg/100ml)	Globulin (mg/100ml)	Total protein (mg/100ml)	Albumin (mg/100ml)	Globulin (mg/100ml)
Breeding season	5.67 b $\pm 0.24$	27.13 $\pm 0.50$	8.49 c $\pm 2.79$	5.17 b $\pm 0.24$	27.06 $\pm 0.50$	9.67 c $\pm 2.79$
Pre-parturition	5.83 b $\pm 0.24$	28.18 $\pm 0.50$	16.5 a $\pm 3.97$	5.08 b $\pm 0.24$	28.32 $\pm 0.50$	11.66 a $\pm 2.87$
Post – parturition	6.89 a B $\pm 0.31$	28.97 $\pm 0.97$	11.58 b $\pm 3.50$	8.48 aA $\pm 1.21$	29.32 $\pm 0.83$	10.30 b $\pm 1.61$

*Different small letters refer to significant differences at ( $P<0.05$ ) between periods, and capitals letters between breeds*

Minerals of Arabi ewes showed significant ( $P<0.05$ ) elevation in P, Zn and Fe concentrations during pre parturition period, compared with other periods and significant ( $P<0.05$ ) decreased (Zn) concentration in pre parturition period compared with other periods of Najdi ewes. Significant differences at ( $P<0.05$ )

were observed between the two breeds during early stage, as increased (p) and decreased (Zn, Fe), where as, during pre parturition there were increase in Ca and p and decrease in (Fe). During post parturition there was a decrease in (Fe) compared with other minerals' values at similar stage of Najdi ewes (table 4).

**Table (4): Effect of breeds and different physiological periods on some elements in blood of ewes (Mean  $\pm$  SE)**

Breed	Arabi				Najdi			
Period Parameter	Calcium (mg/100ml)	Phosphorus (mg/100ml)	Zinc ( $\mu$ g/dl)	Iron (mg/100ml)	Calcium (mg/100ml)	Phosphorus (mg/100ml)	Zinc ( $\mu$ g/dl)	Iron (mg/100ml)
Breeding season	10.93 $\pm$ 0.48	12.9 b A $\pm$ 1.0	27.71 b B $\pm$ 1.79	2.11 ab B $\pm$ 0.15	9.88 $\pm$ 0.45	9.38 B $\pm$ 1.0	31.98 a A $\pm$ 1.79	3.44 A $\pm$ 0.15
Pre-parturition	11.44 A $\pm$ 0.48	14.8 a A $\pm$ 1.0	32.12 aB $\pm$ 1.79	2.59 a B $\pm$ 0.15	9.37 B $\pm$ 0.48	9.52 B $\pm$ 1.0	36.17 bA $\pm$ 1.79	3.37 A $\pm$ 0.15
Post – parturition	10.24 $\pm$ 0.61	9.75 c $\pm$ 0.27	29.58 ab B $\pm$ 2.76	1.77 b B $\pm$ 0.49	10.56 $\pm$ 0.80	9.23 $\pm$ 1.66	34.14 a A $\pm$ 2.97	3.28 A $\pm$ 0.25

*Different small letters refer to significant differences at ( $P < 0.05$ ) between periods, and capitals letters between breeds*

## DISCUSSION

The rise in percentages of twinning and pregnant of treated ewes in compared with control of breeds were due to role of vitamin E, selenium and PMSG. According to (18), it was suggested that vitamin E assisted the release of follicle stimulating hormone (FSH), adreno cortico trophic hormone (ACTH) and Latinizing Hormone (LH). PMSG has two hormones: FSH and LH, which activate and stimulate follicular development and ovulation (19). The significant elevation at ( $P < 0.05$ ) in RBC count in post parturition period in two breeds were due to an increase in body metabolism of this stage, which need high quantity of oxygen to maintain milk synthesis. The blood forming organ automatically produce large quantities of extra red blood cells (20). WBC were increased significantly ( $P < 0.05$ ) at last stage of gestation and post parturition. The variations in white blood cell (WBC) in ewes was also due to age, physiological stage, stress reaction of an ACTH- hormonal and infection (21), or may be due to the physiologic stress induced by the pregnant state (22). The present study agreed with (23, 24). Total WBC may be elevated in late pregnancy in sheep. The Arabi ewes observed significant ( $P < 0.05$ ) increase in total protein in post parturition. The higher values of total protein in lactating ewes due to prove the high energy need to milk synthesis especially during the post parturition (25). The total protein of Najdi ewes decreased-significantly ( $P < 0.05$ ) at post parturition, due to a decrease in globulin concentration in this stage in present study. Total protein decreased due to a decrease in serum globulin (26), or may be the decrease in total protein in post parturition because the Najdi ewe lambing twin and used more quantity of total protein in milk. synthesis. The globulin rise significantly ( $P < 0.05$ ) at early stage associated with immunity may be due to the physiologic stress induced by the pregnant state (22). Significant ( $P < 0.05$ ) elevation and declining of minerals concentration in plasma at different stage of gestation and post parturition, may be the reason for this different, changes in physiological status and feed (type, quantity, quality) of animals.

Calcium concentration showed no significant difference in the present study, which agreed with a study conducted by (27), who suggested that no statistical differences between were observed before and after parturition in Ca levels in goats. Phosphorus concentration had significantly elevated at ( $P < 0.05$ ) in pre parturition period. Thus, these results are in agreement with studies of (27,28).

It was demonstrated that in lactation stage, there was a decrease the level of P when compared with pregnant ewes (29). Zinc concentration showed significant ( $P < 0.05$ ) elevation in pre parturition period. The need for zinc increases during pregnancy and lactation stages because of the greater demands of normal embryogenesis, fetal growth, and milk secretion. The total demand in a full-term pregnancy is the need of fetal growth and reaches a peak increase in the third trimester (30). Iron concentration showed significant ( $P < 0.05$ ) elevation in early and pre parturition periods, that might be caused by the high demand of Fe by fetus during pregnancy. This result on Fe was in agreement with findings of studies (27,31). The differences between two breeds (Arabi and Najdi) in the present study in some blood parameters were shown in table (2). Significant elevation in RBC count in early stage of gestation Najdi ewe compared with RBC count Arabi ewe. Table (3) showed significant elevation in early stage total protein, albumin and globulin in Najdi ewe compared with Arabi ewe. Table (4) showed significant increase in mineral concentrations in early stage in phosphorus and decline in Zn and Fe, pre parturition stage appeared significant increase in Ca, P and decreased in Zn and Fe concentrations. The post parturition stage showed decrease in Zn and Fe in Arabi ewe compared with Najdi ewe. These results were because the animals were lived in one farm. The reference values of indices determined in blood may vary according to breed and are affected by age and to a certain extent also by breeding conditions (32).

In conclusion, the administration of vitamin E and PMSG increase percentage of fertility rate in Arabi and twin percentage in Najdi ewes.

## REFERENCES

1. Persson KW.; Sandgren CH.; Emanuelson U. and Jensen SK. (2007). Supplementation of RRR- $\alpha$ -tocopheryl acetate to periparturient dairy cows in commercial herds with high mastitis incidence. *J. Dairy Sci.* 90(8):3640–3646.
2. Harrison JH.; Hancock DD. and Conrad HR. (1984). Vitamin E and selenium requirements of the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 67:123-132.
3. Staats DA.; Lohr DP. and Colby H D. (1988). Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. *Endocrinol.* 123:975-983.
4. Goto Y.; Noda Y.; Narimoti K.; Umaoka Y. and Mori T. (1992). Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Rad. Biol. Med.* 13:47-53.
5. Barnes MMC. and Smith AJ. (1975). The effects of vitamin E deficiency on some enzymes of steroid hormone biosynthesis. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 45: 396-403.
6. Kulcsar M.; Danko G.; Delavaud C.; Mircu C.; Nikolic AJ.; Gaspard A.; Cernescu H. *et. al.* (2006). Endocrine characteristics of late pregnant hyperketonaemic ewes and their reproductive performance following the induction of ovarian cyclicity out of the breeding season. *Acta. Veter. Hungar.* 54:235–249.
7. Bongu TA.; Fatmah I. and Dass S. (1982). Synchronization of oestrus of goat treated with progestagen impregnated intravaginal sponges and PMSG, and reproductive performance following natural or I.A. with frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 5:111-116.
8. Gordon I. (1997). *Controlled reproduction in sheep and goats*. 1<sup>st</sup> ed. Cab International, Wallingford, UK. Pp.; 351-373.
9. Evans G. and Robinson TJ. (1980). The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen- PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *J. Agric. Sci. Cambridge.* 94: 69-88.
10. Allison AJ. (1982). *Technique of modifying reproductive performance in sheep production: breeding and production*. (ed.) Wicham GA. and McDonald MF. New Zealand Institute of Agricultural Science. Pp.:239-236.
11. McNatty KP.; Gibb M.; Dobson C.; Ball K.; Coster J.; Heath D. and Thurley DC. (1982). Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin. *J. Reprod. Fert.* 65:111-123.
12. Ahmed MM.; Siham KA. and Bare MES. (2000). Macromineral profile in the plasma of 185 Nubian goats as affected by the physiological state. *Small Rum Res.* 38: 249-254.
13. Gupta AR.; Putra RC.; Saini M. and Swarup D. (2007). Haematology and serum biochemistry of Chital (Axis axis) and barking deer (Muntiacus muntjak) reared in semi-captivity. *Vet. Res. Comm.* 31: 801-808.
14. Kafizadeh F.; Kheirmanesh H.; Shabankareh HK.; Targhibi MR.; Maleki E.; Ebrahimi M. and Meng G Y. (2014). Comparing the effect of oral supplementation of vitamin E, injective vitamin E and selenium or both during late pregnancy on production and reproductive performance and immune function of dairy cows and calves. *Sci. World J.* 12: 15-21.
15. Metodiev N. (2015). Estrus synchronization of ewes by using “ram effect” and single treatment with synthetic analogue of PGF2 $\alpha$ . *Bulg. J. Agric. Sci.* 21: 889–892.
16. Ghai CL. (2013). *Textbook of Practical Physiology*. 8<sup>th</sup> ed. London . Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. Pp.: 92-98.
17. SPSS (2009). *Statistical Packages of Social Sciences*. Version 9.00.
18. Barnes MMC. and Smith AJ. (1975). The effects of vitamin E deficiency on some enzymes of steroid hormone biosynthesis. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 45:396-403.
19. Sadowska J.; Gebczyn'ski AK.; Paszko K. and Konarzewski M. (2015). Milk output and composition in mice divergently selected for basal metabolic rate. *J. Exp. Biol.* 218:249–254.
20. Guyton AC. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia, USA. : W. B. Saunders Company. Chapter 32. Pp.: 927- 941.
21. Mbassa GK. and Poulsen JSD. (1992). The comparative haematology of cross-bred and indigenous East African goats of Tanzania and breeds reared in Denmark. *Vet. Res. Comm.* 16(3):221–229.
22. Chandra S.; Tripathi AK.; Mishra S.; Amzarul M. and Vaish AK. (2012). Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. *Ind. J. Hematol. Blood. Transfus.* 28(3): 144–146.
23. Ullrey DE.; Miller ER.; Long CH. and Vincent BH. (1965). *Sheep hematology from birth to maturity*, II. Leukocyte concentration and differential distribution. *J. Anim. Sci.* 24:141–144.
24. Oduye OO. (1976). Hematological values of Nigerian goats and sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 8(3):131–136.
25. Bremmer DR.; Bertics SJ.; Brsong SA. and Grummer RR. (2000). Changes in hepatic microsomal triglyceride transfer protein and triglyceride in periparturient dairy cattle. *J. Vet. Sci.* 83:2252-2260.
26. El- Sherif MM. and Assad A. (2001). Changes in some blood constituents of Barki ewes during pregnancy and lactation under semi arid conditions. *Small Rum. Res.* 40: 269-277.
27. Tanritanir P.; Dede S. and Ceylan E. (2009). Changes in some macro minerals and biochemical parameters in female healthy Siirt hair goats before and after parturition. *J Anim. Vet. Adv.* 8 (3): 530-533.
28. Ozyurtlu N.; Gurgoze SY.; Bademkiran S.; Simsek A. and Celik R. (2007). Investigation of some biochemical parameters and mineral levels in pre and postpartum period of Awassi ewes. *Firat Univ. J. Health. Sci.* 21 (1): 33-36.
29. Yokus B.; Cakmr DU. and Kurt D. (2004). Effects of seasonal and physiological variations on the serum major and trace element levels in sheep. *Biol. Trace Elem. Res.* 101: 241-255.

30. Swanson CA and King JC.(1987). Zinc and pregnancy outcome. *Am. J. Clin. Nutr.*46:763–771.
31. Gurdogan F.; Yildiz A. and Balikei E. (2006). Investigation of serum Cu, Zn, Fe and Se concentrations during pregnancy (60,100 and 150 days) and after parturition (45 days) in single and twin pregnant sheep. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 30 (1): 61-64.
32. Bauer JE.; Harvez JW.; Asquith R L.; McNully PK. and Kivipelto J. (1985). Serum protein reference values of foals during the first year of life: comparison of chemical and electrophoretic methods. *Vet. Clin. Path.* 14: 14-22.

## Fast and accurate registration method for MRI images

Ikhlas W. Ghindawi, Yossra H. Ali and Abdul Ameer Abdulla

Dept. of Computer Sciences / University of Technology / Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: ikhlas\_watan@yahoo.com

### ABSTRACT

In medical applications, the accurate registrations of two images are very important issue in order to achieve optimal results. The present study introduced a technique that mixes the pixel and feature matching methods. The study produced a registration method which matched MRI brain samples. The method was validated and parameters were tuned to increase the accuracy and speed of the registration process. The registration process is divided into four main steps: feature extraction, find matches, ICP Algorithm and align processes. The feature extraction step admits desirable operations, which have been shown to greatly ameliorate the registration process. The main step is to extract key points using, Harris corner detector. The key points are then paired to provide point correspondences. The alignment process uses the ICP algorithm to implement a rigid transformation using point correspondences. Results show that registration using the proposed method has produced relatively good results and that it is very important to find interesting features and strong point correspondences.

**Keywords:** Image registration, feature extraction, feature matching, image alignment

### الملخص باللغة العربية

تعتبر مسألة تطابق الصور من المواضيع المهمة جدا والدرجة في التطبيقات الطبية المستخدمة في مجال الحاسوب، ومن المهم جدا أن تكون عملية التطابق دقيقة وصحيحة من أجل الحصول على نتائج موثوقة. سعت هذه الدراسة إلى تقديم تقنية تدمج بين استخدام الطرق المعتمدة على استخلاص الصفات الخاصة بالصورة مع الطرق التي تستخدم نقاط الصورة نفسها في العمل. تضمنت عملية التطابق المقترحة أربع مراحل متتابعة هي: استخلاص الصفات، إيجاد المتطابقات بين الصورتين، تطبيق خوارزمية ICP ومن ثم تطابق الصورتين. تم استخلاص الصفات باستخدام Harris corner decoder ثم إيجاد النقاط المتطابقة في كلتا الصورتين ليتم تطبيق rigid transformation على تلك المتطابقات من خلال تنفيذ خوارزمية ICP. وقد أثبتت النتائج المستحصلة من تطبيق الطريقة المقترحة نجاحها في الوصول إلى نتائج جيدة، كما أثبتت أهمية إيجاد النقاط المهمة والنقاط المتطابقة في الصورتين في دقة وموثوقية النتائج.

## INTRODUCTION

In the medical field, image registration techniques have been crucial research region because they are useful and important in many application areas, such as assisting the surgeon to determine the exact positions of the incisions of the patient's body, in addition to use image alignment technology, which is most useful in disease diagnosis that make it easier and gives more accuracy to the results. The image alignment have many uses in surgical education (1,2).

A variety of techniques are implemented for the image registration task, but no algorithm works are 100% accuracy. Traditional algorithm of image registration focuses on pixel-to-pixel treatment, that are slow and use error criteria in such a way (3). The recent techniques in image alignment use feature based treatment that depends on features extracted from images rather than pixels (4).

Feature based techniques present more hardy against scene motion and are in theory faster. The public feature points are used to create the associations between the images which makes them suitable for automated registration (4,5). The performance of feature-based approaches to image registration relies on the chosen feature extractor, but the optimal feature extractor is typically different from image to image, or even pixel to pixel (6).

In the present study, researchers tried to get benefit from properties of two approaches to gain robust results, to obtain the properties of feature based method from feature extraction and matching steps and gain from ICP algorithm the rigid transformation on each pixel or feature in order to registration the two images (7).

## METHODS AND EXPERIMENTAL APPLICATIONS

### The proposed system

The aim of the present work is to perform the registration process of two images in automatic strategy. The main contribution of proposed method is to find the important features by clustering them according to their neighbors and find the correct transformation parameters iteratively using iterative algorithm and finally align two images by depending on the weight value for each pixel. In this system we propose modification for three steps in image registration process.

### Image registration method

Presently, the most common techniques for registration process is iteratively method that called "Iterative Closest Point (ICP)". This algorithm depends on a set of matches of pixels that founded between two images in some way that ensuring the accuracy of these matches and later minimizing the measuring error iteratively. In order to satisfy this goal we used a technique through four steps.

Initially, we extracted the important features from the two images, then we found the matched features using the clustering strategy, after that we used these matches in ICP algorithm to calculate the transformation matrixes where those matrixes were used to perform aligning process.

Regarding ICP method, the researcher used an improved method to align two images in the same position and same dimensions using feature – based method to extract the matching features and using pixel – to – pixel algorithm for alignment these images. The data that used in this work is DICOM images 512x512 pixels. Figure (1) illustrates the block diagram of the proposed system, and figure (2) shows some examples of these images.

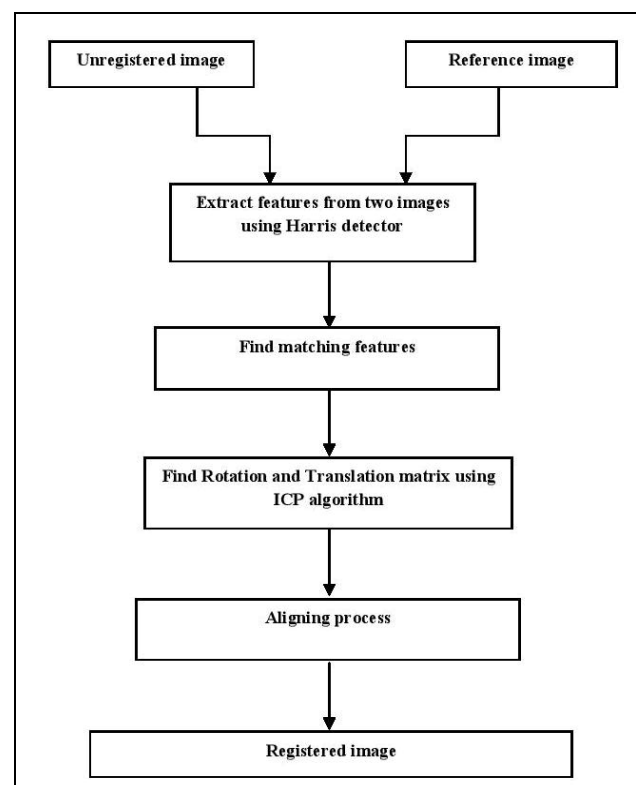


Figure (1): The block diagram of the proposed system



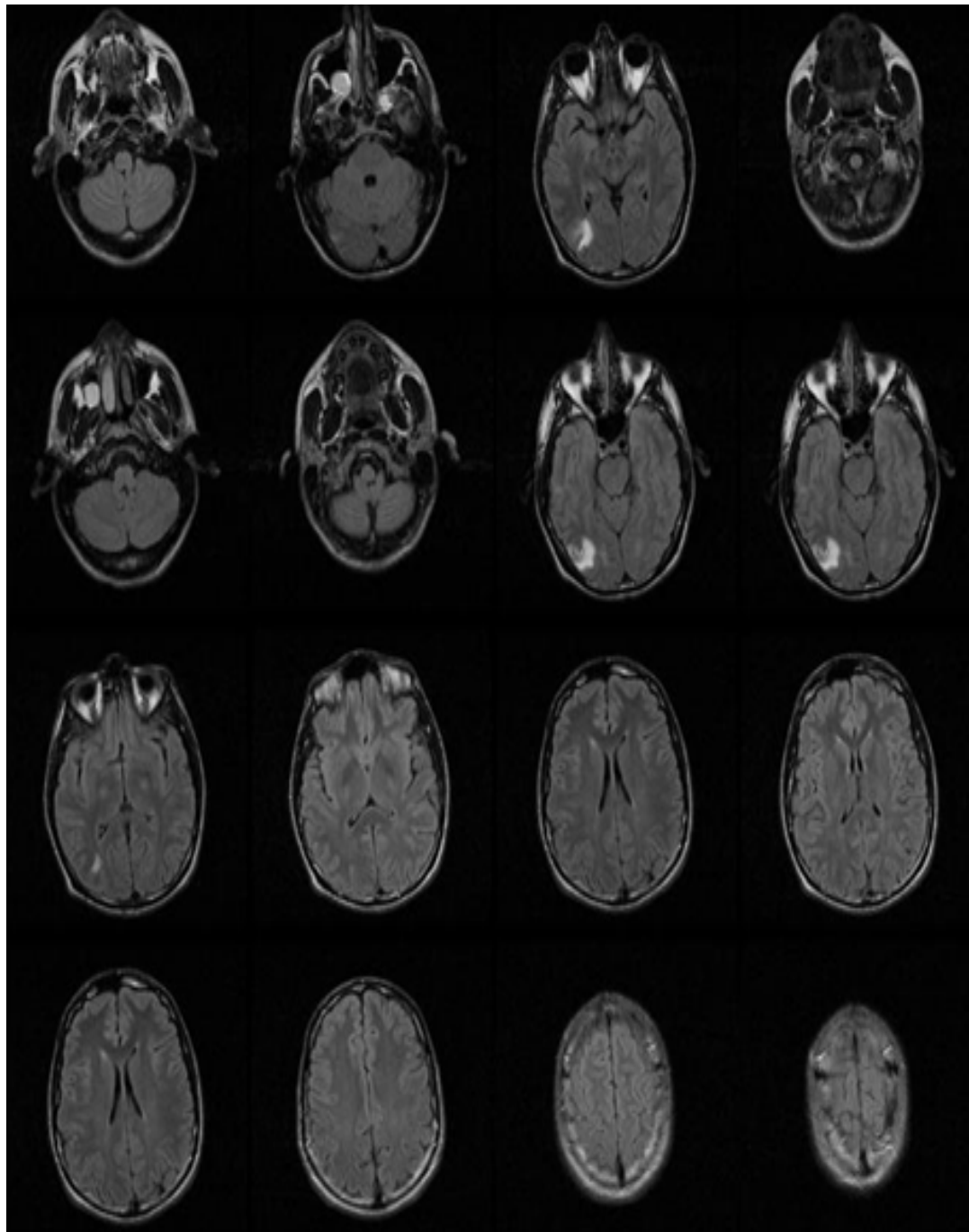


Figure (2): Some examples of images

**1. Feature extraction:** Through this step, the two input images are taken and the features are extracted from these images using the Harris corner detector (figure 3). The Harris detector can detect similar regions between images that are correlated through affine transformation and have various illuminations. Strong features that can be detected from an image are essential in order to find couples of features inside so as to assist the registration process, which ordinarily can be computationally costly. The features provided by the Harris corner

decoder are local and constant to image size and angle of position, thereby giving them quite strong. These features are also strong in response to converts in illumination and minor changes in viewpoint.

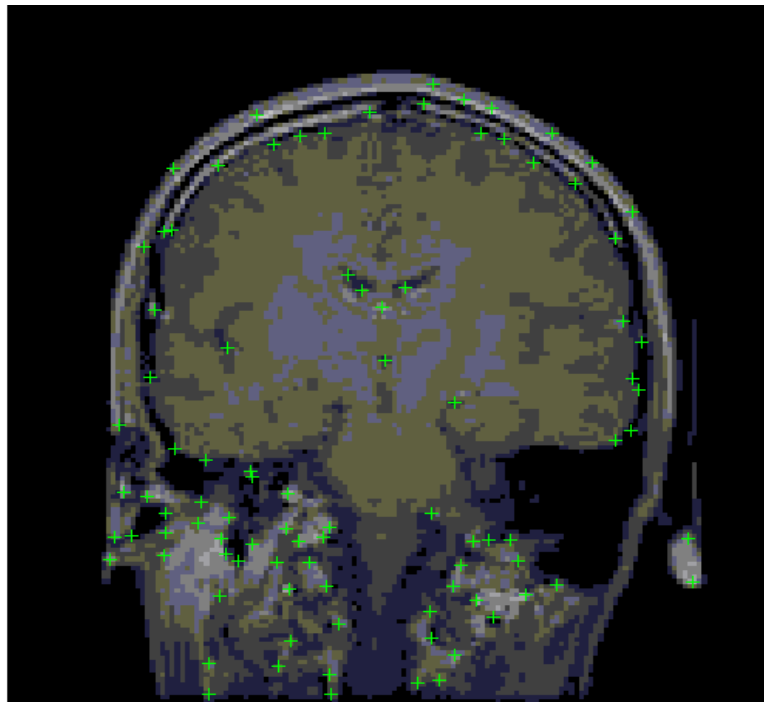


Figure (3): Harris corner features

**2. Proposed matching features:** Throughout this step we found the correspondences or the similar features in these two input images instead of using all features that extracted from two images. This step gives more accuracy and speed up the work. We use a technique to increase the reliability of point correspondences by clustering three features together and examining if they are the identical in the unregistered image as in the reference image. The probability is much higher for clusters of being right than for singular feature matches.

In this procedure the features vector that obtained from previous step ( Harris corner detector) were utilized, and the output of procedure is the set of centroids, which were used as inputs to the next step. This work is intended to provide a contribution to determine the correspondences between two images. It helps an automatic feature selection. In addition to the higher performance of the registration method by restricting to fewer features reduced at the same time the complexity of the whole technique. This also helps the results to be better interpreted.

After local clusters are specified in two images, a point-matching scheme requires to be implemented to find similar points in two images by intends of analyzing the clusters. Once they are matched they are referred to as point correspondences (figure 4). Matches are established by evaluating a similarity measure or distance measure.

If we have two pixels  $R_1$  and  $R_2$  , the euclidean distance is:

$$D(R_1, R_2) = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2} \dots\dots\dots(1)$$

If there is a pixel  $R_1$  and group of pixels  $F$ , the euclidean distance among them is:

$$D(R_1, F) = \min_{i \in 1..n} D(R_1, F_i) \dots\dots\dots (2)$$

The real implementation of such scheme requires assessing a distance or similarity mark of every interest point in one image against every interesting point in the other image. Bad pairs are removed and good pairs are selected after examining the best match mark against other match marks for each set of correspondences.

The refuse of couples of pixels is implemented upon pixels which their distances from other are greater than the specific threshold.

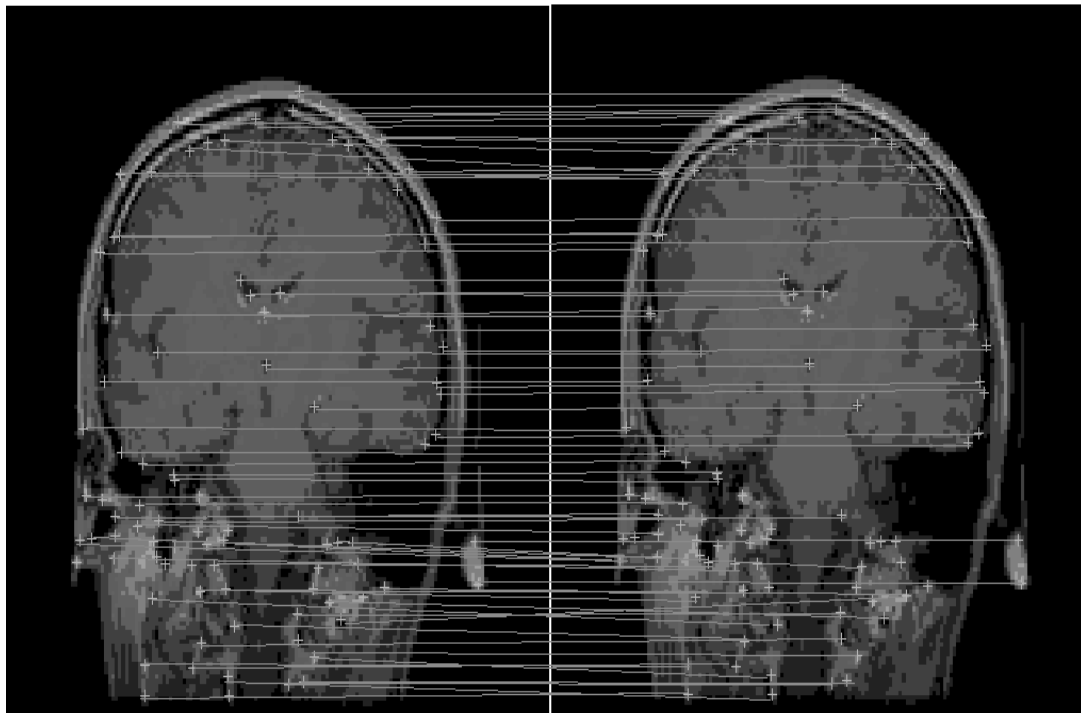


Figure (4): Correspondences points between two images

**3. ICP (Iterative Closest Point) Algorithm:** The ICP (Iterative Closest Point) algorithm is commonly used for geometric matching of images when a firstly approximate of the proportional poses is known. The ICP algorithm has become the prevalent technique for matching images focused strictly on the geometry, and sometimes color, of the images. ICP starts with two images and firstly suppose for their proportional stiff -body transform, and iteratively improve the transform by repeatedly creating couples of same in pixels on the images and decreasing an error metric. Repeatedly creating a group of seamen pixels using the actual transformations and finding new transformations that decreases the error metric (9). Many variants have been introduced to the basic ICP concept. We may classify these variants as affecting one of six stages of the algorithm (10):

1. Selecting groups of pixels randomly from the two images
2. Matching these pixels to each other.
3. Weighting the matching pixels .
4. Rejecting matches that below a specified threshold .
5. Evaluate an error metric based on the matches pixels.
6. Decreasing the error metric.

We preferred to use this algorithm because it is very sensitive to image scale and rotation and it is provide a high accuracy for image alignment , but it have some limitation in time performance if we can finding features couples in advance , that can speed

up the performance of the algorithm and give it more strong in various results. In order to speed up the registration step and owing to the robustness of the Harris corner features, the known point correspondence based on section 4.2 was utilized. The alignment process uses the ICP algorithm to calculate a rigid transformation using point correspondences.

**4. Proposed alignment method:** This technique depends on the difference of the images that are minimal. If  $I_1$  and  $I_2$  are two images that tend to overlap, we will assign the weight value ( $w$ ) to the pixels in these images, where both images will contribute equally to create stitched images . The value of ( $w$ ) is either 1 or 0 . If  $w=0$  then the pixel has no effect in composite image while when  $w=1$  implies the pixel is copied there (figure 5).

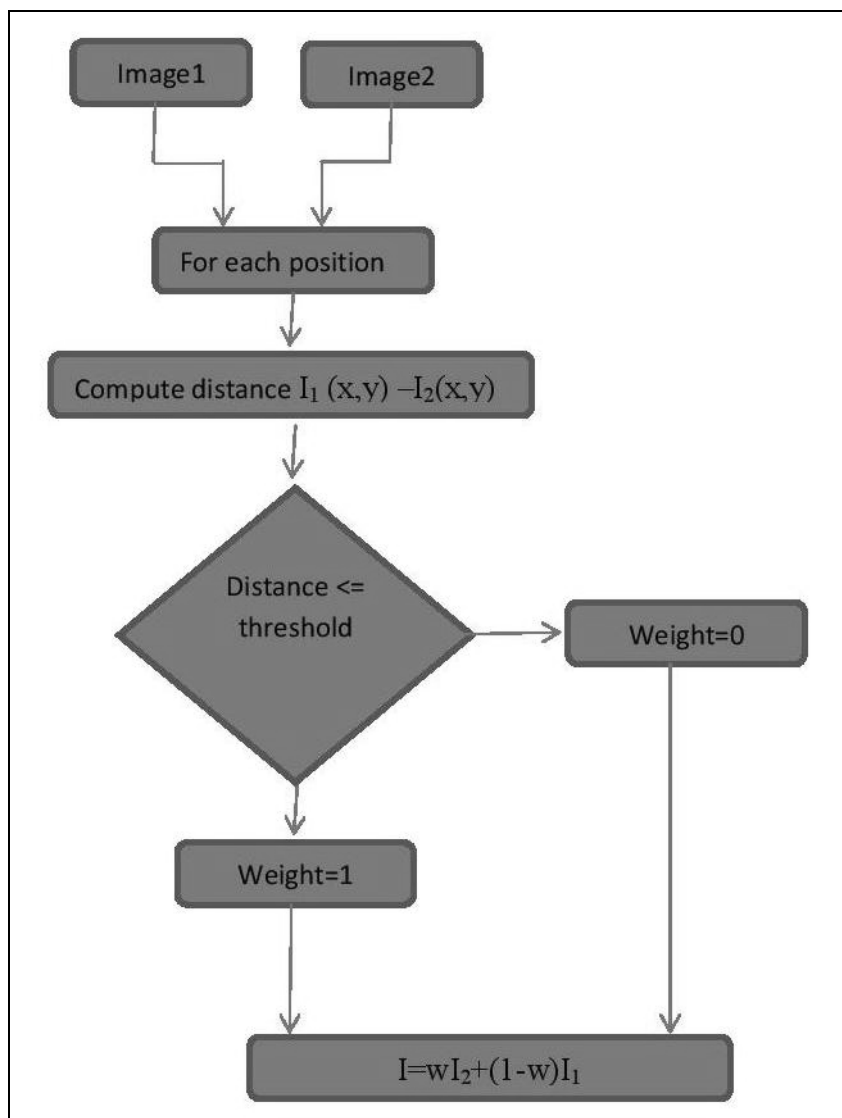


Figure (5): flowchart of alignment process

## RESULTS

The alignment results obtained from our approach are summarized in figure (6). This figure revealed that the convergence rate and error of registration was minimized iteratively, in each iteration the mean square error was minimized. In this method we provide minimal value of error. We reached to success rate 0.32 and the time taken in process was 1.7 seconds.

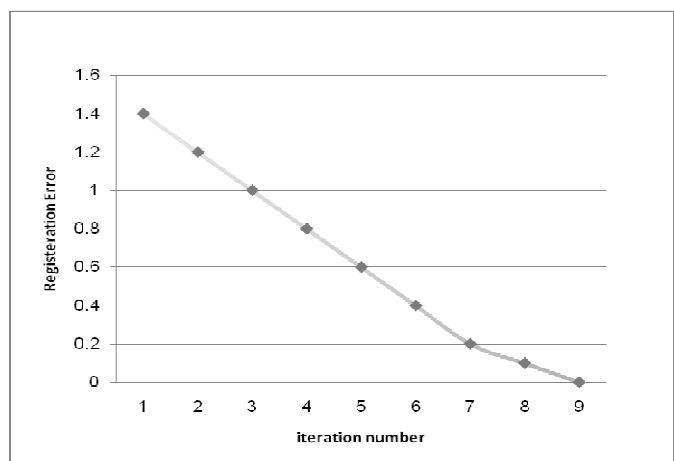


Figure (6): Convergence rate for proposed system

## DISCUSSION

To implement the proposed method, database which have 10 different sequences were used, each of them have 120 images with (640x480) resolution. Most registration techniques use Target

Registration Error (TRE) to evaluate the quality and performance of these techniques. In this method target registration error and root mean square error were used to evaluate the accuracy. Table (1) exhibits the results for all sequences.

**Table (1): Experimental results of proposed method**

	TRE	RMSE	TIME/Sc
Sequence 1	0.37	0.41	2.5
Sequence 2	0.37	0.41	2.5
Sequence 3	0.67	0.63	2.3
Sequence 4	0.72	0.67	2.4
Sequence 5	0.38	0.41	2.5
Sequence 6	0.20	0.34	1.7
Sequence 7	0.37	0.41	2.5
Sequence 8	0.37	0.41	2.5
Sequence 9	0.38	0.41	2.5
Sequence 10	0.28	0.32	1.8

From these results, it was found that the method reached best accuracy with sequence 6, where the target registration error had minimum value, but the mean sequence error was minimum in sequence 10 and sequence 6 satisfied short registration time. All sequences had gained best results and the accuracy ratio is accepted comparing with another registration methods. Comparing with (8) the TRE had decreased from 0.31 to 0.20 and RMSE decreased from 0.76 to 0.32.

## CONCLUSION

The present study introduced an image analysis technique that can be used for image alignment that gives high accuracy to get faster performance. Image registration using feature based method is faster and always successful to reach the accurate results rather than pixel registration methods which are slower and do not always reach to accurate results. This method is active because it successfully removes the seams and discontinuities on the composite images. The algorithm implements very well in detecting the matches of clusters of features between images and aligning them with high accuracy and low time performance.

## REFERENCES

1. Wang L.; Traub J.; Weident S.; Heining SM.; Euler E. and Navab N. (2010). Parallax-free intra-operative x-ray image stitching. *Med .Image Anal.* 14(5):674-686.
2. Calvary G.; Coutaz J.; Thevenin D.; Limbourg Q. and Bouillon L.(2003). A unifying reference

framework for multi-target user interfaces. *Interact. Comp.* 15: 289–308.

3. Fischler MA. and Bolles RC. (1981). Random sample consensus: a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Comm. ACM* . 24(6): 381–395.
4. Yoon K. and Kweon I.(2006). Adaptive support-weight approach for correspondence search. *IEEE Trans. PAMI.* 28(4):650–656.
5. Scharstein D. and Szeliski R. (2002). A taxonomy and evaluation of dense two-frame stereo correspondence algorithms. *IJCV.* 47(1):7–42.
6. Hsu K.; Lin Y. and Chuang Y.(2015). Robust image alignment with multiple feature descriptors and matching-guided neighborhoods. *IEEE International Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR).*
7. Azuma R. (1997). A survey of augmented reality. *Presence. Teleoperat. Virt. Environ.* 355–385.
8. Liarokapis F.; Greatbatch I.; Mountain D.; Gunesh A.; Brujic-okretic V. and Raper J. (2005). Mobile augmented reality techniques for geovisualisation. in *Proc. of the 9<sup>th</sup> International Conference on Information Visualisation.* IEEE Comp. Soc. 745–751.
9. Platonov J.; Heibel H.; Meier P. and Grollmann B. (2006). A mobile marker lessar system for maintenance and repair. in *ISMAR '06: Proc. of the 5<sup>th</sup> IEEE and ACM International Symposium on Mixed and Augmented Reality.* (Washington, DC, USA). Pp.:105–108.
10. Lowe D. (1999). Object recognition from local scale-invariant features. In *Computer Vision, The Proceedings of the 7<sup>th</sup> IEEE International Conference.* Vol. (2): 1150 –1157.

## The effect of low level laser therapy on the salivary IL-6, IL-10 and IgA in patients having oral candidiasis

Hadeel S. Alazzawi and Jamal N. Ahmed

Dept. of Oral Diagnosis / College of Dentistry / University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: hadeelalazzawi@yahoo.com

### ABSTRACT

Oral candidiasis is a common oral mucosal infection, that in some patients if the lesion was untreated, may lead to serious complications. Several searches pointed out to low level laser therapy as a treatment modality alternative to conventional medicines. Low level laser has efficacious in modulation of salivary immune markers.

The aim of this study was conducted to evaluate the salivary level of IL-6, IL-10 and IgA pre and post laser therapy and compare them with Nystatin antifungal therapy.

Forty two (42) patients with Candida induced denture stomatitis were divided into 2 groups; laser group was radiated with 60 mW, 660nm diode laser in alternative day therapy for 10 days. Nystatin group was given Mycostatin™ oral suspension 100 000 U three times daily as topical mouth therapy. Salivary swab for estimation of *Candida albicans* colonies cultivated on agar media. Elisa method was performed to determine the salivary levels of IL-6, IL-10 and IgA pre and two times post treatment.

Results showed that salivary IL-6 concentration was reduced slightly in Nystatin and laser groups. Comparing pre and post laser therapy, there was no statistically significant difference found. IL-10 concentrations were reduced in both study groups, but the reduction was not statistically significant inside each group.

Salivary IgA was reduced in Nystatin group but statistically, there was no significant difference within the group. In laser group IgA concentration was increased but, statistically there was no significant difference in this group. By comparing between Nystatin and laser group, all salivary markers showed that no statistically significant differences.

The study concluded that low level laser application decreased the IL-6 and IL-10, and increase IgA release after 5exposure sessions. However, statistically there was no modulation of these marker pre and post radiation and when comparing with Nystatin therapy.

**Keywords:** candidiasis, low level laser therapy, cytokines, IgA

### الملخص باللغة العربية

يعتبر داء المبيضات الذي تسببه الفطريات البيضاء في الفم من الأمراض الإنتانية الأكثر شيوعاً ، وتزداد حدته وخطورته عند المرضى ذوي المناعة المنخفضة إذا لم يعالج بصورة صحيحة وسريعة. ولقد درست بحوث عديدة إمكانية استخدام العلاج الضوئي (الليزر منخفض الطاقة) كبديل للعلاج الدوائي، لما لهذا النوع من الليزر من خصائص القدرة على تعديل إفراز الأجسام المناعية في اللعاب، مما يؤدي إلى تغيير بمناعة الفم ضد الفطريات.

في هذه الدراسة تم استخدام الليزر منخفض الطاقة (دايود ذو طول موجي 660 نانوميتر) على عينة من المرضى لعلاج داء المبيضات، وتم قياس نسبة تركيز السيتوكينات (IL-6 , IL-10 ) و عامل الجلوبيولين المناعي نوع A في اللعاب قبل وبعد العلاج، ومقارنتها بالمرضى مستخدمي دواء النستاتين. وقد بينت النتائج نقصاناً بتركيز كل من (IL-6 , IL-10 ) وزيادة في عامل الجلوبيولين المناعي A بعد خمس جلسات من إشعاع الليزر. غير أن النتائج الإحصائية لم تسجل أي اختلاف معنوي بنسبة كل من ( IL-6 , IL-10 ) و عامل الجلوبيولين المناعي A سواء قبل أو بعد العلاج، بالإضافة إلى المقارنة مع مجموعة النستاتين.

## INTRODUCTION

In recent years, the risk of opportunistic fungal infections has significantly increased in patients who are severely immunocompromised such as in human immunodeficiency virus infection, organ or bone marrow transplantation and cancer chemotherapy (1-3).

Immune mechanisms against *Candida* infections are potentially protective and comprise specific and non-specific immunity. Protective immunity in *Candida* associated denture stomatitis is mainly linked to Immunoglobulin A (IgA) antibodies and cell mediated immunity (1,4). The antibodies may be a first line of defence against candidiasis. They prevent organism adherence to the mucosal surface (2,5). The relation between *Candida* stomatitis and cytokines may be altered. Interleukin 6 (IL-6) level in saliva was significantly increased when compared with healthy subjects, therefore it is considered as an objective marker for diagnosis and detection of this condition (6). IL-10 is anti-inflammatory cytokine that inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and impair anti fungal effect or functions by phagocytes (7,8). IgA in patients with *Candida* induced denture stomatitis, there is elevated level of these antibodies against *C. albicans* (2,9). The wide use of topical and systemic antifungal among immunocompromised patients resulted in increase number of isolates resistant to this therapy. This resistance is mainly associated with severe immunosuppression, and long period of treatment, hence the development of alternative therapies for oral candidiasis without the use of medicines is demanded (10,11). One of the effective methods is by using phototherapy, specifically low intensity laser radiation (10,12). In patients with *Candida* induced denture stomatitis, laser therapy resulted in a significant decrease in salivary proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6. These patients were treated by 685nm GaAlAs diode laser for 5 days a week for four consecutive weeks (13). Another study concluded that IL-10 was reduced while TNF- $\alpha$  and IL-6 had same effect after 660 nm low level laser (LLL), and noticed the local application of energy is more efficient than dividing it around the inflammation area (14). Treatment of oral mucositis by 35 sessions of 660 nm laser resulted in significant reduction of salivary IL-6. But there was slight reduction in salivary IL-10 after laser irradiation with no significant difference compared with non radiated control group (15), while 7 days of treatment had shown increase in the level of salivary IL-6 (16). A further study conducted by (17), revealed the immunomodulating effect of LLL on delay type hypersensitivity, as very significant reduction in the density of the inflammatory infiltrate and by a significant reduction in the levels of TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and IL-10. Investigations using laser on *Candida* infection encourage further in vivo studies to explore the potential application of this protocol for oral candidiasis.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the immunological marker in oral candidiasis patients by applying certain parameters of low level laser irradiation.

## PATIENTS AND METHODS

Patients recruited for the study must be fulfilled the clinical selection criteria of oral candidiasis plus the trial *Candida albicans* positive culture in mucosa or saliva. Patients were collected from the oral medicine clinic, College of Dentistry, Baghdad University, and from Specialist Dental health centres in Baghdad city. All patients were informed about the nature of this treatment and informed consent form was obtained from all participants. Participants' legal guardians in accordance with the College of Dentistry, Baghdad University and signature of approval were achieved.

Clinical signs in palatal mucosa consistent with oral candidiasis were categorized as Newton's criteria (18); Grade 1: pinpoint hyperaemia; Grade 2: generalized erythematous type; Grade 3: granular type. The patients were requested to refrain from the use of any medicaments throughout the trial. Forty two patients were divided into 2 groups; Nystatin group: (N=20): patients with *Candida* were given antifungal Mycostatin™ (Nystatin) oral suspension 100 000 U (SB Egypt L.L.C). The patients were instructed to use 1 ml three times daily for two minutes. They have used the dropper to place the liquid inside the mouth near to the affected areas and were tried to swish the suspension around the mouth and then keep it on the affected areas for as long as possible before swallow and not to eat or drink anything post rinsing at least for an hour.

Laser group (N=22) patients were subjected to Indium-Gallium-Aluminum-Phosphide (InGaAlP) Photonlase I laser applications with 660 nm wavelength. In screen of display of the device the laser parameters was adjusted by selecting the output power 60 mW, CW and energy density 10 J/cm<sup>2</sup>. Then the display screen showed the accumulated dose (expressed in Joules), in real time. The application time (which is automatically calculated by program based on the value supplied, here the time delivery per point was 4 seconds, patient would receive each point 0.24 J (each session a 3.1 joules) though total time calibrated about 52 seconds for each session according to the following equation:

$$\text{Time (sec)} = \text{Energy (Joule)} / \text{power (Watt)}.$$

For each point:

$$\text{Time (sec)} = 0.24 \text{ J} / 0.06 \text{ W} = 4 \text{ sec (that display on screen at each beeps of the device indicating end of point dosage)}.$$

$$\text{For session: Time (sec)} = 3.1 \text{ J} / 0.06 \text{ W} = 51.6666.$$

Patients had laser applications in alternative days, the probe was held perpendicularly and slightly contact with oral mucosa. The spot technique was used with a slight overlapping in order to evenly distribute energy covering all palatal mucosa.

Unstimulated Saliva Collection was performed when patients were instructed to refrain from eating and drinking for 1 hour prior to salivary collections. All collections were performed between 8:30 and 11:00 AM. Subjects were instructed to swallow to clear the mouth of any accumulated saliva, tilted his head forward, and whole unstimulated 2 ml of saliva was allowed to pool in a disposable sterilize plastic container. Palatal mucosa and salivary swab

was plated immediately to the Sabouraud dextrose agar plate then sent to microbiology laboratory, incubated aerobically at 37 °C for 48 hours. Gram stain and germ tube was done for identification of *Candida albicans*. Saliva sample were centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm, and the supernatant aliquot stored at -65°C until immunological analysis. In Nystatin group, saliva sample was collected in baseline first visit and after two days during medicine administration. In laser group, the sample of saliva was collected pre laser therapy every two laser session start at baseline (three sample of saliva were obtained from each patient). Elisa (abcam CO., USA) was performed to determine salivary IL-6, IL-10 and IgA. The assay was performed according to manufacture instructions.

Data analysis was created with Statistical Package for Social Sciences version 21 (SPSS). The age is a normally distributed variable and was therefore conveniently described by mean, SD (standard deviation). The statistical significance of mean change after treatment was assessed by Wilcoxon signed rank test. Paired observation is 2 repeated measurements for the same subject separated by an intervention or some time factor. P value less than the 0.05 level of significance was considered statistically significant.

## RESULTS

Out of the 42 patients eligible for inclusion in the study, the patients were randomized into equal size groups, however only 37 had valid results, the remaining 5 patients were excluded from the study for different reasons.

There were N=17 in Nystatin treatment group (3 males, 14 females), their age ranges between 38-72 years, mean age  $\pm$ SD was 55.1 $\pm$ 11.1. Laser treatment group N=20 (9 males, 11 females) age ranges 30-75 years, mean age  $\pm$ SD was 56.3 $\pm$ 13.4.

At base line pretreatment, most patients had grade 2 diffuse erythema (17), 8 in Nystatin group and 9 in laser group. Papillary hyperplasia was 11 patients (4 in Nystatin group and 7 in laser group) and least number were patients categorized as grade one pin point erythema that was 9 patients (5 in Nystatin group and 4 in laser group). There was no significant difference noticed between the two study groups (P= 0.69).

The immunological changes after 4 days therapy were shown in table 1. In Nystatin group, there was reduction in IL-6 concentration by 3.52 in median value, but statistically, there was no significant difference between pre and 4 days post treatment (P= 0.13). In laser group the IL-6 also reduced (median of changes = -0.39) with no significant differences statistically (P, Wilcoxon-signed rank test = 0.97).

Salivary IL-10 concentration in Nystatin and laser groups was slightly reduced (median changes = -0.15 in Nystatin, -0.16 in laser), therefore, statistically, there was no significant difference within the groups after 4 days of treatment and no significant difference between two groups (P, Wilcoxon-signed rank test= 0.61).

The effect of 4 days therapy (changes) on salivary IgA comparing to its pretreatment level, in Nystatin group was observed increasing in IgA concentration by 25.4 but statistically, there was no significant changes between pre and 4 days post treatment (P=0.55). Also in laser group, the median of changes was increased after three doses of laser irradiation (18.45). But statistically, there was no significant changes (P= 0.2).

By comparing between two study groups according to IgA concentration, there was no significant differences between them statistically (P, Wilcoxon-signed rank test= 0.56) (Table 1).

In comparison of salivary immunological marker concentration after 8 day of therapy with pretreatment level (baseline) (Table 2), in Nystatin group, median of IL-6 salivary concentration was reduced slightly (median of changes = -1.37), so as laser group (median of changes = -1.35). However, there was no significant difference between two type of treatment (P= 0.66).

The median value of IL-10 concentration reduced after 8 day in both study groups, but this reduction was not statistically significant inside each group. No significant differences found between the two groups (P=0.66).

Salivary IgA was markedly reduced in Nystatin group patients (median of changes= -42.85) but statistically, there was no significant differences within the group (P=0.14). In laser group and after 4 doses of laser irradiation after 8 days, the average concentration of sIgA was increased (median of changes=51.15). Statistically there was no significant differences observed within this group (P= 0.33).

In comparing between the effect of two modalities of treatment according to IgA concentration, there was no significant differences between them (P= 0.11).



Table (1): The effect of 4 days of therapy (changes) on immunological aspect compared to its pretreatment level in each study group

			at baseline (pretreatment)	after 4 days of treatment	changes after 4 days of treatment	P (paired test) Wilcoxon signed rank test
IL-6 pg/ml	Nystatin	Range	(1.76 to 82.07)	(0.85 to 38.58)	(-46.78 to 12.09)	0.13[NS]
		Median	9.67	7.01	-3.52	
		Inter-quartile range	(4.71 to 26.49)	(1.64 to 27.2)	(-5.08 to -0.12)	
		N	13	13	13	
	Laser	Mean rank=			11.8	0.97[NS]
		Range	(0.44 to 34.39)	(0.83 to 26.29)	(-8.1 to 19.25)	
		Median	6.195	5.86	-0.395	
		Inter-quartile range	(0.71 to 11.91)	(2.31 to 10.93)	(-3.42 to 1.83)	
		N	14	14	14	
		Mean rank=			16.1	
		Paired (Wilcoxon- signed rank test)			0.16[NS]	
IL-10 pg/ml	Nystatin	Range	(0.35 to 50)	(0.23 to 1.53)	(-49.47 to 0.92)	0.06[NS]
		Median	0.73	0.51	-0.15	
		Inter-quartile range	(0.41 to 1.17)	(0.39 to 0.58)	(-0.56 to 0.02)	
		N	13	13	13	
	Laser	Mean rank=			13.2	0.68[NS]
		Range	(0.42 to 44.57)	(0.21 to 8.57)	(-43.03 to 4.77)	
		Median	1.04	0.865	-0.165	
		Inter-quartile range	(0.59 to 3.66)	(0.59 to 3.24)	(-0.45 to 0.42)	
		N	14	14	14	
		Mean rank=			14.8	
		Paired (Wilcoxon- signed rank test)			0.61[NS]	
Ig-A ng/ml	Nystatin	Range	(6 to 154.5)	(5.7 to 123)	(-111.3 to 87.1)	0.55[NS]
		Median	35.8	43.2	25.4	
		Inter-quartile range	(23.2 to 114.4)	(22.8 to 70.2)	(-90 to 49.7)	
		N	13	13	13	
	Laser	Mean rank=			13.1	0.2[NS]
		Range	(6 to 174.5)	(47 to 174.5)	(-107.5 to 0.1)	
		Median	111.5	130.7	18.45	
		Inter-quartile range	(37.7 to 154.5)	(81.3 to 154.5)	(-6 to 63)	
		N	14	14	14	
		Mean rank=			14.9	
		Paired (Wilcoxon- signed rank test)			0.56[NS]	

Table (2): The effect of 8 days of therapy (changes) on immunological aspect compared to its pretreatment level in each study group

			at baseline (pretreatment)	after 8 days of treatment	changes after 8 days of treatment	P (paired test) Wilcoxon signed rank test
IL-6 pg/ml	Nystatin	Range	(1.76 to 82.07)	(0.24 to 48.71)	(-33.36 to 15.62)	0.44[NS]
		Median	14.3	17.53	-1.37	
		Inter-quartile range	(5.13 to 30.85)	(2.74 to 22.55)	(-13.71 to 2.75)	
		N	10	10	10	
	Laser	Mean rank=			9.0	0.67[NS]
		Range	(0.44 to 34.39)	(2.13 to 84.67)	(-9.24 to 72.76)	
		Median	7.895	6.06	-1.325	
		Inter-quartile range	(2.25 to 2.195)	(2.58 to 18.7)	(-6.31 to 4.305)	
		N	12	8	8	
		Mean rank=			10.1	
		Paired (Wilcoxon- signed rank test)			0.66[NS]	
IL-10 pg/ml	Nystatin	Range	(0.35 to 50)	(0.31 to 1.48)	(-49.37 to 0.27)	0.41[NS]
		Median	0.73	0.62	-0.04	
		Inter-quartile range	(0.41 to 0.91)	(0.37 to 0.78)	(-0.19 to 0.06)	
		N	10	10	10	
	Laser	Mean rank=			10.0	0.26[NS]
		Range	(0.42 to 44.57)	(0.55 to 1.3)	(-2.85 to 0.88)	
		Median	1.07	0.77	-0.17	
		Inter-quartile range	(0.66 to 3.73)	(0.63 to 0.9)	(-1.66 to 0.11)	
		N	12	8	8	
		Mean rank=			8.9	
		Paired (Wilcoxon- signed rank test)			0.66[NS]	
Ig-A ng/ml	Nystatin	Range	(6 to 154.5)	(5.8 to 96.7)	(-141.7 to 75.6)	0.14[NS]
		Median	55.2	22.7	-42.85	
		Inter-quartile range	(23.2 to 119)	(12.8 to 35.9)	(-96.9 to 16.7)	
		N	10	10	10	
	Laser	Mean rank=			7.7	0.33[NS]
		Range	(6 to 174.5)	(5.9 to 153.3)	(-148.6 to 97.9)	
		Median	92.65	128.45	51.15	
		Inter-quartile range	(30.85 to 54.5)	(112.8 to 141.65)	(-12.05 to 97.15)	
		N	12	8	8	
		Mean rank=			11.8	
		Paired (Wilcoxon- signed rank test)			0.11[NS]	

## DISCUSSION

Cytokines are regulatory proteins produced by immune cells and other cells of the body. Cytokines may exert pro inflammatory and anti-inflammatory effects. The abnormalities of various cytokines may reflect the imbalance among different immune cell subsets contributing to pathogenesis of disease (19,20).

The cytokines investigated in this study were chosen based on the fact that they represent important member of pro inflammatory (IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-10). In addition, IgA is antibody molecule playing an important role in cell mediated immunity and is considered first line of defence against *Candida* (1,2,4,9,21).

Many patients were diagnosed with clinical apparent *Candida* associated denture stomatitis, however the investigators faced limitation in recruiting patients since the lesion is associated with minor symptoms and due to frequent or multi visiting treatment plan.

The effect of laser radiation after 4 days of treatment (after two doses of laser radiation) on salivary IL-6 level is observed slightly reduced, and the reduction was continued till day 8 (after 5 doses of laser radiation), but statistically there was no significant difference before and after treatment. Also in comparison to Nystatin group, there was no significant difference although the IL-6 in Nystatin group was reduced more than laser group at the end of the treatment.

The anti-inflammatory efficacy of low level laser therapy (LLLT) has been controversial. While some searches have not found any effect from LLLT on inflammation, some findings showed that TNF- $\alpha$  decreased (22-25), but not change the level of IL-6 (22,23). However, others showed increase in IL-6 accompanied with increasing TNF- $\alpha$  (16).

Simunovic-Soskic and other colleagues concluded that salivary IL-6 has been significantly decreased after laser therapy in patients with denture stomatitis, the study had used long term of treatment in which 685nm diode laser for 7 min exposure time for five days in a week and for 4 consecutive weeks (13). Pezelj-Ribaric *et al* used the same parameters and dosimetry in treatment of burning mouth syndrome and the study reported the same results of highly significant decrease of salivary IL-6 level (25). The significant reduction of IL-6 has shown by using 25 mW power output, 660 nm laser for 35 sessions for treatment of oral mucositis (15).

The controversy of this study with others is probably related to the critical dose of LLLT that appears reducing proinflammatory cytokines, related by lower levels of IL-6 which suggest less damage to the oral mucosa (14,15, 24,26, 27).

Interlukine-10 is anti-inflammatory cytokine which inhibits the secretion of pro inflammatory cytokines and impair anti fungal effect or functions by phagocytes, it increased the innate antifungal resistance (7,8,28). In vitro, *C. albicans* induces immunosuppression in which increased IL-10 production by macrophages (29). In the present study, salivary IL-10 was slightly reduced after laser irradiation, but the result did not reach statistical significance between baseline and after day 8 of treatment (after 5 doses of LLLT) which agrees with the results reported by Oton-Leite, et al

(15), however disagree with results of Silva et al, who used 660 nm LLLT in treatment of oral mucositis for 7 sessions continuously (16). Other studies that used 660 nm have concluded decreased level of local IL-10 post laser therapy (14,17).

In present study, with regard to salivary IgA concentration, the data showed an enhancement for those patients undergoing LLLT in most the times evaluated (after 4 days and 8 days of laser therapy); however, this difference was not statistically significant when compared with the Nystatin group. Low level laser therapy was used in treatment of inflammation of oral candidiasis in a based on a biomodulation effect (biostimulation or bioinhibition). Biostimulation has been used clinically for decreasing inflammation (13, 23, 30-35) However, the mechanisms underlying the anti-inflammatory properties of low-level laser remain unknown (13,15,27). After tissue radiation, DNA-RNA-protein system is stimulated and mitotic activity of cell is raised (36). This occur through modification of cellular homeostasis of the mitochondria promoting a cascade of events in the respiratory chain of cytochromes, cytochrome oxidase and flavin dehydrogenase that permit absorption of light (37, 38) that lead to increase in mitochondrial content of ATP, transmembrane potential and pH and changes in ultrastructure of organelles. These changes in mitochondria promote cell division (31,35,39). Multiplication of the nucleus and cytoplasm cleavage of immune cells like neutrophil and macrophage lead to increasing immune response (35, 40). Low level laser increases the depressed suppressor T-cell functions but does not decrease hyperfunction of helper T-cells. In this case, anti-inflammatory effects stimulate suppressor T-cell deficit and this is differ from mechanism of steroidal medication that decrease hyperfunctioning inflammatory cells (35). T-cell and macrophage mediated activation of the immune system is important in the host defence mechanisms in oral candidiasis (19). Macrophages exposed to low level wavelengths release cytokines which stimulate fibroblast proliferation and the production of cytokines, thus influencing the inflammatory process and healing (30,41) This results in a rapid and more epithelialization and regeneration of mucous membrane in the area of the lesion (42,43). In addition, LLLT improve peripheral circulation, oxygenated hypoxic cells and help in removing noxious products (35,44). The migration of leukocytes, in turn, produces further antiinflammatory cytokines and other mediators (15, 35), lead to decrease the inflammation on site of infection. LLLT reduced proinflammatory cytokines such as TNF-  $\alpha$  and IL-6 (13). And this depends on dose of laser radiation (14,24,26). During low grade inflammation, induced by *Candida* infection, cytokines may provide a regulatory link among secretory immunoglobulin production (19). There is positive shift in the level of T-lymphocytes, immunoglobulines, such as IgA and IgM, as well as lysozyme in saliva under the effect of a laser irradiation of the oral mucous membrane when there was induction of humoral immunity by low level laser, as indicated by induction cytokines that appeared to be inducing IgA production (45).

Although this clinical trial selected patients with similar treatment protocols for oral candidiasis. There were some limitations, from reviewing the

literature, a lot of controversies were found on the relation between salivary cytokine concentration and oral candidiasis which could explain the great variability found in the concentration of inflammatory mediators from one patient to another in this study. This is because of the many factors that cause limitations as nutritional status (46), stress (47), age, rate of salivary flow, bacterial colonization, presence of periodontitis, hormonal, individual genetic influence and methodology which could explain the great variability found in the concentration of inflammatory mediators from one patient to another in this study (13, 15, 48).

Despite its limitations, this trial provides evidence that LLLT brought about a clinical improvement in Candida induced denture stomatitis patients. However, it was not possible to establish completely the exact mechanism of action of laser therapy in oral candidiasis. It is still far from thoroughly elucidation due to the fact that it is a dynamic process involving biological events influenced by the oral micro-environment. Therefore, additional studies with large numbers of subjects and different protocols of laser irradiation are warranted in order to understand the effect of LLLT.

## CONCLUSION

In spite of the reduction in the salivary level of IL-6, IL-10 and IgA, statistically low level laser application after 5 doses of 60 mW laser did not show an anti inflammatory effect in salivary immune marker of patients with Candida induced denture stomatitis.

## REFERENCES

1. Budtz-Jørgensen E. (2000). Ecology of *Candida*-associated denture stomatitis. Microb. Ecol. Health. Dis. 12: 170–185.
2. Rao PK. (2012). Oral Candidiasis: a review. Biol. Biomed. Rep. 2(2):110-114.
3. Jontell M. and Holmstrup P. (2015). Red and white lesions of the oral mucosa. chapter 5. In Burket's Oral Medicine. edited by Glick M. 12<sup>th</sup> ed. PMPH- Shelton, Connecticut, USA. pp:93-99.
4. Samaranyake L. (2012). Diagnostic microbiology and laboratory methods. In essential microbiology for dentistry. 4<sup>th</sup> ed. Churchill, Livingstone Elsevier. pp: 49-65.
5. Epstein JB.; Kimura LH.; Menard TW.; Truelove EL. and Pearsall NN. (1982). Effects of specific antibodies on the interactions between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. Arch. Oral Biol. 27: 469–474.
6. Gasparoto TH.; Sipert CR.; deOliveira CE.; Porto VC. *et al.* (2011). Salivary immunity in elderly individuals presented with Candida related denture stomatitis. Gerodontology. 29:1-9.
7. Gasparoto TH.; Gaziri LJ.; Burger E.; Almeida RS. and Felipe I. (2004). Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10 FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 42 (2): 219–224.
8. Romani L. (2004). Immunity to fungal infections. Nat. Rev. Immunol. 4:1-23.
9. Torres SR.; Peixoto CB.; Caldas DM.; Akiti T. *et al.* (2007). A prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in patients with hyposalivation. Braz. Oral Res. 21(2):182-187.
10. Maver-Biscanin M.; Mravak-Stipetic M. and Jerolimov V. (2005). Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. Photomed. Laser Surg. 23(3): 328–332.
11. Rossoni RD.; Barbosa JO.; deOliveira JO.; deOliveira FE. *et al.* (2014). Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. Lasers Med. Sci. 29 (5):1679-1684.
12. De Souza SC.; Junqueira JC.; Balducci I.; Koga-Ito CY. *et al.* (2006). Photosensitization of different Candida species by low power laser light. J. Photochem. Photobiol. 83: 34–38.
13. Simunovic-Soskic M.; Pezelj-Ribaric S.; Brumini G.; Glaz'ar I. *et al.* (2010). Salivary levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. Photomed. Laser Surg. 28(2): 189-193.
14. Boschi ES.; Leite CE.; Saciura VC.; Caberlon E. *et al.* (2008). Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. Laser. Surg. Med. 40:500–508.
15. Leite OAF.; Geisa BL.; Marlia SO.; Tarcia MA. *et al.* (2015). Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. Laser. Surg. Med. 47:296–305.
16. Silva GBL.; Sacono NT.; Othon-Leite AF.; Mendonça EF. *et al.* (2015). Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. Laser. Med. Sci. 30:117–126.
17. Oliveira RG.; Ferreira AP.; Côrtes AJ.; Aarestrup BJ.; Andrade LC. and Aarestrup FM. (2013). Low-level laser reduces the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10 induced by OVA. Laser. Med. Sci. 28(6):1519-1525.
18. Newton AV. (1962). Denture sore mouth, a possible etiology. Br. Dent. J. 112:357-360.
19. Dongari-Bagtolglou A. and Fidel P. (2005). The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. J. Dent. Res. 84:966–977.
20. Schroeder JT. (2014). Diagnostic components: T helper cell cytokines (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17). In Mackay IR. and Rose NR. Encyclopedia of medical immunology, Allergic diseases. Springer NY, USA. pp: 221-226.
21. Filler SG.; Pfunder AS.; Spellberg BJ.; Spellberg JP. *et al.* (1996). Candida albicans Stimulates Cytokine Production and Leukocyte Adhesion Molecule Expression by Endothelial Cells. Infect. Imm. 64(7):2609–2617.
22. Yamaura M.; Yao M.; Yaroslavsky I.; Cohen R.; Smotrich M. and Kochevar IE. (2009). Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. Laser. Surg. Med. 41:282–290.
23. Fukuda TY.; Tanji MM.; Silva SR.; Sato MN. and Plapler H. (2013). infrared low-level diode laser on inflammatory cytokines. Laser. Med. Sci. 28 (5): 1305-1231.

24. Aimbire F.; Albertini R.; Pacheco MT.; Castro-Faria-Neto HC.; Leonardo PS. *et. al.* (2006). Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF levels in acute inflammation. *Photomed. Laser Surg.* 24(1): 33–37.
25. Pezelj-Ribarić S.; Kqiku L.; Brumini G.; Muhvić Urek M. *et. al.* (2013). Proinflammatory cytokine levels in saliva in patients with burning mouth syndrome before and after treatment with low-level laser therapy. *Laser. Med. Sci.* 28 (1): 297-301.
26. Bjordal JM.; Johnson MI.; Iversen V.; Aimbeire F. *et. al.* (2006). Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed. Laser Surg.* 24(2):158–168.
27. Convissar RA. (2011). Principles and practice of laser in dentistry. Mosby, China.
28. Convissar RA. (2011). Principles and practice of laser in dentistry. Mosby, China.
29. Netea MG.; Suttmüller R.; Hermann C.; Vander Graaf CA. *et. al.* (2004). Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 3712–3718.
30. Abergel R.; Lyons R. and Castel J. (1987). Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and fibroblast cultures. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 13: 127-133.
31. Basford J. (1993). Laser therapy, scientific basis and clinical role. *Orthoped.* 16: 541-547.
32. Mortiz A.; Gutknecht N.; Doertbudak O.; Goharkhay K. *et. al.* (1997). Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. *J. Clin. Laser. Med. Surg.* 15 (1):33-37.
33. Karu TI.; Pyatibrat LV. and Kalendo GS. (2004). Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:211–216.
34. Mendeze T.; Pinheiro A.; Pacheco M. *et. al.* (2004). Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J. Clin. Laser. Med. Sug.* 22 (1): 19-25.
35. Mester A. (2013). Laser biostimulation. *Photomed. Laser Surg.* 31(6): 237–239.
36. Kuliev R. and Babaev R. (1991). Therapeutic action of laser irradiation and immunomodulators in purulent injuries of the soft tissues in diabetic patients. *Probl. Endokrinol. Mosk.* 37: 31-32.
37. Karu T. (1991). Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser irradiation. *Laser. Life Sci.* 2:53-74.
38. Lubart R.; Friedman H.; Faraggi A. *et. al.* (1999). Toward a mechanism of low energy phototherapy. *Laser Therap.* 3:11-13.
39. Passarella S.; Roncall L.; Cicero R. *et. al.* (1988). New ultrastructural conformations of mitochondria irradiated *in vitro* with He- Ne laser. *Laser Life. Sci.* 2: 161-165.
40. Khaleel AZ. (2010). Treatment of diseased mice with carcinoma by activation the immune cells by soft laser without drugs. *J. Al-Nahrain Univ.* 13(2):170-174.
41. Petrova M. (1992). The morpholofunctional characteristics of the healing of a skin wound in rats by exposure to low intensity laser radiation. *Morfol.* 102: 112-121.
42. Becker J. (1990). Biostimulation of wound healing in rats by combined soft and middle power lasers. *Biomed. Tech. Berlin.* 35: 98-101.
43. Kaskos HH. and Al-Hasan AH. (2011). Effect of low level laser therapy on intra oral wound healing. *Al-Rafidain Dent. J.* 11(1):105-112.
44. Pinheiro AJ.; Cavalcanti ET. Pinheiro TI. *et. al.* (1997). Low level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 15:181-183.
45. Latfullin I.; Kovyazina S. and Safiullina A. (1994). The immune status in patients with parodontal diseases under local irradiation by a He-Ne laser. *Proceedings of International Conference (urgent problems of laser medicine and operative endoscopy).* Moscow-Vidnoye. pp:439-441.
46. Scheutz F.; Matee MI.; Simon E. *et. al.* (1997). Association between carriage of oral yeasts, malnutrition and HIV-1 infection among Tanzanian children aged 18 months to 5 years. *Comm. Dent. Oral. Epidemiol.* 25: 193–198.
47. Mishra SK.; Segal E.; Gunter E. *et. al.* (1994). Stress, immunity and mycotic diseases. *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 379–406.
48. Fenoll A.; Sasidharan RK. and Krishnan S. (2014). Initiation and progression of gingivitis to periodontitis. *Oral. Hyg. Health.* 2 (3):135.

## The prevalence of pneumococci in patients with severe asthma: conventional and molecular diagnosis

Ayad S. Mahdi (1), Amer R. Alnajjar (1), Amina N. Thwani (2) and Abdul-Hameed A. Al-Qaseer (1)

(1) College of Medicine / Al- Mustansiriyah University / Baghdad (2) Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies / University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: ayadsma@yahoo.com

### ABSTRACT

Patients with severe asthma are more vulnerable to colonization with *S. pneumoniae* as they would be at higher risk of infection and exacerbation. The current study was carried out to demonstrate the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* in patients with severe asthma. Limited isolates of *S. pneumoniae* from sputum specimens were isolated, only from three patients (3%), while, no pneumococci were isolated from controls. Identification of this bacterium were done according to cellular morphology, culture characters and biochemical reaction.

Pneumococcal Genomic DNA was extracted and *lytA* gene region amplified by polymerase chain reaction ((PCR). *S. pneumoniae* was detected by conventional PCR as twice (6%) as that of culture method; as well the *lytA* gene was detected in sputum of 3% of healthy subjects.

The molecular methods reliability of pneumococcal detection from sputum samples remain to be a challenge but PCR negative results had a significant importance for excluding this organism.

**Keywords:** *S. pneumoniae*, *lytA* gene, severe asthma

### المخلص باللغة العربية

مرضى الربو القصبي الشديد أكثر عرضة للاستيطان والإصابة بالعقدية الرئوية مع تفاقم حالات الإصابة وتبعاتها. هدفت هذه الدراسة لمعرفة مدى انتشار العقدية الرئوية في مرضى الربو الحاد. تم الحصول على عدد محدود من عزلات العقدية الرئوية من ثلاث مرضى فقط (3%) ، بينما لم يتم الحصول على أي عزلة من مجموعة السيطرة. تم تشخيص هذه البكتيريا اعتمادا على مظهرها الخارجي وصفاتها الزرعية وتفاعلاتها الحياتية الكيميائية.

تم استخلاص الحمض النووي لبكتيريا العقدية الرئوية وتم مضاعفة جين (*lytA*) بطريقة اختبار تسلسل البلمرة التقليدي Conventional PCR ، حيث تم تشخيص هذه البكتيريا بشكل مضاعف (6%) عما تم الحصول عليه بطريقة العزل التقليدية ، كذلك تم تأكيد وجود هذا الجين (*lytA*) في ثلاثة من عناصر السيطرة الأصحاء.

يمكن استنتاج أن مصداقية تشخيص العقدية الرئوية بالطريقة الجزيئية عن طريق استخدام نماذج القشع تبقى غير حاسمة ولكن النتائج السلبية مهمة جدا في اسبعاد الإصابة بها.

## INTRODUCTION

Asthma is a common chronic inflammatory disease of the airways marked by recurrent attacks of dyspnea, reversible airflow obstruction, and bronchospasm. Globally, over 235 million people worldwide are affected by asthma, and approximately 250,000 people die every year from this disease. Severe Asthma affects about 10% of asthma patients who have frequent and severe symptoms despite maximal treatment, with anti-inflammatory drugs including steroids (1).

*Streptococcus pneumoniae* is normally resides asymptotically in the nasopharynx of 5-10 % of healthy adults, and 20-40% of healthy children however, in susceptible individuals, such as elderly and immunocompromised people and children, the bacterium may become pathogenic, spread to other locations and cause disease (2).

Patients with asthma are more likely to suffer from serious pneumococcal disease, which may be because the asthmatic airway is different and the lungs may be more vulnerable to pneumococcal infection. Use of corticosteroids, a common asthma treatment, may also increase risk (3). Many pathological alterations in the airways, these physical and functional abnormalities can be served as a focus for viral infections, which, in turn, trigger the asthmatic response; they may develop secondary bacterial infections, mainly by *S. pneumoniae* (4).

### The aims of study

- 1- To identify the prevalence of *S. pneumoniae* in patients with severe asthma.
- 2- To apply new, rapid and specific procedures using conventional PCR method in the diagnosis.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients and control groups

One hundred patients, 74 (74%) females and 26 (26%) males with severe asthma attending the respiratory clinic or admitted to Al- Yarmouk Teaching Hospital, Baghdad, with age range 16- 83 years (mean age 43 years) and 100 apparently healthy controls without asthma were eligible for inclusion in this study. The collection period was between July 2014 and March 2015.

### Patients selection:

**1- Inclusion criteria:** All patients aged 16 years or older with severe asthma without comorbidity.

**2- Exclusion criteria:** for those that had comorbid advance disease such as heart failure, renal disease, liver disease and pulmonary tuberculosis.

**3- Sputum Collection, processing and culture conditions:** Sputum samples were collected into sterile screw-capped containers deep coughing is necessary, to provide mucus expelled from the airways.

**4- Identification of *Streptococcus pneumoniae*:** conventional tests for identification of this organism were carried out including:

-Direct microscopic examination of Gram-stained sputum specimens (5)

-Sputum culture.

A loopful of each sputum was inoculated onto two blood agar plates and incubated aerobically and in a 5-10% CO<sub>2</sub> atmosphere at 35-37°C for 24- 48 hrs.; the plates which showed no growth should be reported as negative (6).

Other biochemical tests including optochin test and bile solubility test were done (7, 8). Rapid latex agglutination test (Bio-Rad) was used for utilizing rapid identification of *S. pneumoniae* was used according to manufactures instructions (9).

### Confirmatory test (API 20 Strep)

API 20 strep (bioMérieux) was inoculated and incubated according to the manufacturer's instructions (10).

### Identification of *S. pneumoniae* by PCR from sputum samples

**Isolation of genomic DNA:** Norgen biotek, (Cat# 46200, Canada) was used for isolation of *S. pneumoniae* DNA from sputum samples using Spin-Colum chromatography technique.

**PCR conditions:** The PCR reaction was carried out in 25 µl reaction containing 12.5 µl of green master mix 1 µl of 10 Pmol/ µl of each primer, 2 µl of DNA templates and the volume was completed to 25 µl using nuclease free water (11). Amplification in an automated thermal cycler (Bio Rad, USA) consisted of the following parameters: initial denaturation for 4 min at 95°C, followed by 35 cycles of (denaturation for 30 sec at 95°C, annealing for 30 sec at 57°C, and extension for 1 min at 72°C), and a final extension the samples were incubated for a further 10 min at 72°C and then stored at 4°C until analyzed.

**Primers selection for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA:** The oligonucleotide sequences of primers (Alpha- DNA- Canada) used in PCR for targeting *lytA* gene specific to *S. pneumoniae* was as follows:

Forward 5-ACG CAA TCT AGC AGA TGA AGC A-3  
Reverse 5-TCG TGC GTT TTA ATT CCA GCT-3  
The *lytA* produce 75 bp products (12) after amplification of specimens in PCR which was estimated by comparing with the size of the DNA bands in the DNA ladder 100-1500 bp.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification and isolation of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples

*Streptococcus pneumoniae* is Gram-positive lancetate diplococci, but also appeared as single cocci or in short chains of cocci. On a blood agar plate *S. pneumoniae* colonies appeared as small, gray and moist and produce a zone of alpha-hemolysis.

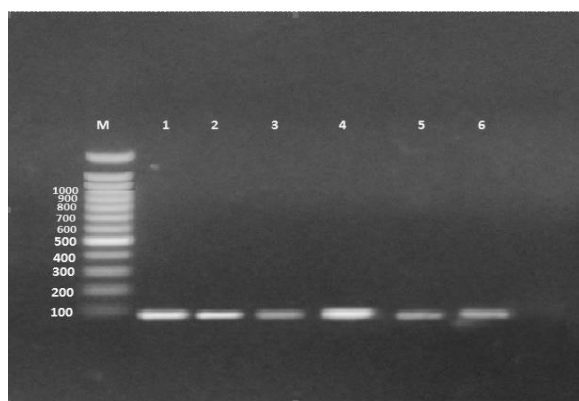
*Streptococcus pneumoniae* was isolated only from 3 patients, while no pneumococcal growths were isolated from all control sputum samples. The result

of this study clarified that asthma was uncommon risk factor for pneumococcal infection. Similar results were observed by Dhillon *et al.* (13), who concluded that the risk of pneumococcal infection among patients with asthma is limited. Thus, the low incidence of growth is probably explained by receiving of prior doses of antibiotics by some patients, which lowered the growth yield. However, the findings of the present study were in contrast with other studies (14, 15), which confirmed an association of pneumococcal infection and asthma as a significant predisposing factor for the development of pneumococcal infection and significantly linked to the duration and exacerbations.

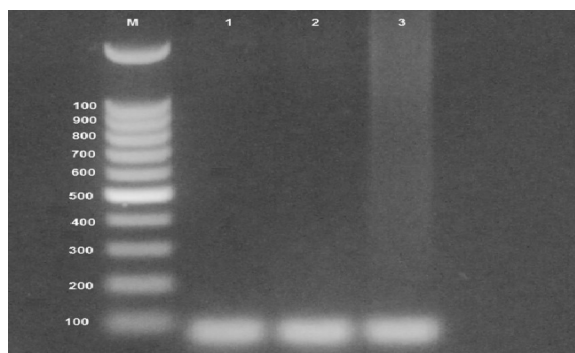
The differences in the results may be an outcome of different factors, including population races, age and using various laboratory tests (16).

#### Detection of *Streptococcus pneumoniae* by conventional PCR

Six patients (6%) were confirmed to have pneumococcal infection by molecular assay (figure 1), while three of controls (3%) showed positive results (figure 2). Conventional PCR was used to amplify of 75 bp fragment of the *lytA* gene. The presence of the 75-bp amplicon was verified by agarose gel electrophoresis.



**Figure (1):** Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified DNA fragments of *Lyt A* gene from *Streptococcus pneumoniae*. PCR amplification results. Lane (M) – 100 bp ladder, lane (1-6) positive *S. pneumoniae* inpatient's sputum samples



**Figure (2):** Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified DNA fragments of *Lyt A* gene from *Streptococcus pneumoniae*. PCR amplification results. Lane (M) – 100 bp ladder, lane(1-3) positive *S. pneumoniae* in control's sputum samples

The results obtained by the present study revealed low rate (3%) of positive culture, but by applying more sensitive molecular technique (PCR) resulted in higher positive rate (6%) of identification, which was doubled when compared with traditional culture method. Moreover three of controls (3%) showed positive results, a Possible explanations for the discordant results include the superior sensitivity of PCR compared to conventional tests or false-positive detection by PCR due to sputum contaminants.

Thus, it can be concluded that PCR assay added little to existing diagnostic tests for *S. pneumoniae* and this test is unable to distinguish colonization from infection when respiratory samples are tested, and interpretation of reliable diagnostic results for *S. pneumoniae* remains inconclusive (17), but *S. pneumoniae* PCR negative results in sputum had a significant importance and helpful method to rule out this organism.

#### REFERENCES

1. Harboe ZB.; Slotved HC.; Konradsen HB. and Kaltoft MS. (2012). A pneumococcal carriage study in Danish pre-school children before the introduction of pneumococcal conjugate vaccination. *Open Microbiol. J.* 6:40-44.
2. Simpson CR. and Sheikh A. (2010). Trends in the epidemiology of asthma in England: a national study of 333,294 patients. *J. Res. Soc. Med.* 103 (3): 98–106.
3. Talbot TR.; Hartert TV. and Michel E. (2005). Asthma as a risk for invasive pneumococcal disease. *N. Engl. J. Med.* 352:2082-2090.
4. Otero C.; Paz RD.; Galassi N.; Bezrodnik L.; Finiasz MR. and Fink S. (2013). Immune response to *Streptococcus pneumoniae* in asthma patients: comparison between stable situation and exacerbation. *Clin. Exp. Immunol.* 173(1):92-101.
5. Chapin K C.; Murray PR.; Baron E J.; Pfaller MA.; Tenover FC. and Yolkner RH. (1999). *Manual of clinical microbiology*. 7<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Finegold SM. and Martin WJ. (1982). *Bailey and Scotts. Diagnostic Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed. Toronto. London.
7. Murray PR.; Baron EJ.; Jorgensen JJ.; Pfaller MA. and Yolkner RH. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. ASM Press: Washington.
8. Jr WW.; Allen S; Procop G. and Schreckberger P. (2005). *Koneman's color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed.
9. Slotved HC.; Kaltoft M.; Skovsted IC., Kern MB. and Espersen F.(2004). Simple rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-latex). *J. Clin. Microbiol.* 42:2518-2522.
10. Colman G. and Ball LC. (1984). Identification of *Streptococci* in a medical laboratory. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 11-14.
11. Seki M.; Yamashita Y.; Torigoe H.; Tsuda H.; Sato S. and Maeno M. (2000). Loop-Mediated isothermal amplification method targeting the *lyt A* gene for detection of *S. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 43(4):1851-1856.

12. Wang Y.; Guo G.; Wang H.; Yang X. and Shao F.(2014). Comparative study of bacteriological culture and real-time fluorescence quantitative PCR(RT-PCR) and multiplex PCR based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridization assay in the diagnosis of bacterial neonatal meningitis. BMC Pediat.14:224-229.
13. Dhillon RK.; Yawn BP.; Yoo KH.; Boyce TG.; Jacobson RM.; McGree ME.; Weaver AL. and Juhn YJ. (2011). Impact of Asthma on the Severity of Serious Pneumococcal Disease. Sunnyvale. (3):101-106.
14. Boikos C. and Quach C. (2013). Risk of invasive pneumococcal disease in children and adults with asthma: a systematic review. Vaccine. 31(42):4820-4826.
15. Kwak BO.; Choung LT. and Park YM. (2015). The Association between Asthma and invasive pneumococcal disease. J. Korean. Med. Sci. 30: 60-65.
16. Klemets P.; Lyytikäinen O.; Ruutu P.; Ollgren J.; Kaijalainen T.; Leinonen M. and Nuorti JP. (2010). Risk of invasive pneumococcal infections among working age adults with asthma. Thorax. 65:698-702.
17. Murdoch DR.; Anderson TP.; Beynon KA.; Chua A.; Fleming AM.; Richard T R.; Laing RT.; Town GI.; Mills GD.; Chambers ST. and Jennings LC. (2003). Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. J. Clin. Microbiol. 41(1): 63–66.



## The role of oral glucose tolerance test in detection of hyperglycemia among non-diabetic patients with acute myocardial infarction

Mahir A. Jassim

Dept. of Physiology / College of Medicine / University of Anbar / Republic of Iraq

E-mail: drmahiraltalah@yahoo.com

### ABSTRACT

Previously undetected glucose abnormalities are common in patients with acute myocardial infarction (AMI). The aim of this study was to assess the prevalence of Diabetes mellitus (DM) and impaired glucose tolerance (IGT) in patients after a myocardial infarction without known DM, and to confirm the superiority of oral glucose tolerance test (OGTT) in comparison to fasting plasma glucose (FPG) and Glycosylated hemoglobin (HbA1c) as screening tools.

The sample composed of one hundred and twelve (112) patients who were admitted to the Coronary Care Unit (CCU) of Al-Ramadi Teaching Hospital with acute myocardial infarction and no previous history of diabetes mellitus. An oral glucose tolerance test (OGTT) with 75 gm of glucose was done at discharge. Fasting plasma glucose (FPG) and Glycosylated hemoglobin (HbA1c) were estimated at admission.

At discharge, 66 (58.9%), 31 (27.7%), and 15 (13.4%) were classified as having normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance (IGT), or type 2 diabetes, respectively. If fasting plasma glucose (FPG) was used alone, only six (5.3%) patients were considered diabetic and 8 (7.1%) patients with IFG were identified. While HbA1c identify only 2 (1.7%) patients with DM and only 4 (3.5%) patients with increased risk of DM. Thus, a FPG test alone identified only 30% of the patients with abnormal OGTT. Thus, a fasting glucose and HbA1c test failed to identify more than (70%), (87%) respectively of the patients with abnormal glucose tolerance in this study. The prevalence of DM and IGT in patients discharged from the CCU after a myocardial infarction without known DM diagnosis was high (41%).

In conclusion, Glucose abnormalities are common in patients with AMI. In comparison to OGTT, FPG or HbA1c alone failed to identify the majority of patients with IGT or T2DM screened for unknown glucose abnormalities in patients with MI. The oral glucose tolerance test should be considered as a routine test after a myocardial infarction in subjects without known DM.

**Keywords:** Hyperglycemia, Oral glucose tolerance test, Acute Myocardial Infarction

### الملخص باللغة العربية

تعد حالة ارتفاع مستوى الجلوكوز في الدم شائعة لدى المرضى الذين يعانون من احتشاء عضلة القلب الحاد، رغم أنهم غير مشخصين سابقاً بداء السكري.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم مدى انتشار مرض السكري وضعف تحمل الجلوكوز عن طريق الفم لدى المرضى المصابين باحتشاء عضلة القلب، وتأكيد تفوق اختبار تحمل الجلوكوز عن طريق الفم OGTT بالمقارنة مع بلازما الجلوكوز أثناء الصوم (FPG) والهيموغلوبين الجليكوزي (HbA1c).

أجريت هذه الدراسة في قسم إنعاش القلب بمستشفى الرمادي التعليمي خلال الفترة من شهر فبراير/ شباط 2013 إلى شهر يناير/ كانون الثاني 2014 ، وجرى جمع عينة الدراسة من المرضى المصابين باحتشاء عضلة القلب والذين ليس لديهم تاريخ مرضي سابق مع داء السكري. وتم شرح الهدف من الدراسة لهم وأخذ موافقتهم على المشاركة في الدراسة.

خضع جميع المرضى لفحص اختبار قابلية تحمل الجلوكوز عن طريق الفم بعد إعطائهم 75 غرام من محلول السكر أثناء الصيام ، وجرى تسجيل النتائج. كما تم أيضاً فحص نسبة السكر بالدم أثناء الصيام وقياس نسبة الهيموغلوبين الجليكوزيلاتي (HbA1c).

بينت نتائج الدراسة أن حدوث اضطراب جلوكوز الدم بعد الإصابة باحتشاء عضلة القلب هو أمر شائع، وأن أفضل طريقة لاختبار واكتشاف هذا الأمر هي إجراء فحص اختبار تحمل الجلوكوز عن طريق الفم، ويفضل عدم الاعتماد على نسبة فحص سكر الدم أثناء الصيام ولا على قياس نسبة الهيموغلوبين الجليكوزيلاتي (HbA1c).

وقد استنتجت الدراسة أن اختبار تحمل الجلوكوز عن طريق الفم يعتبر اختباراً روتينياً للمرضى المصابين باحتشاء عضلة القلب والغير مشخصين بارتفاع سكر الدم سابقاً.

## INTRODUCTION

Numerous studies have demonstrated that hyperglycemia is common among patients with acute myocardial infarction (1,2).

It is encountered in up to 50% of all ST elevation myocardial infarction (STEMI) patients, whereas previously diagnosed DM is present in only 20% to 25% of STEMI patients (3).

Hyperglycemia during AMI was thought to be "stress hyperglycemia", which develops due to a highly complex interplay between hormones (such as catecholamine, growth hormones, and cortisol) and cytokines, ultimately leading to excessive hepatic glucose production and insulin resistance (4). Stress hyperglycemia is a medical term referring to transient elevation of blood glucose in hospitalized patients due to the stress of illness without evidence of previous diabetes (fasting glucose  $>140$  mg/dL ( $>7.8$  mmol/L), or random glucose  $>200$  mg/dL ( $>11.1$  mmol/L)) (5). These patients are of particular interest to clinicians because they are reported to have a worse prognosis than those with diabetes despite higher blood glucose levels on admission in the latter population (6-10).

It has also been identified as a major independent predictor of both in-hospital congestive heart failure and mortality in STEMI (11).

Thus, patients with acute coronary syndrome present an opportunity for targeted screening for diabetes and institution of effective management strategies aimed to improve cardiovascular outcome. The routine performance of an oral glucose tolerance test to diagnose diabetes during the acute phase MI is still the subject of ongoing debate.

European guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases recommend the performance of an oral glucose tolerance test in patients with established cardiovascular disease (12). Furthermore, a study conducted by (13) had described the guidelines on management of acute myocardial infarction in patients presented with persistent ST-segment elevation and specified that an OGTT should be performed before or shortly after hospital discharge. Another recent guideline issued by the American Diabetes Association (ADA) and the World Health Organization (WHO) recommended the use of HbA1c as an alternative (14, 15).

The aim of the present study was to assess the prevalence of DM and IGT in patients after a myocardial infarction without known DM and to compare FPG and HbA1c with OGTT as screening tools for glucose abnormalities in those patients.

## PATIENTS AND METHODS

This study encompassed 126 patients who were admitted to the Coronary Care Unit (CCU) at Al-Ramadi Teaching Hospital during the period from February -2013 to January 2014 for signs and

symptoms of first time acute myocardial infarction (AMI) without previous history of diabetes mellitus. The diagnosis of AMI was based on the WHO MI diagnosis criteria (16). The criteria as revised in 2000, are a cardiac troponin rise accompanied by either typical symptoms, pathological Q waves, ST elevation or depression or coronary intervention are diagnostic of MI). Of those 126 patients only 14 patients met the exclusion criteria that were: septicemia, endocrine disorders, comorbid conditions, and on drugs affecting blood glucose levels such as Beta blockers, thiazides and glucocorticoids.

The details of our study patients' age, sex, height, weight, (BMI), smoking, hypertension and other associated clinical features are shown in the result section along with the data related to the family history of diabetes.

Random and fasting blood glucose were measured on admission, blood samples were sent as well for HbA1c (Nycocard™ HbA1c), total cholesterol (TC), high density lipoproteins (HDL) and triglycerides (TG) (Reflotron Plus, Switzerland).

A standardized oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at hospital discharge for the all patients who met our inclusion criteria. OGTT was performed according to WHO protocol (9). Briefly, after an overnight fast of approximately 12 hours and the patient then was given 75 gram of glucose in 200 ml water and glucose was measured at base line then every half an hour for two hours. All patients were briefed about the research protocol and a written consent of participation was taken thereafter, ethical approval was obtained from the college medical ethics committee.

Classification of T2DM and IGT (FPG  $\geq 7.0$  and/or post load glucose  $\geq 11.0$  mmol/L, and FPG  $<7.0$  and post load glucose  $7.8-11.0$  mmol/L, respectively) followed WHO recommendations (14), while the diagnostic boundaries for impaired fasting glucose (IFG; FPG  $\geq 5.6$  mmol/L) were those given by ADA (15).

The diagnoses of T2DM and increased risk for diabetes by HbA1c (HbA1c  $\geq 6.5\%$  and  $5.7-6.4\%$  respectively) were according to ADA and WHO (14,15).

## Statistical analysis

Analysis of data was carried out using statistical package for social sciences (SPSS) version 21.0. Frequencies and relative frequencies were calculated for each predictor, standard statistical tests (such as chi-square, Fisher's Exact test and t-test) were used when appropriate. All P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

The mean age of the study patients were (58.9±10.0). The majority of the patients were males. There was nearly equal number with history of hypertension (Hx.HT) and without it, while history of smoking was identified in exactly equal number of patients to those who do not have it. As modifiable risk factors, increased cholesterol (chol) and triglyceride (TG) were seen more commonly than normolipidemia. In contrast, less patients had high Body Mass Index (BMI) >30. The study population consisted of nearly equal number of patient with and without family history of DM (FHDM) (table 1).

**Table (1): The baseline characteristics of the study group**

Clinicopathological variables	No. & % patients
Age	(x ±sd)
	<55
	55+
Gender	Male
	Female
Hx.HT	+ve
	-ve
Smoking	+ve
	-ve
FHDM	+ve
	-ve
BMI(kg/m2)	<30
	> 30+
S.Chol.	<200mg/dl
	>200 mg/dl
S.Tg.	<170mg/dl
	> 170 mg/dl

The standard oral glucose tolerance test was done for all patients on the day of discharge along with FPG and HbA1C as described earlier.

The 2-hrs OGTT identified diabetes in 15 patients (13.4%), IGT in 31 patients (27.9%), and normal glucose tolerance in 66 patients (58.9%) (table 2).

When the fasting glucose criteria were applied, however, only 6 (5.3%) patients were diagnosed as having diabetes, 8 (7.1%) with IFG and normal fasting glucose in 98 (87.5%) patients.

HbA1C identified diabetes in 2 (1.7%) patients (HbA1c >6.5%), 4 (3.5%) patients with increased risk for diabetes (HbA1c 5.7–6.4%) and 106 (94.6%) patients were normal HbA1c.

Giving that oral glucose tolerance test is the gold standard, the HbA1C and FPG showed sensitivity of 10.9% and 21.7% respectively while they demonstrated a specificity of 98.5% and 93.9% sequentially.

**Table (2): Prevalence of glucose abnormalities among study population using different methods**

Test	DM (n,%)	IGT, IFG, increased risk for DM by HbA1C(n,%)	NGT, NFG, Normal HbA1C(n,%)	Sensitivity	Specificity
OGTT (2-h PG)	15 (13.4%)	31 (27.7%)	66 (58.9%)	100%	100%
FPS	6 (5.3%)	8 (7.1%)	98 (87.5%)	21.7%	93.9%
HbA1C	2 (1.7%)	4 (3.5%)	106 (94.6%)	10.9%	98.5%

An attempt was done to identify the risk factor that are associated with development of glucose abnormalities as shown in table (3). In this study, among acute MI patients, more men were recognized than women (59%), but no significant differences were observed regarding the incidence of DM or IGT.

Being old (> 55 years) was strongly associated with development of DM and IFG (p =0.008), in the same way, history of smoking was also correlated with glucose abnormalities (p =0.007). Additionally Positive family history of diabetes mellitus (FHDM) (p=0.0001), BMI greater than 30kg/m2 (p =0.001) and hyperlipidemia were powerful predictors of disturbances in glucose metabolism.

Statistical analysis showed no significant influence for hypertension on the risk of glucose abnormalities.

**Table (3): Variables as independent predictors of disturbances in glucose metabolism at 120 min of OGTT immediately before discharge**

Predictors		NGT N= 66	IGT N= 31	DM N= 15	P value
Age	(x ±sd)	58.9±10.0	61.5±7.4	68.9±5.2	0.008*
	<55	42 (63.6)	12 (38.7)	4 (26.6)	
	55+	24 (36.4)	19 (61.3)	11 (73.3)	
Gender	Male	39 (59.1)	19 (61.3)	8 (53.4)	0.87
	Female	27 (40.9)	12 (38.7)	7 (46.6)	
Hx.HT	+ve	30 (45.5)	16 (51.6)	8 (53.4)	0.78
	-ve	36 (54.5)	15 (48.4)	7 (46.6)	
Smoking	+ve	25 (37.9)	22 (72.4)	9 (60.0)	0.007*
	-ve	41 (62.1)	9 (27.6%)	6 (40.0)	
FHDM	+ve	22 (33.3)	23 (72.4)	10 (66.7)	0.0001*
	-ve	44 (66.7)	8 (27.6)	5 (33.3)	
BMI(kg/m2)	<30	56 (84.8)	3 (9.7)	4 (26.7)	0.001*
	> 30+	10 (15.2)	28 (90.3)	11 (73.3)	
S.Chol.	<200mg/dl	47 (71.2)	11 (35.5)	5 (33.3)	0.001*
	>200 mg/dl	19 (28.8)	20 (64.5)	10 (66.7)	
S.Tg.	<170mg/dl	37 (56.1)	12 (38.7)	2 (13.3)	0.007*
	> 170 mg/dl	29 (43.9)	19 (61.3)	13 (86.7)	

## DISCUSSION

There was an increasing recognition of the significant relationship between diabetes and cardiovascular disease, and the contribution that each of these conditions makes to the risk of morbidity and mortality from both diseases (17, 18). Although the prevalence of diabetes has continued to rise, diabetes remains undiagnosed in many patients. In recent years several studies have reported an increased prevalence of prior undiagnosed abnormal glucose tolerance (i.e. impaired glucose tolerance (IGT) and diabetes) in patients with AMI (1, 19-21).

Many studies reported that admission hyperglycemia has a significant negative impact on the morbidity and mortality of patients presenting with an acute myocardial infarction (AMI) even in non-diabetic patients (22). Thus, patients with acute coronary syndrome could have an opportunity for targeted screening for diabetes and institution of effective management strategies aimed to improve cardiovascular outcomes.

It remains unresolved whether an OGTT is mandatory after an acute MI or whether admission and fasting glucose or HbA1c could effectively identify patients with diabetes IGT.

The European guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases recommend the performance of an OGTT in patients with established cardiovascular disease (12). Furthermore, the European guidelines on the management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation specify that an OGTT should be performed before or shortly after hospital discharge (23). With regards to the management of hyperglycemia in ACS, the NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) does not recommend the routine use of the OGTT in patients with hyperglycemia after ACS without known diabetes if hemoglobin A1c and fasting blood glucose levels are within the normal range (24).

A scientific statement from the American Heart Association Diabetes Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism does not encourage routine use of the OGTT for screening during the hospital stay (25).

The Joint British Societies' (2005) clinical guidelines on prevention of cardiovascular disease recommended that a fasting glucose measurement can be done as an alternative to an OGTT in patients who have had an acute cardiovascular event (26).

In the new diagnostic criteria of DM, HbA1c has a central role because it is convenient, that the patient does not need to be in a fasting state for measurement. However, there is no perfect concordance between HbA1c and glucose based tests and HbA1c may not detect other forms of dysglycaemia detected by OGTT (27).

In conclusion, newly-diagnosed hyperglycemia is obviously common metabolic problem among patients with acute MI in Al-Anbar province, a problem that should be taken into consideration in

every critically ill patient particularly patients with acute coronary syndromes in whom early detection and good management of such metabolic derangement may decrease the incidence of complications and improve the outcomes of patients with such acute cardiac events.

The prevalence of disturbances in glucose metabolism in acute myocardial infarction in this study was 41% which is comparable to other published data. The Euro. Heart Survey (1) reported the combined incidence of new-onset IGT and DM to be 58%, while in The China Heart Survey was 45% (2).

In this study pre-discharge OGTT was a more sensitive method for detecting undiagnosed diabetes and impaired glucose metabolism than FPG and HbA1c. These results confirm the important role of an OGTT in detecting previously undiagnosed diabetes. A FBG test and HbA1c are insufficient for the screening and diagnosis of dysglycemia in patients with acute MI.

There may be several reasons for the limited sensitivity of HbA1c to detect undiagnosed diabetes. As HbA1c correlates with the mean blood glucose over the previous 8-12 weeks, it requires regularly elevated glucose levels to increase. As a consequence, HbA1c levels rise above the diagnostic threshold at a later stage than direct glucose level measurement with an OGTT.

Routine use of OGTT in the recovery phase helps to dichotomize the large number of patients with mild hyperglycaemia at the time of admission into those with and without dysglycemia. Our finding goes in line with an Indian study which identifies that OGTT testing in these patients with indeterminate FBG reclassifies approximately one-third as having definite dysglycemia (28).

In conclusion, results of this study clarify the fact that dysglycemia occurs frequently in patients with acute MI and previously undiagnosed diabetes mellitus. FPG and HbA1c leaves a majority of patients with IGT or T2DM undetected compared with an OGTT. As the OGTT is a straightforward, non-invasive and affordable test that can be performed during clinical recovery, we would advocate that it should become standard care in all patients admitted with acute MI, at least in those with old age, positive family history of DM and BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. This will result in early recognition of diabetes and pre-diabetes and, subsequently, earlier lifestyle and medical interventions.

## Study limitations

1-The number of patients included is relatively small and selected from patients who participated in a single-centre randomized clinical trial; the true prevalence of undiagnosed diabetes should be confirmed in a larger cohort of patients from multiple hospitals.

2- The researcher cannot exclude the possibility that reduction in daily calorie intake or decrease in daily carbohydrate consumption within the first days of myocardial infarction might produce false negative results in OGTT tests performed in this period.

### Acknowledgment

*The researcher would like to thank the staff members of the Coronary Care Unit and Biochemistry Department of the Central Laboratory in Al-Ramadi Teaching Hospital for their help.*

### REFERENCES

1. Bartnik M.; Rydén L.; Ferrari R.; Malmberg K.; Pyörälä K.; Simoons M.; Standl E.; Soler-Soler J. and Ohrvik J. (2004). Euro heart survey investigators: the prevalence of abnormal glucose regulation in patients with coronary artery disease across europe. The euro heart survey on diabetes and the heart. *Eur. Heart J.* 25:1880–1890.
2. Hu DY.; Pan CY. and Yu JM. (2006). The relationship between coronary artery disease and abnormal glucose regulation in china: The china heart survey. *Eur. Heart. J.* 27:2573–2579.
3. Wahab NN.; Cowden EA.; Pearce NJ.; Gardner MJ.; Merry H. and Cox JL. (2002). Is blood glucose an independent predictor of mortality in acute myocardial infarction in the thrombolytic era? *J. Am. Coll. Cardiol.* 40:1748–1754.
4. Dungan KM.; Braithwaite SS. and Preiser JC. (2009). Stress hyperglycaemia. *Lancet.* 373:1798–1807.
5. Moghissi ES.; Korytkowski MT.; DiNardo M. *et. al.* (2009). American Association of Clinical Endocrinologists and American Diabetes Association consensus statement on inpatient glycemic control. *Diabet. Care.* 32:1119-1131.
6. Kosiborod M.; Rathore SS.; Inzucchi SE. *et. al.* (2005). Admission glucose and mortality in elderly patients hospitalized with acute myocardial infarction: implications for patients with and without recognized diabetes. *Circulation.* 111: 3078–3086.
7. Ishihara M.; Kojima S.; Sakamoto T. *et. al.* (2005). Acute hyperglycemia is associated with adverse outcome after acute myocardial infarction in the coronary intervention era. *Am. Heart. J.* 150: 814–820.
8. Gasior M.; Pres D.; Stasik-Pres G. *et. al.* (2008). Effect of blood glucose levels on prognosis in acute myocardial infarction in patients with and without diabetes, undergoing percutaneous coronary intervention. *Cardiol. J.* 15: 422–430.
9. Ishihara M.; Kojima S.; Sakamoto T. *et. al.* (2009). Comparison of blood glucose values on admission for acute myocardial infarction in patients with versus without diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 104: 769–774.
10. Capes SE.; Hunt D.; Malmberg K. and Gerstein H. (2000). Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet.* 355:773–778.
11. Oudot A.; Rioufol G.; Makki H.; Farnier M.; Rochette L. and Verges CY. (2005). Prevalence and impact of metabolic syndrome on hospital outcomes in acute myocardial infarction. *Arch. Intern. Med.* 165:1192–1198.
12. Rydén L.; Standl E.; Bartnik M.; Vanden BG.; Betteridge J.; de Boer MJ. *et. al.* (2007). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The task force on diabetes and cardiovascular diseases of the European society of cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur. Heart. J.* 28(1):88-136.
13. Van de Werf F.; Bax J.; Betriu A.; Blomstrom-Lundqvist C.; Crea F.; Falk V.; Filippatos G.; Fox K. *et. al.* (2008). ESC Committee for Practice Guidelines (CPG): Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. *Eur. Heart. J.* 29 (23):2909-2945.
14. World Health Organization. (2011). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Abbreviated report of a WHO consultation. Geneva.
15. American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabet. Care.* 33: Suppl. 1:S62–S69.
16. Alpert JS.; Thygesen K.; Antman E. and Bassand JP. (2000). Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36 (3): 959–969.
17. Gholap N.; Mehta R.; Ng L.; Davies M.; Khunti K. and Squire I. (2012). Is admission blood glucose concentration a more powerful predictor of mortality after myocardial infarction than diabetes diagnosis? A retrospective cohort Study. *BMJ. Open.* 2: e001596.
18. Ryden L.; Grant PJ.; Ander SD.; Berne C.; Cosentino F.; Danchin N.; Deaton C. *et. al.* (2013). ESC Guidelines on Diabetes, Pre-Diabetes, and Cardiovascular Diseases Developed in Collaboration with the EASD: The Task Force on Diabetes, Pre-Diabetes, and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and Developed in Collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Euro. Heart. J.* 34 3035-3087.
19. Norhammar A.; Tenerz A.; Nilsson G.; Hamsten A.; Efendic S.; Rydén L. and Malmberg K. (2002). Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. *Lancet.* 359:2140–2144.

20. Hashimoto K.; Ikewaki K.; Yagi H.; Nagasawa H.; Imamoto S.; Shibata T. and Mochizuki S. (2005). Glucose intolerance is common in Japanese patients with ACS who were not previously diagnosed with diabetes. *Diabet. Care.* 28:1182–1186.
21. Ramachandran A.; Chamukuttan S.; Immaneni S.; Shanmugam RM.; Vishnu N.; Viswanathan V. and Jaakko T. (2005). High incidence of glucose intolerance in Asian-Indian subjects with acute coronary syndrome. *Diabet. Care.* 28:2492–2496.
22. Norhammar A.; Ryde'n L. and Malmberg K. (1999). Admission plasma glucose independent risk factor for long-term prognosis after myocardial infarction even in nondiabetic patient. *Diabet. Care.* 22:1827–1831.
23. Van de Werf F.; Bax J.; Betriu A.; Blomstrom-Lundqvist C.; Crea F.; Falk V.; Filippatos G.; Fox K. et. al. (2008). ESC Committee for Practice Guidelines (CPG): Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Euro. Heart. J.* 29:2909–2945.
24. Senthinathan A.; Kelly V.; Dzingina M.; Jones D.; Baker M. and Longson D. (2011). Hyperglycaemia in acute coronary syndromes: summary of NICE guidance. *BMJ.* 343:d6646.
25. Deedwania P.; Kosiborod M.; Barrett E.; Ceriello A.; Isley W.; Mazzone T. and Raskin P. (2008). Hyperglycemia and acute coronary syndrome: a scientific statement from the American heart association diabetes committee of the council on nutrition, physical activity, and metabolism. *Circulation.* 117:1610–1619.
26. JBS. (2005). Joint British Societies' guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. *Heart* 91(Suppl. 5):v1–v52.
27. American Diabetes Association (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabet. Care.* 36 (Suppl 1): S67-S74.
28. Ajith D.; Norman Quek.; Irene SL. and Andrew K. (2013). Importance of investigating mild hyperglycaemia using oral glucose tolerance test in the setting of acute coronary syndrome: prospective investigational study. *J. Res. Diabet.* 11(9): 517-520.

## The effect of color light and stocking density on tibial measurements and levels of calcium and phosphorus in bone and serum of broilers and layers chickens

Mudhar A. S. Abu Tabeekh (1) and Rabia J. Abbas (2)

(1) Basrah Vaternary Hospital (2) Dept. of Animal Resources / College of Agriculture / University of Basrah / Republic of Iraq

E-mail: mudhar\_64@yahoo.com

### ABSTRACT

A total of 675 Ross 308 one day old broiler chicks were used in this study and exposed to white light (WL) as a control, red light (RL), blue light (BL), green light (GL), and Blue – Green mix light (BGL) by a light-emitting diode system (LED) which applied for 24 hours daily in separated rooms with light intensity 5 watt/m<sup>2</sup>. The birds were randomly housed into 9 wooden sealed pens of 1m<sup>2</sup> in three replicates for each density 12, 15 and 18 broilers/m<sup>2</sup>. In the second experiment, a total of 180 Isa Brown layers were raised under control condition from 25 week until 36 week of age. They divided into 5 treatments with an average of 36 birds for each of five color light rooms (16 hours light- 8 hours dark) in three replicates for each density 5 and 7 birds/m<sup>2</sup> in the room. The present study indicated no differences on levels of calcium (Ca) and phosphorus (P) in the tibia bone of broilers but a significant increase was recorded in the bone length (cm) under BL and bone weight (gm) and density (gm/cm) under BGL. The effect of color light on the concentration of serum calcium in broilers was not significant, but phosphorus concentration was higher in BGL. For layers, a significant effect of WL in the level of serum calcium and phosphorus was recorded, whereas no effects for stocking density on these traits were observed.

**Keywords:** color light, stocking density, calcium, phosphorus, tibia, broilers, laying hens

### الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة في حقل تربية الدواجن في كلية الطب البيطري بجامعة البصرة. في التجربة الأولى على فروج اللحم وفي التجربة الثانية على الدجاج البياض بهدف معرفة تأثير لون الضوء وكثافة الطيور في بعض معايير عظم القصبة وتركيز الكالسيوم والفسفور في العظام وفي مصل الدم. في التجربة الأولى تمت تربية (675) فرخا من فروج اللحم سلالة Ross 308 غير مجنس وبعمر يوم واحد لمدة (35) يوما. قسمت الأفراخ إلى خمس معاملات من الإضاءة الملونة المستمرة وبشدة إضاءة 5 واط/م<sup>2</sup> هي الضوء الأبيض (سيطرة)، الضوء الأحمر، الضوء الأزرق، الضوء الأخضر ومزيج من الضوء الأزرق والأخضر وبواقع (135) طائرا لكل معاملة. ربيت الطيور في غرف مستقلة تحتوي كل غرفة على (9) أقنان، مساحة القن الواحد متر مربع، وقسمت الطيور تبعا لكثافة التربية إلى (12، 15 و 18) طيرا/م<sup>2</sup> وفي ثلاث مكررات لكل كثافة. في التجربة الثانية تم تربية (180) دجاجة بياضة سلالة Isa Brown بعمر (25) أسبوعا لغاية عمر (36) أسبوعا، حيث تم توزيع الطيور إلى خمس معاملات حسب لون الإضاءة في برنامج (16 ساعة ضوء : 8 ساعة ظلام) وشدة إضاءة 5 واط/م<sup>2</sup> وبمعدل (36) طائر للمعاملة. تمت تربية الدجاج البياض تحت كثافتين (5 و 7) طيور/م<sup>2</sup> وبواقع ثلاث مكررات لكل كثافة.

أظهرت نتائج الدراسة في فروج اللحم عدم وجود تفوق معنوي للون الضوء المستخدم وكثافة الطيور في مستوى الكالسيوم والفسفور في عظم القصبة، بينما تم تسجيل تفوق معنوي لطول العظم في معاملة الضوء الأزرق وتفوق معاملة المزج بين الضوء الأزرق والأخضر في وزن وكثافة عظم. أما تركيز الكالسيوم في مصل فروج اللحم فلم تكن النتائج معنوية، بينما سجلت معاملة الفروج المرببة تحت تأثير مزج الضوء الأزرق والأخضر تفوقا معنويا في مستوى الفسفور في مصل الدم. من ناحية أخرى أظهرت النتائج في الدجاج البياض تفوقا معنويا في تركيز الكالسيوم والفسفور في مصل الدجاج المرببة تحت تأثير الضوء الأبيض ولم يكن لكثافة الطيور تأثير معنوي.

## INTRODUCTION

Light is as an important management tool to regulate broiler production. Artificial lighting for broilers consists of 3 aspects: photoperiod, wavelength, and light intensity (1). Day light has relatively wavelengths between 400 and 700 nanometer (nm). Birds sense light through their eyes (retinal photoreceptors) and through photosensitive cells in the brain (extra-retinal photoreceptors) (2). The color of light is determined by the relative power of different wavelengths in the visible part of the light spectrum (3). Among new lighting technologies emerging on the market are light emitting diodes. LEDs are highly monochromatic, only emitting a single pure color in a narrow frequency range (4), and becoming increasingly more popular for use in poultry barns (5). Stocking density is inherently confounded with either the number of animals in a group, or with the total amount of space available to this group (6). Application of the intermittent light regime and lower stocking density at the same time increased the broiler gains in every week (7).

Light is as an important management tool to regulate broiler production. Artificial lighting for broilers consists of 3 aspects: photoperiod, wavelength, and light intensity (1). Day light has relatively wavelengths between 400 and 700 nanometer (nm). Birds sense light through their eyes (retinal photoreceptors) and through photosensitive cells in the brain (extra-retinal photoreceptors) (2). The color of light is determined by the relative power of different wavelengths in the visible part of the light spectrum (3). Among new lighting technologies emerging on the market are light emitting diodes. LEDs are highly monochromatic, only emitting a single pure color in a narrow frequency range (4), and becoming increasingly more popular for use in poultry barns (5). Stocking density is inherently confounded with either the number of animals in a group, or with the total amount of space available to this group (6). Application of the intermittent light regime and lower stocking density at the same time increased the broiler gains in every week (7).

Normal bone development in birds is influenced by nutritional factors, genetics, gender and the absolute growth rate (8). A number of invasive (bone ash, breaking strength, weight and bone volume) and noninvasive methods (ultrasound) exist to determine the bone mineralization in poultry (9). About 99% of total body Ca and 75% (80-85% in bones and teeth) of total body P are found in the skeleton (10), therefore the Calcium: Phosphorus ratio (Ca/P ratio) of 2.5:1 may favor elongation of tibial bone (11). According to (7), quality of tibia improved with increased physical activity of chickens reared in lower stocking density. Also (12) investigated whether photoperiod : scotoperiod affected leg weakness in broiler chickens and found no clear relationship between photoperiod and gait scoring but foot pad burns were reduced by longer

photoperiod. The levels of Ca in both bones femur and tibiotarsus were in the range from  $180.4 \pm 8.57$  to  $181.6 \pm 12.32$  g/kg, being higher in females ( $181.7 \pm 9.17$  to  $183.8 \pm 14.71$  g/kg), as compared to males ( $179.2 \pm 7.80$  to  $179.3 \pm 8.91$  g/kg) (13). Tibia length in broilers was 1.8 times greater at 15 days of age compared to hatch and only 2 times longer at 43 days of age compared to the length at 15 days of age (14). The researcher (15) referred that lighting programs had a similar effect, broilers provided with 12L: 12D had a higher percentage of bone Ash (50.47%) compared with those provided with 20L: 4D (49.89%). Furthermore, (16) observed improved gait scores and less angular deformity of the legs of female broilers that were reared under high intensity red light early in the growth period, although the same effect was not seen in broilers raised under high intensity blue light. The author speculated that this improvement in leg health may have been due to the increased activity of the broilers reared with high intensity red light. Bone strength was reduced in treatment Late Red, which appeared to be related to the lower body weights of birds in this treatment. Bone length, weight, and torsion were not affected by treatment, but the tibia plateau angle was reduced by Early Red light in female birds. All blue, there was a high incidence of gait abnormalities, which was reduced by Early and Late Red light. Serum biochemistry is a labile biochemical system which can reflect the condition of the organism and the changes happening to it under influence of internal and external factors (17). The total concentration of calcium in the laying hens serum ranges between 20-30 mg/100 ml. The normal plasma concentration of calcium for most birds ranges between 8 and 11 mg/dl while the normal plasma phosphorus concentration for most birds range between 5 and 7 mg/dl. (18). Serum Ca include 60 % ionized, 35% bound to protein and 5% citrate, bicarbonate and phosphate complexes. In plasma, 85% phosphate ions ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{--}$ ), 10% protein bound and 5% Ca and Mg complexes (10). On the other side (19) recorded that the levels of serum calcium in laying hens was ( $18.10 \pm 2.64$  mg/dl) and in broilers ( $6.25$ - $13.75$  mg/dl).

The aim of this study was to investigate the effect of color light and stocking density on some bone parameters and the level of serum calcium and phosphorus of broilers and layers.

## MATERIALS AND METHODS

### Birds and husbandry

A total of 675 Ross 308 one-day-old broiler chicks were used in this study. The chicks were raised under control condition from day one until 35 days of age in the poultry farm at the College of Veterinary Medicine, Basra University. Broiler chicks were reared into five light groups in separated rooms 3x3x 4 meters with an average of



135 chicks in each room under LED color lights: white light as a control, red light (660 nm), blue light (480 nm), green light (560 nm) and blue – green mix light. Stocking density of (12, 15 and 18 birds/m<sup>2</sup>) was housed into 9 wooden sealed pens of 1m<sup>2</sup> in three replicates in the room. Light sources were equalized on the intensity of 5 watt/ m<sup>2</sup> (20 lux) at bird head level and light period of 24 hours daily. Room temperature was initially 34°C and was subsequently reduced by 2°C/week to 26°C at 35 day. In the second experiment, a total of 180 Isa Brown layers were raised under control condition from 25 week until 36 week of age. They divided into 5 treatments with an average of 36 birds for each of five color light rooms (16 hours light- 8 hours dark) in three replicates for each density 5 and 7 birds/m<sup>2</sup> in the room. In broilers, three dietary pellet rations were used consisted of starter, grower, and finisher diets. Total dietary metabolic energy for the starter, grower and finisher were 2925, 3111 and 3171 kcal/kg respectively while the values of crude protein were 22.21, 20.14 and 18.08 % respectively. For layers, total dietary metabolic energy was 2759 kcal/kg and 17.75% crude protein according to Isa Brown programs (20). Half cylinder plastic feeders were placed in each pen. The birds were supplied with feed and water *ad libitum*, and diets were formulated to meet the nutrient recommendations for poultry according to Nutrient Research Center NRC (21), and the feeders were checked twice daily and feed was weighed and manually added when needed. A nipple water drinking system was set up in each pen and was manually adjusted as birds grew to ensure the watering system was kept at a proper level.

#### Bone and serum measurements

At 35<sup>th</sup> day of broilers age, one bird from each replicate were randomly selected and slaughtered according to Islamic religion conditions by a knife. The tibias of the individual birds were excised and boiled for 5 minutes to loosen muscle tissue according to the method of (22). Tibias were dried at 105°C for 24 hours and then weighed and the length was recorded. The bone weight/bone length index is a simple index of bone density obtained by dividing bone weight by its length (23). Tibia ash content was determined by ashing the bone in a muffle furnace for 5 hours at 600°C, bone ash was weighed and prepared according to (24). Calcium and phosphorus content was measured by atomic absorption spectrophotometry after processing by the method of (25). At the end of 5 week age for broilers and 36 week for layers, 1 birds of average weight from each replicate were selected and blood was collected from the wing vein. The samples were taken in test tubes without anticoagulant to get serum for biochemical tests. Calcium and phosphorus values were measured by the method of (26).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Bone measurements of broilers

Bone mineral density is one of the most important parameters to be measured when evaluating bone quality (27). Calcium, phosphorus, and vitamin D<sup>3</sup> deficiencies and imbalances are the major causes of skeletal problems (28). Table (1) referred to the effect of light color and stocking density in the measurements of tibia bone in broilers at different experimental groups at 35 days. The values of calcium and phosphorus were not significantly differed ( $p > 0.05$ ) in all examined birds. The non-significant effect of color light on the levels of calcium and phosphorus of tibia bone agreed with (15), who showed that the use of different lighting programs did not have a significant effect on the levels of the ashes of bone. The table also showed no significant effect ( $p > 0.05$ ) of stocking density in the level of calcium and phosphorus of tibia bone. The results of the effect of stocking density is consistent with (29), who tested two strains of broiler chickens (Arbor Acres and Cobb 500) in the level of density 12 and 16 birds/m<sup>2</sup> in different lighting and he did not score a significant effect of lighting program and the stocking density in the concentration of calcium of tibia. The physical properties of the tibia were assumed to be indicators of skeletal growth and structural changes (30). There was significant increase ( $P < 0.05$ ) in the length of tibia bone in broilers reared under the influence of BL. The increase of tibia length may reflect the high body weight of broilers under the influence of BL. The result is agreed with the finding of (31) who referred to a positive relationship between the length of the leg and thigh and carcass weight bone. The tendency for higher growth rates of chickens in blue light than red maybe due to the increase in activity of birds in red than blue light confirms the results of a comparison of color effects on broiler behavior by (32). As shown in table (1), a significant effect ( $P < 0.05$ ) of color light was recorded in the weight of tibia in broilers of different experimental groups at the age of 35 days, and reached its highest rate in the treatment of chickens reared under the influence of BGL while lower rate was recorded in the treatment of broilers reared under the influence of RL. The results of the present study agreed with the results of (33) and (34) who proved that the hypothalamic photoreceptors of chicken are more sensitive to blue/green light when illuminated directly. Also, (35) found both blue and green lights were more effective to stimulate testosterone secretion and myofiber growth which increased body. On the other hand, (36) reported that longitudinal bone growth occurs as the pullet grows in size. Cartilage cells in the growth plates at the ends of the bones divide, resulting in increased bone length. The existence of a significant decrease in tibia weight under the influence of red light are consistent with that of (16), who reported an apparent correlation existed between bone strength,

bone weight, and body weight: birds given bright red light in treatment Late Red had the lightest final body weight and tended to have the lightest average bone weight. The effect of color light in the bone density of broilers at 35 days of age was significantly higher ( $P < 0.05$ ) and recorded the highest rate in the bones of broilers reared under the influence of BGL. These findings are consistent with the significant increase in weight and the length of the tibia in broilers reared under the influence of BGL while the low values recorded in the treatment of chickens reared under the influence of red. These results were supported by (37), who reported that bone density is a reflection of the weight and the length of the bone. A study conducted by (38) showed that switching environmental light spectra from green to blue at 10 days of age accelerate growth of male broiler chicks. In parallel in this study he found early age acceleration in growth in the green light reared birds, and, in addition shifting the GL birds to BL environment caused further increase in both growth rate and body weight. In accordance, quails raised under blue or green fluorescent lamps gained significantly more weight than those reared under

red or white fluorescent lamps (39). The absence of stocking density effect on tibia measurements agreed with the result of (29) on broilers of Arbor Acres and Cobb 500 genotypes reared to 42 days of age in floor system, and two stocking densities: 12 birds/m<sup>2</sup> and 16 birds/m<sup>2</sup>. Results of the trial indicate absence of significance of differences between trial groups of broilers in regard to their walking ability, condition of skin and legs, and stress indicators. The results of the current study disagreed with (6), who evaluated the effect of stocking density on bone quality and fluctuating asymmetry. Birds were stocked at densities of 2.4, 5.8, 8.8, 12.1, 13.6, 15.5, 18.5, and 21.8 birds/m<sup>2</sup> from 1 until 39 day of age. Increased stocking density had a negative effect on some aspects of bone. Tibias were shorter at high density, possibly due to increased curvature. Positive effect was recorded by (40) and (41) of lower stocking density on length of tubular bones, development and roundness of breast, development of hind extremities. Breast angle, although it represents genetic trait, was improved in conditions of lower stocking density.

Table (1): Effect of color light and stocking density on some bone measurements of broilers at 35<sup>th</sup> day of age (M±SE)

Bone parameters	Color light Stocking density	WL	RL	BL	GL	BGL	Effect of stocking density
Calcium ppm	12 bird/m <sup>2</sup>	2435±6.35	2905± 3.46	3257± 4.61	3359±4.04	3156±2.88	3022±4.26
	15 bird/m <sup>2</sup>	3111± 2.30	2818± 1.73	3723± 1.73	3389±6.92	3110±2.30	3230±2.99
	18 bird/m <sup>2</sup>	3153± 3.46	2537± 3.46	2511± 6.35	3856±6.35	3731±9.23	3157±5.77
	Effect of color light N. S.	2899± 4.03	2753± 2.88	3163± 4.23	3534±5.77	3332±4.80	N. S.
Phosphorus ppm	12 bird/m <sup>2</sup>	37.16±0.03	22.79±0.00	45.91±0.02	45.21±0.07	42.62±0.01	38.75±0.02
	15 bird/m <sup>2</sup>	34.43±0.08	49.67±0.19	44.39±0.01	33.35±0.01	47.44±0.01	41.85±0.06
	18 bird/m <sup>2</sup>	28.62±0.00	47.08±0.02	49.32±0.09	49.67±0.06	39.46±0.05	42.83±0.04
	Effect of color light N. S.	33.40±0.03	39.84±0.07	46.54±0.04	42.74±0.04	43.17±0.02	N. S.
Bone length (cm)	12 bird/m <sup>2</sup>	9.66±0.16	10.00±0.57	10.50±0.50	9.66±0.60	10.00±0.50	9.96± 0.46
	15 bird/m <sup>2</sup>	9.33±0.33	9.50±0.57	10.16±0.16	9.66±0.33	10.00±0.50	9.73± 0.37
	18 bird/m <sup>2</sup>	9.33±0.88	9.33±0.33	10.16±0.16	9.83±0.60	10.50±0.28	9.83± 0.42
	Effect of color light *	9.44 <sup>b</sup> ±0.45	9.61 <sup>ab</sup> ±0.49	10.27 <sup>a</sup> ±0.27	9.72 <sup>ab</sup> ±0.51	10.16 <sup>a</sup> ±0.42	N. S.
Bone weight (gm)	12 bird/m <sup>2</sup>	17.66±0.66	14.66±3.17	19.66±1.33	16.33±3.28	17.66±2.84	17.20±2.25
	15 bird/m <sup>2</sup>	14.33±1.45	13.33±1.85	17.00±1.52	15.33±0.66	18.33±4.17	15.66±1.93
	18 bird/m <sup>2</sup>	14.33±4.05	13.33±2.33	17.33±1.66	17.00±3.00	19.66±1.20	16.33±2.44
	Effect of color light *	15.44 <sup>b</sup> ±2.05	13.77 <sup>b</sup> ±2.45	18.00 <sup>a</sup> ±1.50	16.22 <sup>b</sup> ±2.31	18.55 <sup>a</sup> ±2.73	N. S.
Bone density (gm/cm)	12 bird/m <sup>2</sup>	1.82±0.08	1.43±0.23	1.86±0.04	1.65 ±0.25	1.74±0.20	1.70± 0.16
	15 bird/m <sup>2</sup>	1.52±0.10	1.39±0.13	1.67±0.14	1.58 ±0.01	1.79±0.34	1.59± 0.14
	18 bird/m <sup>2</sup>	1.47±0.31	1.41±0.19	1.70±0.15	1.70 ±0.19	1.87±0.11	1.63± 0.19
	Effect of color light *	1.60 <sup>ab</sup> ±0.16	1.41 <sup>b</sup> ± 0.18	1.74 <sup>a</sup> ± 0.11	1.64 <sup>ab</sup> ±0.15	1.80 <sup>a</sup> ± 0.21	N. S.

\*a, b, c Means in horizontal rows with different superscripts were significantly different of light color and in vertical rows of stocking density at ( $p < 0.05$ ). SE: standard error. N.S. not significant

### Serum calcium and phosphorus of broilers and layers

Table (2) shows the effect of light color and stocking density on calcium and phosphorus concentration on blood serum of broiler chickens in the different experimental treatments at the age of 35 days. The results of calcium were not significantly affected ( $p > 0.05$ ) by color light, nor there significant differences between the various levels of density. The non-significant effect of color light and broiler density in the calcium concentration of broiler serum may be due the absence of stressful environmental factors that adversely affect the level of calcium in blood serum. As (42) referred that plasma Ca concentration measured showed a significant decrease during heat stress period while PH levels increased during the same period. A significant effect ( $P < 0.05$ ) of color light in the concentration of phosphorus was recorded and reached its highest rate in the serum of broilers reared under the influence of BGL, while the least rate recorded in the serum of chickens reared under WL. As for the effect of stocking density in the concentration of phosphorus in the blood serum it emerges from the table (2) absence of significant differences between the various treatments. A superiority in the level of phosphorus in the serum of broilers reared under the influence BGL may reflect the elevation of feed consumption in this group compared to white and red groups. This is consistent with the results of (43), who showed that low feed consumption also leads to low in the level of phosphate in the blood. The table also showed a significant effect ( $P < 0.05$ ) for the color light in the C/P ratio which reached its highest score in the treatment of broilers reared under the

influence of GL whereas, density levels were not significantly affect the C/P ratio in various treatments. Table (2) indicated a significant effect ( $P < 0.05$ ) of color light in the level of serum calcium of layers reared under the influence of WL. This result was inconsistent with the results of (2), who showed that ultraviolet light had significantly higher plasma Ca level than fluorescent and infrared lights in turkey at 25 and 40 week of age. The results of this study confirm what referred to by (44) that calcium and phosphorus in the blood serum in laying hens are related to the status of the egg-laying and layer of strain, so the high level of calcium in the blood serum of layers reared under the influence of WL reflect an increase in the productivity of eggs. The analysis of variance referred to the presence of significant interaction ( $P < 0.05$ ) between light color and stocking density in the level of calcium in blood serum as it recorded the highest rate in layers reared under the influence of WL and the level of density 7 birds/m<sup>2</sup> while the least average recorded in layers reared under the influence of the RL and the level of density 7 birds/m<sup>2</sup>. Table (2) also showed that color light positively affected ( $P < 0.05$ ) the concentration of serum phosphorus in layers reared under the influence of WL while least average recorded in serum of layers reared under the influence of BL. A significant effect ( $P < 0.05$ ) was also recorded for the color light in the C / P ratio of layers of BL and BGL. These ratios reflect the rates recorded for the concentrations of calcium and phosphorus in various treatments. The result of this study revealed that different values of serum calcium and phosphorus of layers studied were not differed significantly within various bird densities.

Table (2): Effect of color light and stocking density on the level of calcium and phosphorus in blood serum of broilers and layers (M $\pm$ SE)

Broilers	Serum traits	Color light Stocking density	WL	RL	BL	GL	BGL	Effect of stocking density
	Calcium (mg/100 ml)	12 bird/m <sup>2</sup>	7.83 $\pm$ 0.21	8.56 $\pm$ 0.14	8.76 $\pm$ 0.29	9.83 $\pm$ 0.71	10.33 $\pm$ 1.08	9.06 $\pm$ 0.78
		15 bird/m <sup>2</sup>	8.00 $\pm$ 0.10	8.73 $\pm$ 0.66	8.53 $\pm$ 0.29	9.66 $\pm$ 0.56	11.26 $\pm$ 1.14	9.24 $\pm$ 0.55
		18 bird/m <sup>2</sup>	8.36 $\pm$ 0.03	9.20 $\pm$ 0.25	9.13 $\pm$ 0.14	10.16 $\pm$ 0.6	10.13 $\pm$ 0.46	9.40 $\pm$ 0.30
		Effect of color light N. S.	8.06 $\pm$ 0.11	8.83 $\pm$ 0.35	8.81 $\pm$ 0.24	9.88 $\pm$ 0.63	10.57 $\pm$ 0.89	N. S.
	Phosphorus (mg/100 ml)	12 bird/m <sup>2</sup>	4.96 $\pm$ 0.31	5.33 $\pm$ 0.40	5.93 $\pm$ 0.35	5.20 $\pm$ 0.05	6.66 $\pm$ 0.12	5.62 $\pm$ 0.24
		15 bird/m <sup>2</sup>	4.46 $\pm$ 0.37	5.06 $\pm$ 0.12	5.56 $\pm$ 0.54	5.00 $\pm$ 0.34	7.03 $\pm$ 0.24	5.42 $\pm$ 0.32
		18 bird/m <sup>2</sup>	4.80 $\pm$ 0.49	4.93 $\pm$ 0.39	5.20 $\pm$ 0.60	5.90 $\pm$ 0.66	6.80 $\pm$ 0.34	5.52 $\pm$ 0.49
		Effect of color light *	4.74 $\pm$ 0.3	5.11 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.3	5.56 <sup>b</sup> $\pm$ 0.4	5.36 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.3	6.83 <sup>a</sup> $\pm$ 0.2	N. S.
	Ca : P ratio	12 bird/m <sup>2</sup>	1.58 $\pm$ 0.09	1.62 $\pm$ 0.11	1.47 $\pm$ 0.03	1.89 $\pm$ 0.14	1.55 $\pm$ 0.18	1.62 $\pm$ 0.11
		15 bird/m <sup>2</sup>	1.81 $\pm$ 0.15	1.72 $\pm$ 0.10	1.55 $\pm$ 0.13	1.94 $\pm$ 0.15	1.59 $\pm$ 0.12	1.72 $\pm$ 0.13
		18 bird/m <sup>2</sup>	1.78 $\pm$ 0.19	1.88 $\pm$ 0.18	1.80 $\pm$ 0.23	1.75 $\pm$ 0.18	1.50 $\pm$ 0.14	1.74 $\pm$ 0.18
		Effect of color light *	1.72 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.1	1.74 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.1	1.60 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.1	1.86 <sup>a</sup> $\pm$ 0.1	1.54 <sup>b</sup> $\pm$ 0.1	N. S.

Layers	Calcium (mg/100 ml)	5 bird/m <sup>2</sup>	11.60 ±0.2	11.63±0.8	12.00±0.2	11.43±0.2	12.03 ±0.6	11.74±0.4
		7 bird/m <sup>2</sup>	12.76±0.1 <sup>A**</sup>	10.23 <sup>B</sup> ±0.2	11.06±0.2	11.20±0.4	11.33±0.14	11.32±0.2
		Effect of color light *	12.18±0.1	10.93 <sup>b</sup> ±0.5	11.53 <sup>ab</sup> ±0.	11.31 <sup>b</sup> ±0.3	11.68 <sup>ab</sup> ±0.3	N. S.
	Phosphorus (mg/100 ml)	5 bird/m <sup>2</sup>	5.60 ±0.11	5.53 ±0.40	4.43 ±0.14	4.56 ±0.14	4.56 ±0.12	4.94±0.18
		7 bird/m <sup>2</sup>	5.43 ±0.41	5.06 ±0.18	4.30 ±0.11	4.66 ±0.28	4.40 ±0.15	4.77±0.22
		Effect of color light *	5.51 <sup>a</sup> ±0.26	5.30 <sup>a</sup> ±0.29	4.36 <sup>b</sup> ±0.12	4.61 <sup>b</sup> ±0.21	4.48 <sup>b</sup> ±0.13	N. S.
	Ca : P ratio	5 bird/m <sup>2</sup>	2.06 ±0.03	2.10 ±0.01	2.70 ±0.10	2.50 ±0.02	2.64 ±0.19	2.40 ±0.07
		7 bird/m <sup>2</sup>	2.58 ±0.18	2.01 ±0.04	2.57 ±0.12	2.42 ±0.20	2.58 ±0.11	2.43 ±0.13
		Effect of color light *	2.32 <sup>bc</sup> ±0.1	2.05 <sup>c</sup> ±0.0	2.64 <sup>a</sup> ±0.1	2.46 <sup>ab</sup> ±0.1	2.61 <sup>a</sup> ±0.1	N. S.

\*a, b, c Means in horizontal rows with different superscripts were significantly different of light color and in vertical rows of stocking density at ( $p < 0.05$ ). SE: standard error. N.S. not significant. \*\*A, B, C Means with different superscripts were significantly different of interaction between light color and stocking density at ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSION

The results of the present study suggested that the use of blue, green and mixed blue and green would be relevant for birds comfort and may benefit performance, which reflected a significant increase in the bone length, weight and bone density. For layers, a significant effect of white light in the level of serum calcium and phosphorus should be considered, whereas no effects for stocking density on these traits were observed.

## REFERENCES

- Deep A.; Schwan-Lardner K.; Crowe T G.; Fancher B.I. and Classen H.L. (2010). Effect of light intensity on broiler production, processing characteristics, and welfare. *Poult. Sci.* 89 :2326–2333.
- El-Fiky A.; Soltan M.; Kalamah M.A. and Abou-Saad S. (2008). Effect of light color on some productive, reproductive, egg quality traits and free radicals in turkey. *Egypt. Poult. Sci.* 28 (III): 677-699.
- Senaratna D.; Samarakone T.S.; Madusanka A.P. and Gunawardane W.W.D.A. (2011). Performance, Behavior and welfare aspects of broilers as affected by different colors of artificial light. *Tropic. Agri. Res. Exten.* 14(2): 38-44.
- Pang G.; Kwan T.; Liu H. and Chan C.H. (1999). LED traffic light as communications device. University of Hong Kong. P. 789.
- Rierson R.D. (2011). Broiler preference for light color and feed form, and the effect of light on growth and performance of broiler chicks. Master thesis, College of Agriculture, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA.
- Buijs S.; Van Poucke E.; Van Dongen S.; Lens L.; Baert J. and Tuytens F.A.M. (2012). The influence of stocking density on broiler chicken bone quality and fluctuating asymmetry. *Poult. Sci.* 91 (8): 1759-1767.
- Skrbic Z.; Pavlovski Z.; Lukic M. and Milic D. (2011). The effect of rearing conditions on carcass slaughter quality of broilers from intensive production. *Afri. J. Biotechnol.* 10(10): 1945-1952.
- Adebiyi O.A.; Sokunbi O.A. and Ewuola E.O. (2009). Performance evaluation and bone characteristics of growing cockerel fed diets containing different levels of diatomaceous earth. *Middle-East J. Sci. Res.* 4 (1): 36-39.
- Onyango E.M.; Hester P.Y.; Strohshine R. and Adeola O. (2003). Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. *Poult. Sci.* 82: 1787-1791.
- Chiba L.I. (2009). Animal nutrition handbook. Poultry nutrition and feeding. P. 169-179.
- Adamu S.B.; Geidam Y.A.; Mohammed G.; Gambo H.I. and Raji A.O. (2012). The influence of varying calcium-phosphorus ratios on finishing and carcass characteristics of broiler finisher chickens under a semi arid environment. *ARPJ. Agr. Biol. Sci.* 7(7): 558-563.
- Sorensen P.; Su G. and Kestin S.C. (1999). The effect of photoperiod: scotoperiod on leg weakness in broiler chickens. *Poult. Sci.* 78:336–342.
- Suchy P.; Strakova E.; Herzig I. Steinhäuser L.; Kralik G. and Zapletal D. (2009). Chemical composition of bone tissue in broiler chickens intended for slaughter. *Czech J. Anim. Sci.* 9 (7): 324–330.
- Applegate T.J. and Lilburn M.S. (2002). Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. *Poult. Sci.* 81:1289–1294.
- Brickett K.E.; Dahiya J.P.; Classen H.L.; Annett C.B. and Gomis S. (2007). The impact of nutrient density, feed form, and photoperiod on the walking ability and skeletal quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 86:2117–2125.
- Prayitno D.S.; Phillips C.J.C. and Stokes D.K. (1997). The effects of color and intensity of

light on behavior and leg disorders in broiler chickens. *Poult. Sci.* 40:332–339.

17. Toghyani M.; Tohidi M.; Gheisari AA. and Tabeidian SA. (2010). Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. *Afr. J. Biotechnol.* 9(40): 6819-6825.

18. Campbell TW. (2004). Blood biochemistry of lower vertebrates. In: 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology.

19. Kunjarathiyapung C. and Ruenosuphaphichat P. (1987). Studies on the mineral elements in serum of laying hens and laying ducks. *Kasetsart Veterinarians.* 8 (1): 58-63.

20. Isa Brown (2010). Commercial Management Guide. P. 205- 216.

21. NRC.(1994). Nutrient requirements of poultry. 9<sup>th</sup>. review National. Academy Press, Washington, D.C.

22. Hall LE.; Shirley RB.; Bakalli RI.; Aggrey SE.; Pesti GM. and Edwards HM. (2003). Power of two methods for the estimation of bone ash of broilers. *Poult. Sci.* 82: 414-418.

23. Seedor JG.; Quarruccio HA. and Thompson DD. (1991). The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J. Bone. Miner. Res.* 6:339–346.

24. Cresser MS. and Parsons JW. (1979). Sulphuric perchloric digestion of plant materials for the determination of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium. *Anal. Chem. Acta.* 109:431-436.

25. AOAC. (1984). Official methods of analysis, 14<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

26. Tietz NW. (1999). Textbook of Clinical Chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders.

27. Almeida Paz ICL.; Mendes AA.; Balog A.; Almeida ICL.; Martins, MRFB.; Vulcano LC. and Komiyama CM. (2008). Quality parameters of the tibiae and femora of ostriches. *Braz. J. Poult. Sci.* 10(3):163-167.

28. Roland DA. and Rao SK. (1992). Nutritional and management factors related to osteopenia in laying hens. Pp. 281–295. In: Poultry Science Symposium 23: Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. C. C. Whitehead, ed. Carfax Publishing, Adington, Oxford shire, UK.

29. Skrbic Z.; Pavlovski Z.; Vitirovic D.; Lukic M. and Petricevic V. (2009). The effects of stocking density and light program on tibia quality of broilers of different genotype. *Arch. Zootech.* 12 (3): 56-63.

30. Koutoulis KC.; Kyriazakis I.; Perry GC. and Lewis PD. (2009). Effect of different calcium sources and calcium intake on shell quality and bone characteristics of laying hens at sexual maturity and end of lay. *Int. J. Poult. Sci.* 8(4): 342-348.

31. Bjerstedt H.; Robinson F.; Hardin R. and Wautier T. (1995). Carcass traits and reproductive

organ morphology in 62-weeks old hens. *Canad. J. Anim. Sci.* 75 : 341-344.

32. Prayitno D.; Phillips CJC. and Omed H. (1997). The effects of color of lighting on the behavior and production of meat chickens. *Poult. Sci.* 76:452–457.

33. Priel A. (1998). Green light: A new phenomenon to improve broiler performance. *World Poult.* 14: 28-29.

34. Lewis PD. and Morris TR. (2000). Poultry and coloured light, *World Poult. Sci. J.* 56(3):189-207.

35. Cao J.; Liu W.; Wang Z.; Xie D. and Chen Y. (2008). Green and blue monochromatic lights promote growth and development of broilers via stimulating testosterone secretion and microfiber growth. *J. Appl. Poult. Res.* 17:211-218.

36. Whitehead CC.; McCormack, HA.; McTeir L. and Fleming RH. (2004). High vitamin D3 requirements in broilers for bone quality and prevention of tibial dyschondroplasia and interactions with dietary calcium, available phosphorus and vitamin A. *Br. Poult. Sci.* 45: 425-436.

37. Cruz CEB.; Freitas ERF.; Farias NNP.; Xavier RPD.; Lima JDCL.; Sa NL.; Braz ND. and Bezerra RM. (2012). Bone quality of laying hens fed different levels of fiber in the growth phase (7 to 17) weeks of age. *R. Bras. Zootec.* 41(9): 2032-2038.

38. Rozenboim I.; Biran I.; Chaiseha Y.; Yahav S.; Rosenstrauch A.; Sklan D. and Halevy O. (2004). The effect of a green and blue monochromatic light combination on broiler growth and development. *Poult. Sci.* 83 (5): 842-845.

39. Phogat SB.; Aggarwal CK. and Chopra SK. (1985). Effect of red and green lights on growth of quail. *Indian J. Poult. Sci.* 20: 126-128.

40. Pavlovski Z.; Lukic M.; Cmiljanic R. and Skrbic Z. (2006). Konformacijatrupova pilica. *Biotech. Anim. Husb.* 3(4): 83-97.

41. Sanotra GS.; Lawson LG. and Vestergaard KS. (2001). Influence of stocking density on tonic immobility, lameness, and tibial dyschondroplasia in broilers. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 4:71-87.

42. Allahverdi A.; Feizi A.; Takhtfooladi HA. and Nikpiran H. (2013). Effects of heat stress on acid-base imbalance, plasma calcium concentration, egg production and egg quality in commercial layers. *Global Vet.* 10 (2):203-207.

43. Al-Daraji HJ.; Al-Hayani WK. and Al-Hassani AS. (2008). Avian hematology. College of Agriculture, University of Baghdad, Ministry of Higher Education and Scientific Research, Iraq.

44. Bhatti BM.; Talat T. and Sardar R. (2002). Estimation of serum alkaline phosphatase, cholesterol, calcium and phosphorus during pre-laying and laying conditions in different strains of chickens. *Pakist. Vet. J.* 22(2): 94-96.

## The levels of Aflatoxin B1 residue in slaughtered chicken flesh and livers in Sulaimani City markets

Hazhaow O. Murad (1) Emad A. Abdulahad (2) and Ahmed Y. Hamadameen (1)

(1) Dept. of Microbiology / College of Veterinary Medicine (2) Department of Anatomy and Histopathology, College of Veterinary Medicine / University of Sulaimani / Republic of Iraq

E-mail: hazhaow@gmail.com

### ABSTRACT

In order to assess the levels of Aflatoxin B1 in local chicken meat and then to determine their affinity for human consumption in Sulaimani city. 60 samples of both chicken carcasses and livers (30 for each) had been collected from different markets at Sulaimani city and analysed by using HPLC-UV. detection method. The results revealed that, although 100% of chicken meat and 65% of chicken liver samples recorded readable amounts of AFB1, yet they were under International permissible limits, which revealed that those represented samples were fit for human consumption.

**Keywords:** Aflatoxin B1, HPLC-UV. detection method

### الملخص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم مستويات سموم الأفلاتوكسين B1 في لحوم الدواجن المباعة في مدينة السليمانية / إقليم كردستان العراق، ومن ثم تحديد مدى صلاحيتها للاستهلاك البشري. تم جمع 60 عينة من ذبائح الدواجن والأكباد (30 من كل نوع) من مختلف أسواق المدينة، وتم فحصها باستخدام تقنية HPLC-UV. . وقد بينت النتائج أنه بالرغم من أن 100 % من عينات ذبائح الدواجن و 65 % من عينات أكباد الدواجن سجلت مستويات مقروءة من سموم الأفلاتوكسين B1، إلا أنها تعتبر من ضمن الحدود العالمية المسموحة، مما يثبت صلاحيتها للاستهلاك البشري.

## INTRODUCTION

Aflatoxins are a group of heterocyclic metabolites produced by the fungi of the genus *Aspergillus*, particularly *A. flavus* and *A. parasiticus*. Even though 18 different aflatoxins have been identified; only Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 have been detected as natural contaminants of feeds and feedstuffs. Animals are considered the most group exposed to high concentration of aflatoxins through feedstuffs that develop several health problems, which lead to large economic losses. These losses are pronouncing in meat and eggs in terms of quality and quantity (1,2). Of these toxins, aflatoxin B1 is the most prevalent form and has potent hepatotoxic, carcinogenic, genotoxic, immunotoxic effects in human beings (3,4). Since definitive ways for complete detoxification of aflatoxin contaminated poultry feed do not exist, poultry carcasses are widely affected by the toxin which is finally transmitted to the consumers (5,6). The target organ for the toxic action of aflatoxins is the liver. Poultry species vary in their susceptibility to aflatoxins with ducklings being the most sensitive and chickens the most resistant (7). Aflatoxins are a particular concern for populations with a high incidence of hepatitis B because the relative rate of liver cancer in people with hepatitis B is up to 60 times greater than normal when those people are exposed to aflatoxin (8). Understandably, the agencies such as Food and Drug Administration (FDA), United States Department of Agriculture (USDA) and Food Safety Agency (FSA) provided standard limitation for aflatoxin B1 residues in chicken carcasses and organs; as a result, stated that when the residues would be upper the standard limits, the vital health risk would be on humans (9). Survey data from the FAO also reveal that the number of countries adopting mycotoxin regulations grew significantly from the mid-1980s to mid-1990s, and that the range of tolerance levels vary widely (10). In 1996, for example, 48 countries had established tolerance levels for total aflatoxins in food—up from 30 in 1987—with standards ranging from 0 parts per billion (ppb) to 50 ppb.

The aim of this study was to determine the quantity of the aflatoxin B1 in the chicken meats and liver samples that sold in Sulaimani city markets by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC/UV); then, compare with international standard limits in order to assess their fitness for human consumption.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection

A total sample of 60 broiler meat and fresh liver (30 for each) were collected from different markets of Sulaimani city during November 2014 to March 2015. The samples were stored in icebox during transported and stored in plastic bags at 4°C, until the analysis. The meat samples (breast and thigh

muscle were mixed well then used), three replicated were done for the same sample.

### Chemical and reagents

Aflatoxin B1, crystalline material were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). According to method of (11), the stock concentrated solution was prepared in toluene-acetic acid (99:1 v/v) at a final concentration of 1 µg/ml and kept under safe conditions at -20°C and wrapped in aluminum foil because AFB1 gradually breaks down under ultraviolet (UV) light. The toxin working solution was prepared by diluting the stock solution with toluene-acetic acid (99:1 v/v) to 0.8, 1 µg/ml. The actual concentration of toxin was calculated by fluorescence spectrophotometer set at 333 nm excitation and 440 nm mission (e5550). After suitable dilutions in water-methanol-acetic acid (50:49:1 v/v/v), the working solution was used to prepare the external calibration curve. The reagents were HPLC grade and chemically pure.

### Extraction procedure for Aflatoxins B1

The extraction of AFs from meat and liver samples was performed according to the method (12) with some modifications. About 15 g sample was blended (20 min) with 50 ml of acetonitrile-water (45:05) and then the sample was centrifuged for 5 min at 3000 rpm at the room temperature. Then, 10 ml filtrate was diluted with 10 ml of deionized water and purified using an immunoaffinity column at a rate of 3- 4 drops/s and washed with water (2 ml) twice at the same flow rate. Final elution was accomplished by passing 1.0 ml of methanol. Finally, the residue was evaporated with a nitrogen stream at 40°C. After evaporation 100 ml Trifluoro acetic acid was added to derivatize AFB1. The samples were placed in the dark place (15 min) at room temperature. Then, 400 ml of acetonitrile-water (1:9, v/v) mixture was added to the vials. A 20 ml portion of the solution was subjected to LC analysis. The HPLC system used in the present study was a Shimadzu Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18, 50x4.6mm (1.8 µm) column on a Shimadzu 2010 HPLC system which was equipped with fluorescence detector (RF-530). The reverse phase mode with a mobile phase of aceto nitrile methanole-water (20:20:60, v/v/v) was used at a flow rate of 1 ml/ min. The wavelength of fluorescence detector was set at 360 (excitation) and 440 nm (emission).

### Chromatographic conditions (HPLC)

An aliquot of 50 µl for meat extract samples and 50 µl for liver samples was injected on an agilent ZORBAX Eclipse XDB C18, 50x4.6mm (1.8 µm) column on a Shimadzu 2010 HPLC system. The column oven temperature was set to 40°C. A gradient of eluent A: water + ammonium acetate,

and eluent B: methanol+ ammonium acetate. Details of the gradients are given in table (1).

**Table (1): Gradients of eluents A & B**

Step	Time (min)	A (%)	B (%)
0	0.0	80	20
1	1.0	80	20
2	5.5	10	90
3	7.0	10	90
4	8.0	80	20

### Statistical analysis

Data were calculated and statistically processed using the statistical package SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). The level of statistical significance was set at 0.05 for both *t*-test.

### RESULTS AND DISCUSSION

The presence of aflatoxin residues in chicken muscles is most important from the human health perspective because the muscles are the largest edible components of broiler birds.

Table (2) showed the means of Aflatoxin B1 levels in all tested chicken meat and liver samples, the standard deviation of the meat samples was 3.35 and for liver samples were 1.71, which revealed that there was differences in the levels of the residues among the samples for both meat and livers. This is might be caused as samples were collected from different locations. In Kurdistan region, the local slaughtered chicken carcasses (fresh carcasses) sold separately than their internal organs (liver, gizzard and hearts) which sold under certain weights. This made it difficult to refer to which carcasses these livers belonged, and it also explains why the average of AFB1 in chicken meats 3.356 µg/kg was higher than livers 1.712 µg/kg (table 2).

The same table (2) showed that all inspected meat samples had readable amount of the AFB1 (100%), whereas only 65% of liver samples had readable amount, the highest reading of mean values in meat samples was 12.997 in sample 14, and the lowest reported in both samples (1 and 2) as 0.610. In other hand the highest mean value of reading toxin amount in liver samples was 9.582 in sample 30 while all of the samples (6, 9, 10,16) were free from it. The previous results were close to Experimental studies results conducted by different workers revealed aflatoxin residues in the liver and muscles of broiler birds following administration of different dietary AF levels for variable periods.

Hussain *et al.* (13) in an experimental study reported that feeding of AFB1 from 1600 to 6400 ng/g to the broiler birds for 7 days resulted a maximum level of 6.97ng/g AFB1 in liver tissue. Still the recent study results were lower than the results conducted by Herzallah (14), who reported levels of aflatoxin B1 (AFB1) in breast, leg, liver, kidney, and gizzard and in litter, the broiler chicks maintained for 6 weeks

on AFB1 contaminated diets. The highest AFB1 of 1.2 µg/kg was at the third week in liver tissues and 0.8 µg/kg in chicken legs fed diet contaminated with 374.53 ppb AFB1, the residual level of AFB1 were increased in liver and kidney of 2.1 and 1.9 µg/kg at wk five, and in chickens breast and leg the levels increased to 0.93 and 1.64 µg/kg, respectively.

The present study results were not agreed with the results recorded by Khan *et al.* (15) who studied the levels of AFB1 and total aflatoxins (AF) in broiler meat at market age, 264 samples from 199 healthy and 65 sick flocks were collected from markets in the Faisalabad region/ Pakistan. The detected residues of AFB1 in liver, kidneys and muscles of healthy birds were 75.9, 44.7 and 21.6%, respectively, while the detected residues in liver, muscle and kidneys of sick birds were 89.2, 70.8 and 55.4% respectively. Also, the results of maximum readable levels of AFB1 in chicken muscle in the present study were higher than the study of (15), who recorded the levels of AFB1 and total AF residue in muscles of broiler birds as 0.02-1.99 and 0.02-2.99 ng/g respectively, and the results of Hussain *et al.* (13), who reported the maximum residues in the chicken muscles as 0.22-3.27 ng/g after feeding on diet containing up to 6400 ng/g AFB1. Yet, the recent study results were close to the results of Eleftheriadou *et al.* (16) from Greece, who reported that aflatoxin residues detected in 40.8% of chicken samples and the highest value was 7.6 ng/g, and results of Begum *et al.* (17), who recorded AFB1 residues as 9 ng/g.

Because of the potential health hazards of mycotoxins for humans, threshold levels of aflatoxins in commodities have been established worldwide. A maximum residue limit of 10 µg/kg total aflatoxins in foods has been set in more than 75 countries around the world, while a limit of 4 µg/kg has been set for foods in the European Union (18). Based on the fact that Iraq has no standard levels for AFB1 residues in meat, the researchers depended on Food and Drug Administration (FDA) regulations (19), which determined the levels of aflatoxin in human food as 20 ppb, and the results in table (3) showed the significant difference ( $p \leq 0.005$ ) between the means of AFB1 levels in chicken meat samples with the standard limits, while table (4) showed the significant difference ( $p \leq 0.005$ ) between the means of AFB1 levels in liver samples with standard limits and the results revealed that the levels in both type of samples were under the limits, which mean that all (100%) of chicken meat samples and all liver samples tested contained aflatoxins levels within the maximum permissible limits that regulated by (FDA) (19).



Table (2): The means of Aflatoxin B1 levels in all tested chicken meat and liver samples

Sample no.	AFB1 in meat µg/kg	AFB1 in liver µg/kg
1	0.61066	1.228
2	0.61066	4.99768
3	7.53327	1.94445
4	2.92012	142513
5	9.28867	0.62189
6	5.03502	0
7	2.30863	1.11051
8	1.49023	1.1142
9	0.73148	0
10	3.13187	0
11	4.17939	1.95537
12	1.49203	1.09194
13	1.31112	1.51988
14	12.99761	1.0111
15	2.58007	1.31438
16	6.78747	0.74509
17	1.3695	0.9794
18	3.52015	3.68131
19	2.50209	0
20	3.05233	2.25612
21	2.56737	1.87886
22	4.66942	1.36429
23	3.87837	0.54543
24	1.77397	0.53851
25	2.02288	0.5137
26	1.00145	0.72198
27	2.96406	1.56156
28	2.72431	2.55911
29	6.0885	4.44744
30	4.35823	9.58216
Percentage	100%	65%
Average	3.356257	1.712253
Std.Dev	2.614236	2.038171
Std.Error	1.426978	1.557602

Table (3): Comparison of Aflatoxin B1 levels in chicken meat samples with international standards by using one sample test

	Test Value = 0.5					
	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Afla	1.000	29	.325	4751.57615	-4964.0351	14467.1874

Table (4): Comparison of Aflatoxin B1 levels in chicken liver samples with international standards by using one sample test

	Test Value = 0.2					
	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
sub	6.575	29	.001	3.31670	2.2849	4.3485

## REFERENCES

1. Farombi EO. (2006). Aflatoxin contamination of foods in developing countries: implications for hepatocellular carcinoma and chemo- preventive strategies. *Afr. J. Biotechnol.* 5(1): 1-14.
2. Bintvihok A. and Kositcharoenkul S. (2006). Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1. *Toxicon.* 47: 41-46.
3. Leeson S.; Diaz GJ. and Summers JD. (1995). *Poultry metabolic disorders and mycotoxins.* Guelph, Ontario, Canada: University Books.
4. Eleftheriadou A.; Kaniou I.; Mouratidou T.; Moutzias A. and Libitakis N. (2004). Tracing and quantitative evaluation of aflatoxins (B1, B2, G1, G2) in animal feeds and fattening chickens. *Arch. Lebens. Hyg.* 55(1): 16-18.
5. Fink-Gremmels J. (2008). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet. J.* 176 (1): 84-92.
6. Markov K.; Pleadin J.; Bevardi M.; Vahčić N.; Sokolić-Mihalak D. and Frece J. (2013). Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control.* 34(2): 312-317.
7. Martella R.; Monaci L.; Milillo MA; Palmisano F. and Tantillo MG. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swine slaughtered in southern Italy. *Food Control.* 17(114):7-11.
8. Begum F.; Rehman A.; Maliha G. and Nuzhat J. (2001). Distribution of aflatoxin from poultry feed to different body tissues of broilers. *Pak Vet. J.* 21: 121-123.
9. Kha, MZ.; Hameed MR.; Hussain T.; Khan A.; Javed I.; Ahmad I.; Hussain A.; Saleemi MK. and Islam N. (2013). Aflatoxin residues in tissues of healthy and sick broiler birds at market age in Pakistan: A one year study. *Pak Vet J.* 33(4): 423-427.
10. Herzallah SM. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chem.* 114(3):1141-1146.
11. Herzallah S.; Al-Ameiri N.; Al-Dmoor H.; Masoud S. and Shawabkeh K. (2014). Meat and organs quality of broiler chickens fed diet contaminated with B1 aflatoxin, *Global. Vet.* 12 (3): 376-380.
12. Hussain Z.; Khan A.; Khan MZ.; Javed I.; Saleemi MK.; Mahmood S. and Asi MR. (2010). Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. *Food Chem. Toxicol.* 48(12): 3304.
13. Miller JD. (1996). Food borne natural carcinogens: issues and priorities. *Afr. Newslett.* 6:Suppl. 1:1-9.
14. Ozen H.; Karaman M.; Cigremis Y.; Tuzcu M.; Ozcan K. and Erdag D. (2009). Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks. *Res. Vet. Sci.* 86 (3): 485-489.
15. Van Egmond HP. (1995). Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference material. *Food Addit. Contam.* 12(3): 321-330.
16. Rawal S.; Kim JE. and Coulombe Jr R. (2010). Aflatoxin B1 in poultry toxicology, metabolism and prevention. *Res. Vet. Sci.* 89: 325-333.
17. Bintvihok A.; Thiengnin S.; Doi K. and Kumagai S. (2002). Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *J.Vet. Med. Sci.* 64(11): 1037- 1039.
18. FDA, Food and Drug Administration. (2000). Guidelines for industry: action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. CPG 555. 400.
19. Madrigal-Santillan E.; Alvarez-Gonzalez I.; Marquez-Marquez R.; Velazquez-Guadarrama N. and Madrigal-Bujaidar E. (2007). Inhibitory effect of mannan on the toxicity produced in mice fed aflatoxin B1 contaminated corn. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 466-472.

## Post - vaccinal reaction for some vaccines strains against infectious bursal disease used in Sulaimaniyah Province , Kurdistan- Iraq

Emad A. Abdulahad

Dept. of Anatomy and Histopathology / College of Veterinary Medicine / University of Sulaimani / Republic of Iraq

E-mail: [ijst.jordan@yahoo.com](mailto:ijst.jordan@yahoo.com)

### ABSTRACT

The study was conducted to detect the most safety vaccine strains used against IBD in Sulaimaniyah Province, Kurdistan-Iraq. A total of 225 one day old broiler chicks of Ross 308 breed were investigated for their maternal derived antibodies (MDA) titer through ELISA test. Chicks were randomly divided into 3 groups equal in number 2 treatment groups, T1: was vaccinated by IBA-vac. ( Fatro) intermediate strain and T2: was vaccinated by CH/80 intermediate strain (Hipra). Both were done via drinking water, eye-drop and naso-drop. And control non-vaccinated group. The measurement of vaccinal derived antibodies titer in 5, 10 days post-1<sup>st</sup>. and 2<sup>nd</sup>. Vaccination shows a significant variation at ( $P<0.05$ ) between control and both treatment groups at 10 days post - 2<sup>nd</sup>. Vaccination (30 days old), in addition the antibodies titers were non-significant at ( $P<0.05$ ) between treatment groups themselves, while it was higher in T1 group than in T2 group. The pathological lesions were as follow: Trachea showed epithelial sloughing and blood vessels congestion in T2 group. The spleen, thymus and BF showed marked pathological changes in both treatment groups and were more sever in T2 group chicks than in T1 group chicks . The study revealed that IBA-vac of Fatro is more safety and secure to be use than CH/80 of Hipra.

**Keywords:** IBD, MDA, Vaccines, ELISA, Chicks

### الملخص باللغة العربية

أجريت هذه التجربة لغرض معرفة أي اللقاحات المستعملة ضد مرض التهاب غدة فابريشيا (كمبورو) أكثر أمانة و سلامة في محافظة السليمانية في إقليم كردستان- العراق. شملت عينة الدراسة 225 فرخة لحم بعمر يوم واحد من سلالة Ross 308. وتم فحص مستوى الأضداد للمناعة الأمية للأفراخ ضد مرض الكمبورو باستخدام اختبار إليزا. تم تقسيم الأفراخ إلى 3 مجاميع متساوية وبشكل عشوائي متساوي، فأما المجموعة الأولى فقد لقحت بلقاح (IBA-vac \ Fatro) الحي المتوسط، و المجموعة الثانية لقحت بلقاح CH/80 (Hipra) الحي المتوسط. وكلا المجموعتين تم تلقيحهما بواسطة ماء الشرب وقطرة العين وقطرة الأنف، ومثلت المجموعة الثالثة مجموعة سيطرة (غير ملقحة). تم استخدام اختبار الإليزا لقياس معيار الأضداد ضد مرض الكمبورو للمجموعات الثلاثة في اليومين الخامس والعاشر بعد التلقيح الأول والثاني. ثم أخذت نماذج نسيجية من كل من القصبة الهوائية، الطحال، غدة التوتة، وغدة فابريشيا لغرض الفحص النسيجي لمعرفة التغيرات النسيجية الخمجية الناتجة عن اللقاح. بين فحص مستوى الأضداد في اليوم العاشر بعد التلقيح الثاني بعمر 30 يوما أن هناك فرقا معنويا في معدل معيار الأضداد ضد مرض الكمبورو بين مجموعة السيطرة ومجموعتي المعالجة، في حين لم يتم تسجيل أي فرق معنوي بين مجموعتي المعالجة، رغم ارتفاع معدل الأضداد في مجموعة المعالجة الأولى عنه في مجموعة المعالجة الثانية. أظهر الفحص النسيجي وجود استجابة فاعلة للخلايا للمفاوية في مجموعتي المعالجة مقارنة مع مجموعة السيطرة، وكذلك انسلاخا في الخلايا الظهارية لبطانة القصبة الهوائية واحتقان أو عتيها الدموية في أفراخ مجموعة المعالجة الأولى، كما كان هناك آفات مرضية خمجية أخرى في الطحال وغدة التوتة وغدة فابريشيا لكلا مجموعتي المعالجة، وكانت أشد في أفراخ المجموعة الثانية. وبهذا، تستنتج الدراسة أن استخدام لقاح IBA- Fatro يعتبر أكثر أمانا وسلامة من استخدام لقاح CH/80 (Hipra).

## INTRODUCTION

Infectious bursal disease (IBD) (Gumboro disease) is a highly acute contagious viral disease of chickens characterized by severe immunosuppression resulting in great bursal damage (1). Chickens between 3 and 6 weeks of age are most susceptible to IBD virus (2). The economic importance of this disease is manifested in 2 ways. First, some virus strains may cause up to 60 % mortality in chickens 3 weeks of age and older. The second, and more important, manifestation is a severe, prolonged immunosuppression of chickens infected at an early age (3).

Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) belongs to the family Birnaviridae. Genus Avibirnavirus has a bisegmented double-stranded RNA (dsRNA) genome (4). There are two serotypes of IBDV: serotype 1 and 2. Pathogenic serotype 1 IBDV field strains can be grouped into classical virulent (cv) strains, antigenic variant strains and very virulent (vv) strains (6). IBD follows one of two courses, depending on the age at which chickens are infected, the subclinical form of the disease occurs in chickens less than 3 weeks of age. Chickens present no clinical signs but grossly characterized by bursal atrophy, resulting in severe immunosuppression (7). The clinical form of IBD affects chicks between 3 and 6 weeks of age. It is characterized by ruffled feathers, whitish or watery diarrhea, anorexia, depression, trembling, severe prostration and finally death. The target organ of the virus is the lymphoid tissue, specially the bursa of fabricius that has a gelatinous yellowish transudate covering the serosal surface (8). The disease is highly contagious, affects young chickens, and is characterized by the destruction of the lymphoid organs, and in particular the bursa of fabricius, where B lymphocytes mature and differentiate. The target cell of the virus is the B lymphocyte in an immature stage, and the infection, when not fatal, causes an immunosuppression, in most cases temporary, the degree of which is often difficult to determine. Out breaks of IBD virus (IBDV) cause devastating losses in both broiler and layer flocks (2,3). Depending on the vaccines ability to induce immunity in the presence of maternal antibodies and their residual pathogenicity, these vaccines have been classified as "intermediate", "intermediate plus" or "hot" types. At the moment, the first two types are the most used all over the world, whereas the last is currently banned in many countries (5). Attempt to prevent IBDV infection is based mainly on using of vaccines parallel with application of strict biosecurity measures in the farm. Intermediate live IBDV vaccines are effective in stimulation of active immune response even in the presence of high maternal antibody titers (4). In spite of intensive application of different types of IBDV vaccines, IBD is still considered as a major production problem affecting poultry farms. The main problem encountered in the choice of the

proper time for vaccination is that maternal antibodies interfere with replication of vaccinal virus in lymphoid tissues. Although the parents are boosted with inactivated vaccine, the maternal antibodies provide a good level of protection only for the first 3 or, sometimes, 4 weeks, then the birds become fully susceptible (5).

The objective of the present study was to investigate the post-vaccinal pathological changes of different vaccines strains and routes against Infectious bursal Disease virus (IBD) to be sure of the most safety one to be used in some poultry farms in Sulaimani province, Kurdistan region/ Iraq.

## MATERIALS AND METHODS

### Vaccines

Commercial vials of live attenuated cloned intermediate IBD strain vaccines (CH/80) (freeze-dried tablet, 1000 doses) were bought from Regional Agency of HIPRA company (Spain), and from FATRO company (Italy) of live attenuated intermediate IBD strain vaccines (IBA-VAC) (freeze-dried tablet, 1000 doses).

### Experimental Design

A total of 225 one-day old broiler chicks of Ross 308 breed were received from Lao-Lao hatchery/ Sulaimani / Kurdistan region /Iraq. The chicks were reared for 42 days on floor under similar healthy environmental circumstances. The feed was formulated as balanced ration according to National Research Center (NRC) recommendations (9). The chicks were randomly divided into 3 groups (C=control group, T1=first treatment group and T2=second treatment group) each of 75 chicks. The chicks in each group were further divided into 3 sub groups of 25 chicks. Chicks of control group (C group) were kept unvaccinated, whereas chicks of treatment group T1 and chicks of treatment group T2 were vaccinated on 9, 20 days old as follows:

1- Chicks of treatment group T1 were vaccinated with 0.1ml /chick (one vaccine dose) of IBA-VAC intermediate strain via drinking water, eye-drop and naso-drop.

2- Chicks of treatment group T2 were vaccinated with 0.1ml /chick (one vaccine dose) of CH/80 intermediate strain via drinking water, eye-drop and naso-drop.

### Serological examinations

Blood samples were collected for measurement of Maternal-Derived Antibodies (MDA) by indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (10) on 1<sup>st</sup> day old of chick's age (prior to vaccination). Other blood samples were collected for measurement of Vaccine Derived Antibodies on days 5, 10 post first and second vaccinations.

### Histopathological examinations

Tissue samples (Trachea, spleen, thymus and bursa of fabricius) were obtained from chicks of all groups for histopathological examination on days 5 post first vaccination. In addition, tissue samples were obtained on days 5 post second vaccination. The obtained samples were processed for routine histotechnique and staining according to Luna (11).

### Statistical analysis

The data were collected and processed using Statistical Analysis System (SAS.1988) (12).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Maternal and vaccinal – derived antibodies titers

The measurement of maternal-derived antibodies (MDA) (as indicated by ELISA test) showed a marked decline of antibodies on day 7 of chicks age (table 1). This result was in agreement with those of (13, 14), who reported that the progeny antibodies persist up to 4 weeks of age and that their protection limit expired by second week and also explain the individual variation of the chicks response to the vaccines. The reason for such rapid decline at this period of age could be attributed to the proteolytic degradation of antibodies or neutralization because of naturally occurring of IBDv challenge and this was in agreement with those results of (15) who proved that the MDA is of benefit to IBDv infection in chickens at the age of 1- 4 weeks. On the other hand, the measurement of vaccinal derived antibodies titers showed a significant variation ( $P < 0.05$ ) between treatment groups and control group at 10 days post second vaccination (30 days of age). In addition, the antibodies titer was non significantly ( $P < 0.05$ ) between treatment groups themselves, while it is higher in treatment group T1 than in treatment group T2 (table 2), which could be explained by the lower degree of attenuation of this kind of vaccines. These present results were in agreement with (16, 17), who revealed that a protective humeral immune response was induced in both treatment groups vaccinated with IBDv strains in comparison with the control group. This non-significant variation might be due to dose and route of vaccination which play a role in induce immunity and antibodies titers refers to efficacy of immunization is closely related to the type of vaccines had used (18, 19).

**Table (1): Means of maternal- derived antibody titer (MDA) against IBD virus in experimental chicks as measured by ELISA test**

Age / days	Means $\pm$ SE of maternal-derived antibody titer
1 day	10453 $\pm$ 963.12
7 day	3627 $\pm$ 423.17

**Table (2): Means of antibody titer against IBD virus on 10 days post second vaccination (at day 30 of chicks age) as measured by ELISA test in chicks of all groups**

Groups	Means $\pm$ SE of antibody titer
Control	260.33 $\pm$ 825.83 b
T1	8621.56 $\pm$ 825.83 a
T2	6898.83 $\pm$ 825.83 a

*within a raw, the titers of antibodies that do not have common small letters superscripts vary from each other at ( $P > 0.05$ )*

### Histopathological findings

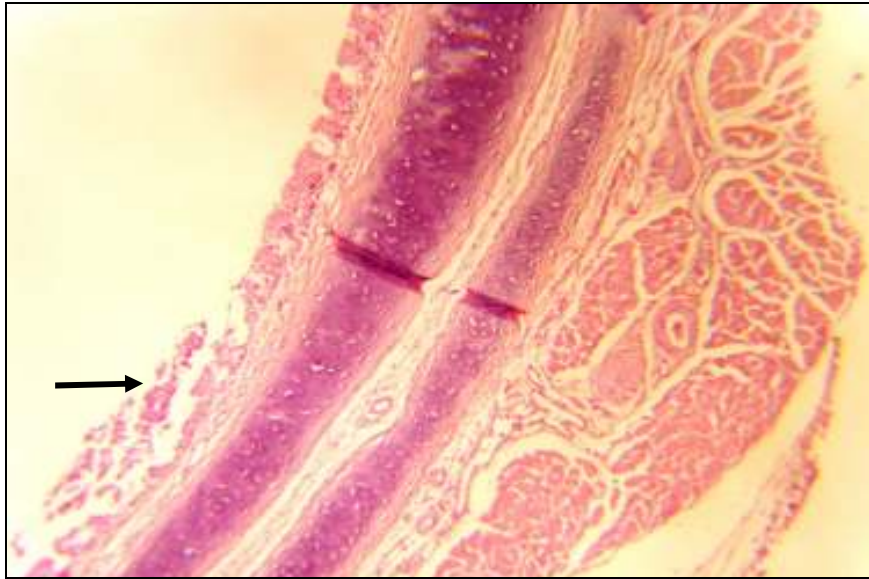
Tissue biopsies were obtained for histopathological examination for trachea, spleen, thymus and bursa of fab. For all groups on day 5 post 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> vaccination.

The results showed that the lesions were more sever in treatment group T2 than in treatment group T1. The lesions in T2 group were as follow; Trachea showed epithelial sloughing (Figure 1). Spleen showed follicular lymphoid hyperplasia in white pulp (Figure 2) and marked blood vessels congestion in the red pulp (Figure 3). Bursa of fabricious showed marked increase in number of lymphatic follicles (follicular lymphoid hyperplasia) in which the germinal centers stand out distinctly (Figure 4). Thymus showed marked cortical lymphoid hyperplasia and lack of differentiation between the peripheral and deep cortical lymphocytes (Figure 5).

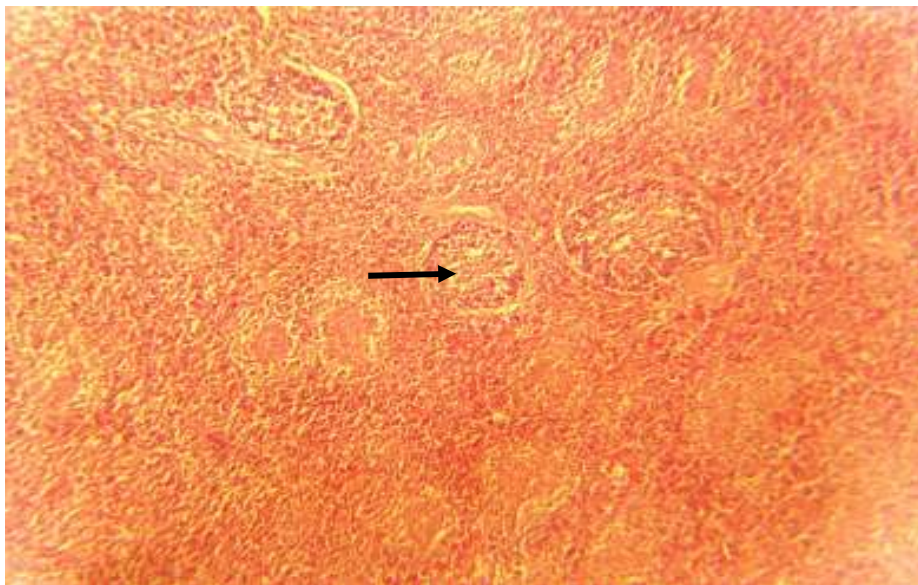
The lesions in treatment group T1 were as follows: spleen showed lymphoid hyperplasia and blood vessel congestion (Figure 6). Thymus showed marked cortical lymphoid hyperplasia, and bursa of fabricious showed marked increase in number of lymphatic follicles (follicular lymphoid hyperplasia) (Figure 7).

These lesions may be as result of most of the IBDv live vaccines, which showed variable degree of pathogenicity and immunosuppressive effect (20), as well as histopathological changes induced by vaccine virus in the various lymphoid organs are very different, depending on the virulence of vaccine strain (21).

The histopathological changes in spleen and thymus gland results was in agreement with that of (26), who mentioned that the histological examination of spleen, thymus and BF revealed that all types of vaccines induced different degree of alteration in these organs and this were previously mentioned by (23, 25), who mentioned that IBD vaccines induced pathological lesions in lymphoid organs of chickens vaccinated with intermediate vaccines.

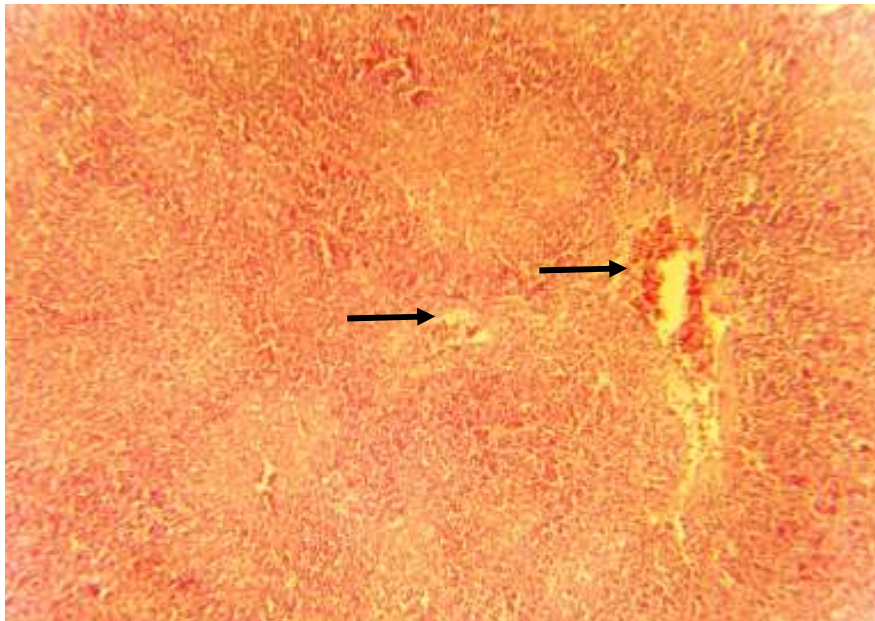


**Figure (1):** Microscopic tracheal section taken from one of treatment group T2 chicks (5 days post second vaccination). It shows focal epithelial sloughing (black arrow). H and E, X 100

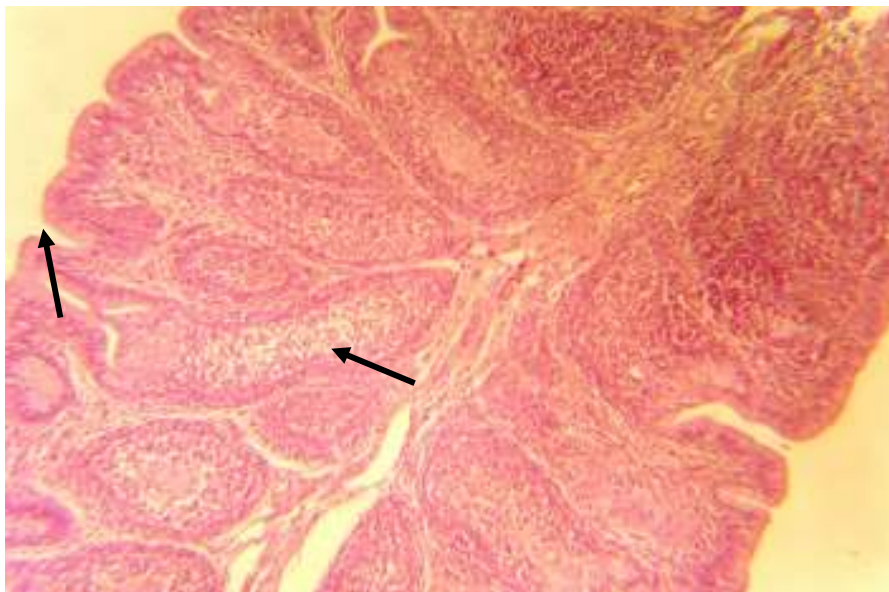


**Figure (2):** Microscopic view of a spleen taken from one of treatment group T2 chicks (5 days post second vaccination). It shows follicular lymphoid hyperplasia in the white pulp (black arrow). H and E, X 100

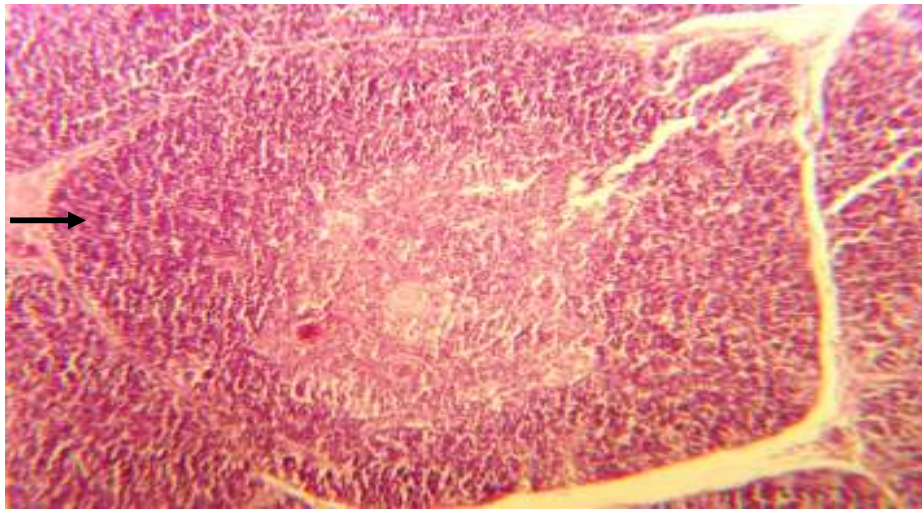




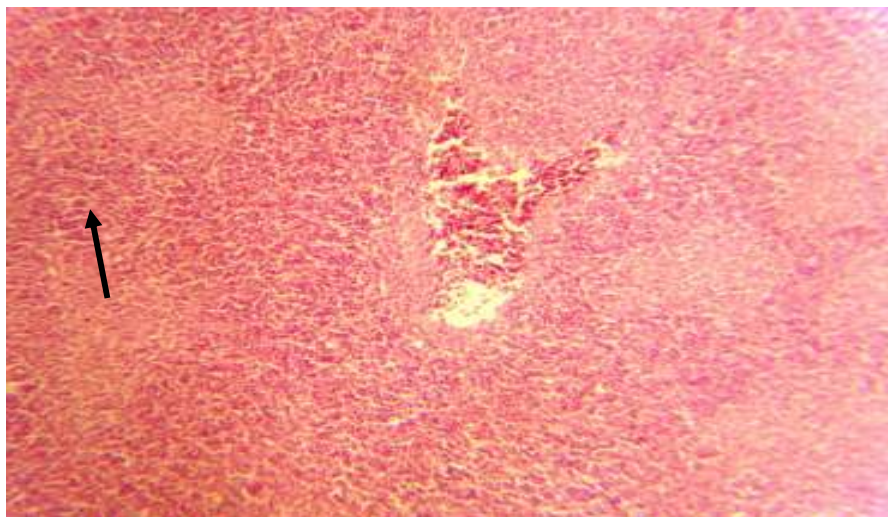
**Figure (3):** Microscopic view of a spleen taken from one of treatment group T2 chicks (5 days post second vaccination). It shows marked blood vessels congestion in the red pulp (black arrow). H and E, X 100



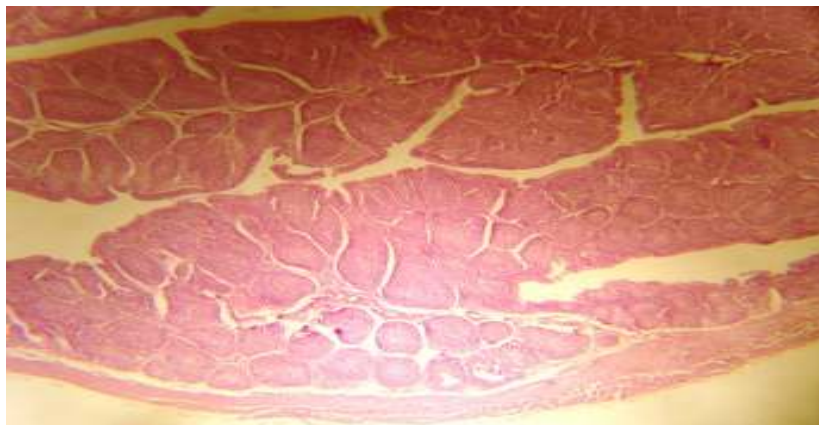
**Figure (4):** Microscopic view of a bursal section taken from one of treatment group T2 chicks (5 days post second vaccination). It exhibits marked increase in number of lymphatic follicles (follicular lymphoid hyperplasia) in which the germinal centers stand out distinctly (black arrow). H and E, X 200



**Figure (5):** Microscopic view of a thymal section taken from one of treatment group T2 chicks (5 days post second vaccination). It exhibits marked cortical lymphoid hyperplasia (black arrow). H and E, X 200



**Figure (6):** Microscopic view of a spleen taken from one of treatment group T1 chicks (5 days post second vaccination). It shows lymphoid hyperplasia (black arrow) and blood vessel congestion . H and E, X 200



**Figure (7):** Microscopic view of a bursal section taken from one of treatment group T1 chicks (5 days post second vaccination). It exhibits marked increase in number of lymphatic follicles (follicular lymphoid hyperplasia). H and E, X 100



The histopathological changes which were observed in the BF in the present study were in agreement with (8), who explained that the attenuated vaccines virus was capable to destroy B-Lymphocytes present in BF leading to reduction in their size and with (22) who reported that intermediate strains of IBDv vaccines were sufficient to induce a significant reduction in Bursal index. And in agreement with (23) who observed that chickens vaccinated with intermediate vaccine at 14 days of age showed more sever lesions such as hyperemia, dilatation of blood vessels and secondary follicular proliferation in BF 3 days post-vaccination, and in agreement with (26), who revealed that the pathological changes in vaccinated groups of chicks showed mild and moderate lesions that were appeared in liver, spleen and BF.

## REFERENCES

1. Lukert PD. and Saif YM. (2003). Infectious bursal disease. In: Saif YM. (Ed.). Disease of poultry 11<sup>th</sup> ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Pp:161- 180.
2. Kenton K. (2008). Infectious bursal disease IBD or Gumboro. Hy-Line Int. Dallas Center, Iowa.
3. Eterradosi N. and Saif YM. (2013). Infectious bursal disease 13<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing Ltd., pp:219-246.
4. Da Casta B. *et al.* (2003). Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J. Virol.* 77: 719- 725.
5. Zanella N. (2007). Infectious bursal disease. Poultry disease manual. Characteristics and control of infections. Italy. pp: 28-31.
6. Jackwood DJ.; Saif YM. and Hughes JH. (1982). Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease in turkeys. *Avian Dis.* 26: 871-882.
7. Butcher GD. and Miles RD. (2003). Infectious bursal disease (Gumboro) in commercial broilers. Institute of Food and Agriculture Science IFAS Extension: VM84.
8. Nishizawa M.; Paulillo AC.; Bernardino A.; Alessi AC.; Sayd S.; Okada LSN. and Doretto JL. (2007). Evaluation of anatomo-pathological, serological, immunological responses and protection in broilers vaccinated with live infectious bursal disease vaccines. *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo.* 74: 219-226.
9. National Research Council (NRC). (1994). Nutrients requirements of poultry. 9<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washington D.C. P:44.
10. Marquardt W.; Jonson RB.; Odenwald WF. and Scholothober BA. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian. Dis.* 24:375-385.
11. Luna LG.(1988). Manual of histology staining methods of the armed forces. Institute of Pathology. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Mac Graw-Hill Book Company. Pp:38-76 and 222-223.
12. SAS. (1988). Statistical analysis system, Users Guide: Statistics (Version 7). Cary, NC., USA.
13. Ahmed Z. and Akhter S. (2003). Role of maternal antibodies in protection against bursal disease in commercial broiler. *Int. J. Poult. Sci.* 2: 251-255.
14. Cardose WM.; Aguiar JLC. and Romao JM. (2006). Interference of infectious bursal disease virus on antibodies production against newcastle disease and infectious bronchitis virus. *Brazil. J. Poult. Sci.* 8(3):177-182.
15. Al-Natour MQ.; Ward LA.; Brown BS. and Keck LD. (2004). Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against IBDv. *Avian. Dis.* 48 (1):177-182.
16. Marangons L. and Bursani L. (2006). The use of vaccination in poultry production. *Rev. Sci. Tech. Int-Epiz.* 26(1):265-274.
17. Bermdez AJ. and Stewart BB.(2002). Disease prevention and diagnosis. In: Disease of poultry. Saif YM. 11<sup>th</sup>ed. Iowa State University Press, Ames. Pp.:17-54.
18. Muhammad K.; Rabb F. and Hussain I. (2001). Passive immunization against IBD in chicks. *Int. J. Agri. Biol. Zool.* 3(4):413-415.
19. Hedyati A.; Nili H. and Bahonar A. (2005). Comparison of four commercial IBD live vaccines. *Arch. Razi. Ins.* 59:65-73.
20. Hussain I.; Ahmed AN.; Ashfaq M.; Mohmood MS. and Akhtar M. (2001). Pathogenic properties of IBD vaccines. *Pakist. Vet. J.* 23(4):192-197.
21. Rus V.; Miclaus V. and Spinu M. (2010). Microscopic evaluation of central and peripheral lymphoid organs in vaccinated with mesogene strain live infectious bursal disease. *Annal. RSCB.* XIV(2):135-139.
22. Amer MM.; EL-Bayomi KM.; Kotkat M AA.; Wafaa A.; Shkal MA. and Sherein SA. (2007). The efficacy of live IBD vaccines in commercial 10 days old chicks. Proceeding of the 5<sup>th</sup> Scientific conference. Faculty of Veterinary Medicine. Beni-Suef. Egypt. Pp.: 23-33.
23. Al-Sereah B. (2007). Study the effect of revaccination against IBD on immune response and histological changes of BF of broiler chicks. Master thesis. College of Veterinary Medicine. Basrah University. Iraq. P:51.
24. Mona MA. (2002). Studies on epidemiology and vaccination for prevention of Gumboro disease in chickens. PhD. Thesis Faculty of Veterinary Medicine. Cairo University.
25. Al-Mayah A. and Al-Mayah S. (2013). Comparison of pathogenicity of Four Commercial IBD intermediate live vaccines in broiler. *MRVSA.* 2(2):16-27.
26. Al-Zubeedy AZ.; Shamaun AA. and Al-Aalim AM. (2013). Histopathological and immune response against infectious bursal disease in chickens vaccinated against newcastle disease. *Al-Qadisiya J. Vet. Med. Sci.* 12(1): 66-70.

قسم الدراسات والبحوث العربية

***ARABIC STUDIES AND RESEARCHES  
SECTION***

## تعيين قابلية البكتيريا المعزولة من الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية للمياه المعبأة على تكوين الغشاء الحيوي

أمير خضير عباس، سهيلة غفوري علي، لبنى ايداد اسماعيل، فرقد فرحان عبد الحميد، سارة خطاب اسماعيل  
وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد/ جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: amirkheuhdeyer@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص البكتيريا من الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية للمياه المعبأة بسعة 20 لترا . تم جمع 35 منتجاً من المياه المعبأة بصورة عشوائية من الأسواق المحلية لمدينة بغداد. تم اختبار قابلية 86 عزلة من البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي هي *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sporosarcina* spp. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* . ولتعيين قابلية البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي تم استخدام طريقة أطباق الزرع النسيجي (TCPM) وتissue Culture Plate Method (TCPM) وطريقة وسط Congo Red Medium Method (CRM). أظهرت نتائج التعيين أن 32 عزلة (37.2%) كانت موجبة باستخدام طريقة (TCPM) ، في حين أظهرت 21 عزلة (24.4%) نتائج موجبة بطريقة وسط الكونغو الأحمر (CRM). لذا فإن طريقة (TCPM) تعتبر الطريقة المناسبة في تعيين قدرة البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي.

**الكلمات المفتاحية:** مياه معبأة ، الغشاء الحيوي البكتيري ، تعيين الغشاء الحيوي ، أطباق الزرع النسيجي، وسط أحمر الكونكو

## Detection of the ability of bacteria isolated from inner surfaces of plastic bottled water containers to form biofilm

Amir Kh. Abbas, Suhala K. Ali, Lubna A. Ismail, Farqad F. Abdul Hameed and Sarah K. Ismail

Ministry of Sciences and Technology / Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The present study aimed to isolate and identify the bacteria from internal surfaces of reused bottled water plastic containers (20 liters capacity). Thirty-five (35) samples of reused bottled water containers were collected randomly from local markets of Baghdad city.

The present study was done to detect biofilm formation in 86 bacterial isolates of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sporosarcina* spp. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* for detection of biofilm formation. The isolates were screened by Tissue Culture Plate Method (TCPM) and Congo Red Medium Method (CRM). The results showed that from 86 bacterial isolates, 32 (37.2%) were positive by TCPM, while 21 (24.4%) were positive by CRM.

It can be concluded that the TCPM was an accurate method for detection of bacterial biofilm.

## المقدمة

تنظيف وتعقيم هذه العبوات في غالبية المعامل، مع ضعف الرقابة الصحية، لذا فإن العبوات البلاستيكية أصبحت أحد مصادر تلوث المياه المعبأة المنتجة والتي باتت تشكل مصدر خطورة على صحة المستهلكين.

من أجل ذلك، هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص البكتيريا من السطوح الداخلية للعبوات البلاستيكية المتكررة الاستخدام سعة 20 لتر واختبار قابلية البكتيريا المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام طريقتين هما : طريقة أطباق الزرع النسيجي (Tissue culture plate method) وطريقة وسط أكار الكونغو الأحمر (Congo red medium method).

## المواد وطرق العمل

## النمذجة

تم سحب (35) منتجاً من المياه المعبأة في العبوات البلاستيكية المتكررة الاستخدام سعة 20 لتر بصورة عشوائية من الأسواق المحلية لمدينة بغداد خلال الفترة من شهر تشرين الأول/ أكتوبر عام 2014 ولغاية شهر نيسان/ إبريل عام 2015.

## التحري عن بكتيريا دلائل التلوث الميكروبي

تم التحري عن بكتيريا دلائل التلوث الميكروبي للمياه المعبأة والتي شملت البكتيريا الهوائية، البكتيريا القولونية، البكتيريا المسببة، وبكتيريا الكلوستريديوم بريفرنجز والسيدوموناس ايروجينوزا بحسب طريقة (11).

## عزل وتشخيص البكتيريا من الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية

تم التخلص من المياه المعبأة المتواجدة في العبوة وتحت ظروف معقمة في كابينة الزرع وأخذت مسحة للأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية، وتم زرعها على الأساط الزرعية المختارة للتجربة والمتمثلة بوسط أكار الدم، وسط المكونكي، وسط المانيتول، ووسط بكتيريا السيدوموناس. وتم تشخيص أنواع البكتيريا المعزولة بالاعتماد على الطرق المجهرية والزرعية والاختبارات البيوكيميائية الملائمة بحسب طريقة (12).

## اختبار تكوين العزلات البكتيرية للغشاء الحيوي

1. طريقة أطباق الزرع النسيجي Tissue culture plate (TCPM) method: تم حقن ما مقداره 10 مليلتر من وسط Trypticase soy broth الذي يحتوي على 1 % جلوكوز من البكتيريا المراد اختبارها والتي تم تنميتها على وسط الأكار المغذي (Nutrient agar) لمدة 24 ساعة. تم حضن الوسط السائل بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة، بعد ذلك تم تخفيف المزروع البكتيري 1:100 باستخدام نفس الوسط الزرعي، ثم تم نقل 0.2 مليلتر من المزروع المخفف إلى كل حفرة من TCP، وتم عمل ثلاث مكررات لكل بكتيريا، وتم إضافة الوسط السائل المعقم أيضاً (Blank) واستخدمت بكتيريا *Bacillus amyloliqueifaciens* المنتجة للغشاء الحيوي، وبكتيريا *Bacillus subtilis py79* غير المنتجة للغشاء الحيوي كضابط سيطرة موجب وسالب لإنتاج الغشاء الحيوي. بعد ذلك، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة، وتم التخلص من الوسط السائل في الطبق وغسله ثلاث مرات بمحلول دارى الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 للتخلص من البكتيريا غير المتلصقة، وجففت الأطباق في الهواء، ثم صبغت الحفر بإضافة صبغة الكرسنال البنفسجي بتركيز 0.1 %، ثم غسلت الحفر بالماء المقطر المعقم وجففت. ولتعيين قدرة البكتيريا على إنتاج الغشاء الحيوي نوعياً تم استخلاص الصبغة المتلصقة بالحفر بإضافة 0.2 مليلتر من الإيثانول بتركيز 95 %، ثم قيست الامتصاصية عند الطول الموجي 600 نانومتر بحسب طريقة (13)، وباستخدام Elisa microplate reader (BioTek-USA).

يتكون الغشاء الحيوي (Biofilm) غالباً على أي سطح من الأسطح الحية أو غير الحية (Biotic and Abiotic) عند توفر المتطلبات الغذائية، ويحدث بصورة أسهل عندما يكون سطح الالتصاق خشناً، ويحتوي على الخدوش والشقوق والصدأ. وتؤثر العوامل الفيزيائية مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والقسطية والشحنة الكهربائية للأسطح على عملية الالتصاق، فالأحياء المجهرية تلتصق بسرعة على الأسطح غير المحبة للماء (Hydrophobic) وغير القسطية (Non polar) مثل التفلون (Teflon) والعبوات البلاستيكية أكبر وأسرع من الأسطح المحبة للماء (Hydrophilic) مثل (Stainless steel) (1).

هناك أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي، ومنها البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام، الخمائر، الابدائيات والفطريات، لكن لبعضها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي بسهولة أكثر من غيرها بسبب احتوائها على تراكيب تساعد على الالتصاق مثل *Fimbriae, Pili or Flagella*. ومن الممكن أن يتكون الغشاء الحيوي من نوع واحد من الأحياء المجهرية، ولكن بصورة شائعة يتكون من مجموعة من المجتمعات البكتيرية، وتتواصل البكتيريا مع بعضها في الغشاء الحيوي بواسطة إشارات عبارة عن جزيئات عضوية ذائبة (Diffusible organic signal molecules)، التي تنظم التعبير الجيني (Gene expression) من خلال ما يعرف بظاهرة الإحساس بالازدحام (Quorum sensing)، إذ يتم التعاون بين الخلايا المكونة للغشاء الحيوي بخصوص دخول الماء والمواد المغذية إلى كل خلية بكتيرية، والتخلص من نواتج الأيض، مما يزيد من مستوى الحماية، لذا فإن البكتيريا تقاوم الظروف البيئية القاسية (2).

يلعب الغشاء الحيوي دوراً مهماً في تحديد نوعية مياه الشرب، سواء المنتجة في شبكات الإمداد أو المياه المعبأة المنتجة في العبوات البلاستيكية، إذ يعمل الغشاء الحيوي على إزالة مفعول بقايا الكلور في مياه الشرب، إضافة إلى تسببه في إحداث مشاكل تتعلق بلون وطعم ورائحة مياه الشرب، والأهم من ذلك، أنه يشكل تهديداً كبيراً على صحة الإنسان كونه مصدراً للبكتيريا المرضية والمنتجة للسموم والفيروسات والابدائيات والفطريات، فقد تم دراسة العديد من أنواع البكتيريا التي لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي. ويمكن أن تؤثر على صحة الإنسان مثل *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, Enterobacter cloacae, E. agglomerans, Helicobacter pylori, Campylobacter spp., Shigella spp., Salmonella spp., Clostridium perfringens, Enterococcus faecalis, E. faecium, Legionella pneumophila, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, Aeromonas hydrophila, A. caviae* and *Mycobacterium avium* (3).

من الناحية الطبية، تعد الأغشية الحيوية مجتمعات بكتيرية مرتبطة بالأسطح، وتتواجد داخل قوالب من البوليمرات الخارج خلوية تبدي أنماطاً مظهرية متغيرة للنمو، والتعبير الجيني وإنتاج البروتين، وتسبب في إحداث عواقب طبية (4)، إذ يساعد الغشاء الحيوي البكتيري في البقاء حياً في الظروف القاسية داخل المضيف. وتشير الدراسات الوبائية إلى أن بكتيريا الغشاء الحيوي تكون مسؤولة عن أكثر من 60% من الأمراض المزمنة والمستعصية في الإنسان (5). ومن هذه الأمراض: التهاب شغاف القلب، التليف الكيسي، التهاب الأذن الوسطى، التهاب اللثة وتسوس الأسنان، والإصابات المتعلقة بالأدوات الطبية، كقسطرة القلب والإحليل (6، 7)، إذ تبدي البكتيريا في الأغشية الحيوية درجة عالية من المقاومة (أكثر من 1000 ضعف) للعوامل المضادة للجراثيم وجهاز مناعة المضيف (8). تجدر الإشارة إلى أن أكثر من 20 % من جينات البكتيريا في الغشاء الحيوي يتم التعبير عنها بصور مختلفة، مما ينتج عنه حماية أكبر ضد الخلايا البلعمية (Macrophage)، كما أن فعالية البكتيريا الأيضية تكون بطيئة، وتنتج مركبات ضمن الغشاء الحيوي تعادل تأثير المضادات الحيوية (9، 10).

وقد تزايد في العقود الأخيرة الإقبال على استهلاك المياه المعبأة في العبوات البلاستيكية المتكررة الاستخدام سعة 20 لتر بسبب شح مياه الشرب، أو تغيير بعض خصائصه وطعمه، مع ضعف ثقة المستهلك في مدى صلاحية مياه الشرب المنتجة في محطات الإمداد، خاصة في فصل الصيف. وبالنظر لإعادة استخدام العبوات البلاستيكية سعة 20 لتر من قبل المعامل المنتجة للمياه المعبأة، وغياب أجهزة

البلاستيكية وجود 86 عزلة من أنواع مختلفة من البكتيريا هي  
: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus spp.* و  
*Pseudomonas aeruginosa* (جدول رقم 2).

جدول رقم (2): العزلات البكتيرية من الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية

لون الصبغة المنتجة	عدد العزلات البكتيرية	نوع البكتيريا
ذهبية	8	<i>Staphylococcus aureus</i>
بيضاء	6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
صفراء، بيضاء، برتقالي	12	<i>Sporosarcinia spp.</i>
غير منتجة للصبغة	10	<i>Sporosarcinia spp.</i>
بيضاء، برتقالي	26	<i>Bacillus spp.</i>
غير منتجة للصبغة	16	<i>Bacillus spp.</i>
خضراء مزرق	8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

تميزت غالبية العزلات البكتيرية 60 عزلة (69.7%) بقابليتها على إنتاج الصبغات وبصورة خاصة بكتيريا *Bacillus spp.* و *Sporosarcinia spp.* ، وتراوحت ألوان الصبغات ما بين الصفراء والبرتقالية والبيضاء، ويعتبر إنتاج هذه الصبغات صفة دفاعية للبكتيريا لمقاومة الظروف البيئية القاسية (19). وتمتاز البكتيريا التي تنتمي إلى جنس *Sporosarcinia spp.* بالشكل العصوي أو الكروي قابليتها على تكوين Endospores . وتكون غالبية الأنواع متحركة ومنتجة للصبغات، وجميع أنواع البكتيريا Heterotrophic . بعض الأنواع يحتاج الأوكسجين بصورة إجبارية، في حين تكون اختيارية في البعض الآخر، فتستطيع النمو حتى في غياب الأوكسجين، وبعض أنواعها لها القدرة على إنتاج إنزيم Urease ، وتتواجد بصورة شائعة في التربة (20). أظهرت 64 عزلة من العزلات البكتيرية (74.4%) قدرتها على تكوين السبورات، والتي تساعد البكتيريا في مقاومة الظروف غير الملائمة للنمو، ومقاومة المواد المستخدمة في عملية التنظيف والتعقيم. أما بخصوص العزلات التي من الممكن أن تتسبب في إحداث حالات مرضية، فكانت 24 عزلة (27.9%) والمتمثلة بالبكتيريا العنقودية *Staphylococcus spp.* وبكتيريا *P. aeruginosa* والتي تشكل خطورة على صحة الإنسان، خاصة للأشخاص الذين يعانون ضعفا في الجهاز المناعي ونزلاء المستشفيات (21).

يوضح جدول رقم (3) نتائج اختبار الغشاء الحيوي باستخدام طريقة TCP، إذ أظهرت 32 عزلة من مجموع 86 (37.2%) نتيجة موجبة لإنتاج الغشاء الحيوي، وشملت 4 عزلات من بكتيريا *Staphylococcus aureus* و 4 عزلات من *Staphylococcus epidermidis* و 6 عزلات من *Sporosarcinia spp.* و 14 عزلة من *Bacillus spp.* و 4 عزلات من *P. aeruginosa* . وأظهرت 19 عزلة من العزلات قدرتها على إنتاج الغشاء الحيوي بدرجة قوية، و 14 عزلة بدرجة متوسطة. ويوضح شكل رقم (1) قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج الغشاء الحيوي. في حين بينت نتائج اختبار الغشاء الحيوي باستخدام طريقة CR أن 21 عزلة من مجموع 86 (24.4%) قد أظهرت نتيجة موجبة لإنتاج الغشاء الحيوي، شملت 3 عزلات من *Staphylococcus aureus* وعزلة من *Staphylococcus epidermidis* و 4 عزلات من *Sporosarcinia spp.* و 10 عزلات من *Bacillus spp.* و 3 عزلات من *P. aeruginosa* (جدول رقم 4). وأظهرت 9 عزلات قدرتها على إنتاج الغشاء الحيوي بدرجة قوية، و 12 عزلة بدرجة متوسطة أشكال رقم (4-2).

استخدمت القيم المبينة في جدول رقم (1) لتحديد قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج الغشاء الحيوي (14)، وحسب معدل قياس الامتصاصية للحفر، وطُرحت قيمة السيطرة السالبة من كل القراءات، وصنفت العزلات حسب الامتصاصية إلى موجبة (قوية)، متوسطة وسالبة لإنتاج الغشاء الحيوي.

جدول رقم (1): تحديد القدرة على الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي حسب الامتصاصية

معدل قيم الامتصاصية OD	القدرة على الالتصاق	تكوين الغشاء الحيوي
< 0.120	لا يحدث التصاق	لا يكون
0.120-0.240	متوسطة	متوسط
> 0.240	قوية	قوي

2. استخدام طريقة وسط أكار الكونغو الأحمر Congo red agar medium (CRAM) method : يتكون وسط CRA من أكار نقيع المخ والقلب Brain heart infusion agar (BHIA) 52 غرام، سكروروز 36 غرام و صبغة الكونغو الأحمر 0.8 غرام في لتر من الماء المقطر.

تم تحضير وسط BHIA لوحده وعقم بالمؤصدة وعقم السكر بالترشيح، أما صبغة CR فتم تعقيمها بالمؤصدة بوصفها محلولاً مائياً مركزاً، وبعد تبريد الوسط BHIA إلى 50 درجة مئوية، أضيف إليه السكر والصبغة (15).

وللتحري عن إنتاج الغشاء الحيوي لفحت العزلات البكتيرية على وسط CRA وبواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة وتركزت الاطباق لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة الغرفة، وتم تحديد النمط المظهري لإنتاج الغشاء الحيوي، وقسمت العزلات بحسب (6، 16) إلى:

1- عزلات منتجة للغشاء الحيوي بقوة Strong positive: تظهر بشكل مستعمرات سوداء او رمادية مائلة للاسوداد مع تآلق بلوري.

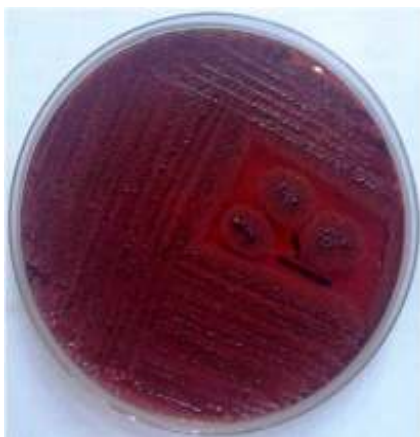
2- عزلات منتجة للغشاء الحيوي متوسطة Moderate: تكون المستعمرات بنية ذات اسوداد في مركز المستعمرة.

3- عزلات غير منتجة للفلم الحيوي Negative: تظهر بشكل مستعمرات حمراء أو وردية.

### النتائج والمناقشة

بينت نتائج التحري عن بكتيريا دلائل التلوث الميكروبي احتواء 14 منتج من مجموع 35 على أعداد من البكتيريا الهوائية تراوحت بين 600-3000 مستعمرة / مليلتر، وهي أعداد تفوق الحدود المسموح بها في المواصفة العراقية لمياه الشرب المعبأة (17)، كما أظهر منتوجان احتواءهما على عدد احتمالي من البكتيريا القولونية 9.2 / 100 مليلتر، في حين أظهر 12 منتجاً احتواءها على بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* ، وهي من أنواع البكتيريا غير المسموح بتواجدها في مياه الشرب المعبأة مطلقاً، كونها من البكتيريا الانتهازية المرضية (18)، وخلو النماذج من بكتيريا المسببة وبكتيريا الكلوسترديوم بريفرنجز.

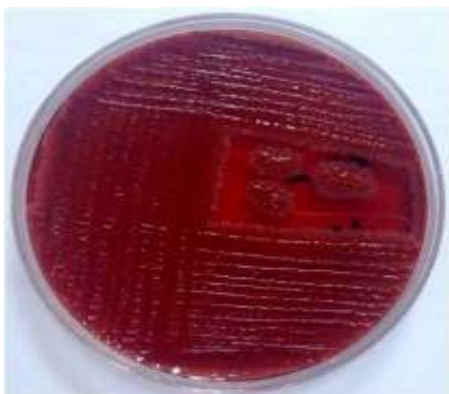
إن إعادة استخدام العبوات البلاستيكية سعة 20 لتر في الإنتاج له دور مهم في تلوث مياه الشرب المعبأة، بسبب غياب أجهزة تنظيف وتعقيم العبوات البلاستيكية في غالبية معامل إنتاج المياه المعبأة، مما يشكل خطورة على صحة المستهلك، إذ إن هذه العبوات خصصت للاستخدام لمرة واحدة فقط، كما أن هذه العبوات قد تستخدم لأغراض أخرى، وبالتالي يمكن أن تكون مصدر تلوث للمياه التي تعبأ بها. وقد بينت نتائج عزل البكتيريا من الأسطح الداخلية للعبوات



شكل رقم (2): بكتيريا مكونة للغشاء الحيوي بدرجة قوية على وسط CR



شكل رقم (3): بكتيريا مكونة للغشاء الحيوي بدرجة قوية على وسط CR



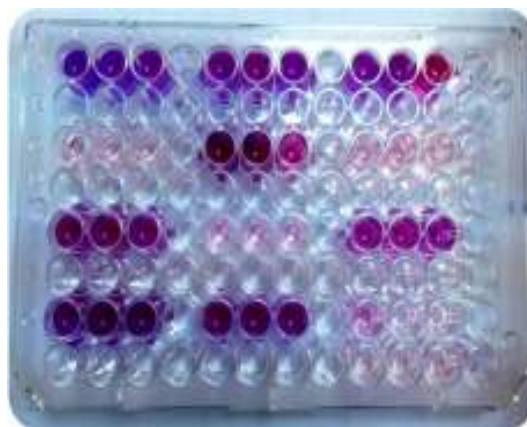
شكل رقم (4): بكتيريا غير منتجة للغشاء الحيوي على وسط CR

جدول رقم (3): قدرة البكتيريا المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام طريقة TCP

نوع البكتيريا	عدد العزلات المكونة للغشاء الحيوي	درجة تكوين الغشاء الحيوي
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	قوي (2) متوسط (2)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	قوي (1) متوسط (3)
<i>Sporosarcinia spp.</i>	6	قوي (4) متوسط (2)
<i>Bacillus spp.</i>	14	قوي (8) متوسط (6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	قوي (4)

جدول رقم (4): قدرة البكتيريا المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام طريقة CR

نوع البكتيريا	عدد العزلات المكونة للغشاء الحيوي	درجة تكوين الغشاء الحيوي
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	قوي (2) متوسط (1)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	متوسط (1)
<i>Sporosarcinia spp.</i>	4	قوي (2) متوسط (2)
<i>Bacillus spp.</i>	10	قوي (4) متوسط (6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	قوي (2) متوسط (1)



شكل رقم (1): اختبار قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج الغشاء الحيوي بطريقة TCP

3. Fewtrell L. and Bartram J. (2001). Water quality standards and health assessment of risk and risk management for water related infectious disease. IWA Publishing, London, UK.
4. Mariana NS.; Salman SA.; Neela V. and Zambari S. (2009). Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. Afr. J. Microbiol. Res. 3(6):330-338.
5. Svjetlana M. and Jasmina V. (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm formation. Period. Biol. 109(2): 29-33.
6. Kahan F.; Shukla I.; Rizvi M.; Mansoor T. and Sharma SC. (2011). Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections? Trend. Med. Res. Academic J. 6 (2):116-123.
7. Stone G.; Wood P.; Dixon L.; Keyhan M. and Matin A. (2002). Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogene *Escherichia coli* biofilms. Antim. Agent. Chemother. 46(8): 2458-2461.
8. Dadawala AL.; Chauhanm HC.; Chandelm BS.; Ranaware P.; Patel SS. *et. al.* (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for in vitro biofilm production. Vet. World. 3(8) : 364-366.
9. Hassan A. ; Usman J.; Kaleem F.; Omair M.; Khalid A. and Iqbal M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. Malays. J. Microbiol. 7(1):57-60.
10. Estrela AB. and Abraham WR. (2010). Combining biofilm-controlling compounds and antibiotics as a promising new way to control biofilm infections. Pharm. 3:1374-1393.
11. APHA AWWA, WEF. (2013). Standard methods for the examination of water and wastewaters. 22<sup>nd</sup> ed. American public Health Association. Washington DC.
12. Koneman EW.; Winn WC.; Allen SD.; Procop GW.; Schreckenberger PC.; Janda W M. and Woods GL. (2006). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins. U.S.A. pp.: 211-671.
13. Enas AS.; Ilham AB. and Mohammad AK. (2013). Quorum sensing and biofilm formation by bacterial isolates from hemodialysis patients. Res. Pharm. 3(2): 33-40.
14. Bose S.; Khodke K.; Basak S. and Mallick SK. (2009). Detection of biofilm producing *Staphylococci*: need of the hour. J. Clin. Dig. Res. 3:1915-1920.
15. Eftekhar F. and Dadaei T. (2011). Biofilm formation and detection of IcaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iran. J. Basic Med. Sci. 14(2):132-136.
16. Dag I. and Nurikraz OY. (2010). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical *Candida* isolates. Afr. J. Microbiol. Res. 4(24):2763-2768.
17. IQS/2270/2011. Microbiological limits of drinking water and edible ice. Iraq.
18. Qarah S. and Cunha AB. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* infection. E. Med. 12:1-10.

ويتبين من النتائج السابقة أن طريقة TCP كانت أكثر حساسية للكشف عن إنتاج الغشاء الحيوي مقارنة بطريقة CR ، وهذا يتفق مع الدراسة التي قام بها (22)، حيث بينت نتائجها أن طريقة TCP هي الأكثر حساسية من طريقة CR ، كما بينت دراسة (23) أن طريقة TCP تعد الأكثر حساسية وسهولة في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بين عزلات *E. coli* . وبصورة عامة، فإن الكشف عن الغشاء الحيوي يعتمد على عوامل عديدة مثل طريقة التحري المعتمدة، نوع الوسط المستخدم، وظروف التحضير . اتفقت أيضا نتائج الدراسة مع نتائج دراسة (14) الذي بين أن طريقة TCP وباستخدام الوسط الزرعي TSB المضاف إليه 1% جلوكوز كانت الأكثر دقة من طريقة CR في الكشف عن الغشاء الحيوي والقدرة على الالتصاق.

إن الاختلاف في درجة إنتاج الغشاء الحيوي تعزى إلى الاختلاف في إنتاج لاصقات متعددة السكريات (Polysaccharide (adhesion ، والذي يعكس التغيير في التنظيم الجيني. وتستخدم طريقة CR للتحري عن إنتاج الغشاء الحيوي لعزلات عديدة، كونها طريقة سهلة الاستخدام، وتعتمد على تعزيز إنتاج السكريات المتعددة الخارجية باستخدام وسط غني. ولكن يمكن اعتبار هذه الطريقة قليلة الحساسية والتخصص نتيجة الاختلافات التي قد تحدث في تكوين الصبغة السوداء للمستعمرات، وقد يؤثر الاختلاف في الوسط الزرعي المستخدم على نتائج هذه الطريقة (4، 24).

يعتمد الالتصاق بدرجة كبيرة على الظروف البيئية والتغيير في الوسط الزرعي (25)، إذ إن وسط TSB المخفف 1:100 وغير المخفف يكون أعلى إنتاجا للغشاء الحيوي مقارنة بالأسواط الأخرى مثل Luria broth . وإن تكوين الغشاء الحيوي بطريقة TCP يعتمد على العزلة البكتيرية والوسط الزرعي المستخدم (26) . وتعد طريقة TCP وسيلة مهمة في دراسة المراحل المبكرة في تكوين الغشاء الحيوي، لأنها تتبع ظروفًا ثابتة، ويمكن أن تكون فعالة في تحديد ودراسة العديد من العوامل الضرورية لتكوين الغشاء الحيوي مثل الأهداب، الأسواط، اللاصقات، الإنزيمات، وغيرها، بالإضافة إلى الجينات التي تلعب دورا مهما في إنتاج السكريات المتعددة الخارجية. كما أن هذه الطريقة يمكن أن تستخدم مع أنواع بكتيرية مختلفة، إذ تلتصق الجراثيم المختلفة على الجدران أو في قعر الحفر، في حين أن الجراثيم غير المتحركة تلتصق في قعر الحفر فقط (27).

إن عدم تنظيف وتعقيم الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية يشجع على نمو البكتيريا بأنواعها المختلفة ومن ثم تكوين الغشاء الحيوي. وهناك عوامل أخرى تساعد على تكوين الغشاء الحيوي مثل توفر المغذيات، درجة الحرارة، الرقم الهيدروجيني، نوع المواد المعقمة المستخدمة، ومقاومة البكتيريا للمعقمات. ويؤدي استخدام المعقمات إلى تكوين Biodegradable substances . هذه المواد يمكن أن تستخدم من قبل البكتيريا كمصدر للطاقة في تكوين الغشاء الحيوي على الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية، كما أن البكتيريا تكتسب مقاومة ضد المعقمات المستخدمة نتيجة انتقال الجينات المسؤولة عن المقاومة بين البكتيريا المكونة للغشاء الحيوي Horizontal gene transfer (28).

#### الاستنتاجات والتوصيات

- 1- تلوث الأسطح الداخلية للعبوات البلاستيكية سعة 20 لتر بأنواع مختلفة من البكتيريا المرضية وغير المرضية التي لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي.
- 2- توصي الدراسة بعدم استخدام العبوات البلاستيكية سعة 20 لتر في الإنتاج لأكثر من مرة واحدة.

#### المصادر

1. Donlan RM. (2002). Biofilm. Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8:881.
2. Tarver T. (2009). Biofilms: a threat to food safety. J. Food Technol. 63 (2):47.

19. Sun YA.; Tomomi H.; Hiroaki K.; Keiichi G. and Akira Y. (2007). *Sporosarcina saromensis* sp. Nov., an aerobic endospore-forming bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1868-1871.
20. Garrity GM. (2009). Bergey's manual of systematic bacteriology. Fimicutes. 3(11): 121-126.
21. Naze F.; Jouen E.; Randriamahazo RT.; Simac C.; Laurent P.; Bleriot A.; Chiroleu F.; Gagnevin L.; Pruvost O. and Michault A. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high resolution melting analysis of a variable number tandem repeat locus. J. Clin. Microbiol. 48 (9):3146- 3152.
22. Mathur IT.; Singhal S.; Khan S.; Upadhyayl DJ.; Fatma T. and Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. Indian J. Med. Microbiol. 24(1):25-29.
23. Samie A. and Nkgau TF. (2012). Biofilm production and antibiotic susceptibility profile of *Escherichia coli* isolates from HIV and AIDS patients in the Limpopo province. Afr. J. Biotechnol. 11(34): 8560-8570.
24. Murugan S.; Devi PU. and John PN. (2011). Antimicrobial susceptibility pattern of biofilm producing *Escherichia coli* of urinary tract infections. Curr. Res. Bacteriol. 4(2):73-80.
25. Wang X. (2008). Characterization of *Escherichia coli* colonizing the gastrointestinal tract and urinary tract catheters. Karolinsk Institute, Stockholm, Sweden. P. 58.
26. Patel J. and Sharma M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enteric* servovars to cabbage and lettuce leaves. Int. J. Food Microbiol. 139:41-47.
27. Otoole GA. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. J. Visual. Exp. 47 (2437):1-2.
28. Kokare CR.; Chakraborty S.; Khopade AN. and Mahadik KR. (2009). Biofilm: importance and applications. Indian J. Biotechnol. 8:159-168.



## تأثير عقار الليفيتراسيتام في بطانة الرحم في الفأر الأبيض

نهلة عبد الرضا البكري، فائزة جبار جودة

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد/ جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: fayzzabio@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

أجريت الدراسة الحالية بهدف التعرف على التأثيرات التي يحدثها عقار الليفيتراسيتام Levetiracetam في بطانة الرحم Endometrium في الفئران البيضاء، إذ جرعت الحيوانات بالعقار المذكور عن طريق أنبوب المعدة Stomach tube، وكان حجم الجرعة 0.1 مل، وقسمت الحيوانات المعاملة إلى ثلاث مجموعات، المجموعة الأولى جرعت بالعقار لمدة 14 يوماً، والمجموعة الثانية جرعت لمدة 30 يوماً، أما المجموعة الثالثة جرعت بالعقار لمدة 45 يوماً. وقد أجريت الاختبارات على المجموعة التجريبية ومقارنتها بمجموعة السيطرة. أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في الغدد الرحمية Endometrial gland لمجموعات الحيوانات المعاملة بالعقار لمدة 14، 30، 45 يوماً على التوالي، عند المقارنة بمجموعة السيطرة وللأيام نفسها. كما أظهرت النتائج فرقاً معنوياً في عدد الغدد الرحمية عند المقارنة بين المجموعات التجريبية الثلاثة على التوالي، وازداد معنوياً ( $P < 0.05$ ) عدد الأوعية الدموية Blood vessels للحيوانات المعاملة بالعقار 14، 30، 45 يوماً على التوالي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة وللأيام نفسها. كما وجد فرق معنوي عند المقارنة بين المجموعات التجريبية الثلاثة ولوحظت زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في ارتفاع الظهارة المخاطية Mucosa epithelium لبطانة الرحم، وسمك الصفحة الأصلية Lamina propria للمجموعات التجريبية الثلاثة وللأيام 14، 30، 45 يوماً عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة وللأيام نفسها، ووجد أيضاً فرق معنوي ( $P < 0.05$ ) عند مقارنة المجموعة الأولى بالمجموعتين الثانية والثالثة، في حين لم تظهر المجموعة الثانية فرقاً معنوياً ( $P < 0.05$ ) عند مقارنتها بالمجموعة الثالثة.

الكلمات المفتاحية: عقار الليفيتراسيتام، بطانة الرحم

## The effect of Levetiracetam drug on endometrium of adult albino mice

Nahla A. Al-Bakri and Faiza J. Juda

Dept. of Biology/ College of Education for Pure Sciences (Ibn- Al- Haitham) / University of Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The present study was conducted to determine the effect of levetiracetam drug on albino mice endometrium. The animals were treated via stomach tube with one dose 0.1 ml. Treated animals were divided into three groups. First group was treated with drug for (14) days, second group was treated with drug for (30) days, while the third group was treated with drug for (45) days. Examination of the treated three groups were done, as well as the comparison with control group.

Results showed significant decrease ( $P < 0.05$ ) in endometrial glands of treated animals with drug 14, 30 and 45 days when compared with control. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in endometrial gland were observed when compared between three experiment groups, and significant increase ( $P < 0.05$ ) of blood vessels of treated animals with drug 14, 30 and 45 days when compared with control. Results also revealed a significant difference among the three treated groups, and significant increase ( $P < 0.05$ ) of epithelial cells of endometrium and thickness of lamina propria of the three treated groups with drug 14, 30 and 45 days, when compared with control group, there were significant differences ( $P < 0.05$ ) when comparing first group with both second and third groups. However, the second group did not show significant different ( $P < 0.05$ ) when compared with the third group.

## المقدمة

تم نقل الفئران إلى البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة، في كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) في جامعة بغداد. وتم وضعها في أقفاص بعد أن تم تقسيمها إلى أربع مجموعات، ضمت كل مجموعة 10 فئران. تم ضبط وتنظيم درجة الحرارة والرطوبة، والجدول الزمني للضوء والظلام (12 ساعة)، ومصرفات الهواء لتبادل الهواء. كما تمت تغذية الحيوانات بالغذاء القياسي وماء الصنبور Tap water بصورة حرة طول فترة التجربة.

جرعت المجموعة الأولى بالعقار لمدة 14 يوماً، والمجموعة الثانية لمدة 30 يوماً، والمجموعة الثالثة لمدة 45 يوماً، في حين تمت معاملة المجموعة الرابعة بالماء المقطر لتكون مجموعة السيطرة.

تم فحص المسحات المهبلية للأنثى المستخدمة في هذه الدراسة ولدورتى شبق متعاقبتين للتأكد من سلامة الدورة الشبقية Estrous Cycle، عن طريق تحضير شرائح مجهرية وأخذ مسحة من بطانة المهبل بواسطة ناقل معدني Loop تم تعقيمه على لهب مصباح حتى الاحمرار، بعدها تم غمره في محلول فسلجي (NaCl 0.9%)، ثم وضعت المسحات على شرائح زجاجية نظيفة وتركت لتجف، ثم لونت بلون أزرق الميثيلين Stain Methylene blue لمدة ثلاث دقائق (12)، ثم غسلت الشرائح بماء الصنبور Tap Water وتركت لتجف، ثم جرى فحصها تحت المجهر الضوئي Light microscope بقوة تكبير (10×، 40×).

تم التضحية بالحيوانات بعد الانتهاء من المعاملة، ولكل مجموعة بطريقة الخلع الشوكي (Cervical dislocation)، وذلك بتثبيت رأس الحيوان وسحب الذيل باستعمال مقص حاد، ثم عمل شق طولي في المنطقة الوسطى أسفل البطن حتى عظم القص، ثم أزيلت الأحشاء، وتم استئصال الرحم Uterus.

حضرت الشرائح المجهرية وفق طريقة (13)، حيث تم تثبيت الرحم في محلول بوين (Bouin's solution) لمدة 24 ساعة. بعدها غسلت عدة مرات في محلول الإيثانول 70%. مرتت بعد ذلك العينات في سلسلة تصاعدي التركيز من الكحول الإيثيلي ابتداء من (70% - 100%) لمدة نصف ساعة لكل تركيز. بعدها وضعت في الزايلين لمدة 15 دقيقة، ثم وضعت العينات في خليط من الزايلين وشمع البرافين المنصهر بدرجة (58-56°C) بنسبة (1:1) لمدة 15 دقيقة في الفرن الحراري وبدرجة حرارة (60°C). بعدها تم تشريب العينات بوضعاها في الشمع المنصهر مرتين ولمدة ساعة في كل مرة، ثم تم صب العينات في قالب شمع، وتركت حتى يتصلب الشمع، بعدها قطعت النماذج بسمك 5 ميكرومتر وعملت مقاطع مستعرضة من الرحم بحسب طريقة (14). ثم ألصقت الأشرطة المتضمنة للمقاطع، وتم تلوين المقاطع بملون هيماتوكسيلين - إوسين eosin Hematoxylin.

تم حساب أعداد الغدد الرحمية وعدد الأوعية الدموية، وتم قياس سمك بطانة الرحم، وارتفاع الظهارة بواسطة برنامج تحليل الصور الرقمي Digital image analyzing soft wares (15)، حيث تم التقاط الصور الفوتوغرافية للعينات المنتخبة باستعمال مجهر تصوير مركب نوع MELST بكاميرا Canon في مختبر الأجنة المتقدم في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد.

تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام One Way ANOVA test عند مستوى دلالة إحصائية ( $P < 0.05$ ).

## النتائج

بينت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في عدد الغدد الرحمية Endometrial glands لمجموعات الحيوانات المعاملة بالعقار لمدة (14، 30، 45) يوماً على التوالي عند مقارنتها بمجموعة السيطرة. وعند المقارنة بين المجموعات التجريبية، أظهرت المجموعة الأولى فرقاً معنوياً ( $P < 0.05$ ) عند مقارنتها بالمجموعة الثالثة، في حين لم تظهر فرقاً معنوياً ( $P < 0.05$ ) عند مقارنتها بالمجموعة الثانية (جدول رقم 1).

عقار الليفيتراسيتام Levitiracetam هو عقار جديد للصرع، ويتم تسويقه في جميع أنحاء العالم منذ عام 2000، ويستخدم لمعالجة السيطرة على النوبات الصرعية. وقد تم تصنيعه في أوائل عقد الثمانينات من القرن الماضي، خلال برنامج كيميائي هدف إلى متابعة تحديد دواء منشط للدماغ من الجيل الثاني، وقد تمت الموافقة عليه من قبل منظمة الغذاء والدواء الأمريكية Food and drug administration عام 1999. وسرعان ما أصبح واحداً من الأدوية التي توصف على نطاق واسع لعلاج الصرع الجزئي، وليس له علاقة تركيبية بالأدوية الأخرى المضادة للصرع، وهو مرتبط تركيبياً بمادة البيراسيتام المنشطة للدماغ (1). يستخدم عقار الليفيتراسيتام لعلاج نوبات الصرع الجزئية، ولعلاج مرضى الصرع المعمم والصرع المقاوم (2، 3)، كما يستخدم لعلاج حالات غير صرعية تشمل اضطراب ثنائي القطبية، والوقاية من الصرع النصفى وألم الأعصاب، والرمع العضلي (4).

لقد تم التعرف على التأثيرات المعالجة بالأدوية المضادة للصرع على الوظيفة الجنسية منذ عام 1850، عندما تم إدخال البروميدات Bromids كعلاج للصرع. وقد أظهرت البحوث في وقت لاحق تطور العجز أو انخفاض الرغبة الجنسية بنسبة تراوحت ما بين 11-22 % من المرضى بعد بدء العلاج بالكاربامازيبين (CBZ) 11-22 % و Carbamazepine والفينيتوين (Phenytoin (PHD) والفينوباربيتال (PB) أو البريميدين (Primidin). تعرف هذه العقاقير بالعقاقير القديمة أو عقاقير الجيل الأول، حيث تم استخدامها على نطاق واسع، إلا أن زيادة مخاطر آثارها الجانبية تتطلب مراقبة علاجية (6). وقد لقيت عقاقير الجيل الثاني الأفضلية بسبب قلة آثارها الجانبية. غير أن دراسات عدة أثبتت أن استعمال العلاج بحامض الفالبرويك Valproic acid (VPA) على المدى الطويل يؤدي إلى تغيرات في شكل المبيض عن طريق زيادة عدد الأكياس المبيضية، وتغير في مستويات هرمون الجنس السيروتوني في الجردان غير المصابة بالصرع (7، 8). كما بينت البحوث أن العلاج بعقار أوكزكاربازيبين سيرا فقه زيادة في انتشار متلازمة تكيس المبايض (5).

يعد عقار الليفيتراسيتام من عقاقير الصرع الجديد من الجيل الثاني، ويمثل بديلاً لعقار (VPA) للكثير من المرضى. وللعقار صيغة حركية دوائية مرغوب فيها، فهو سريع وكامل الامتصاص عن طريق الفم، ويتم التخلص منه عن طريق البول، وآثاره السلبية طفيفة، مع عدم وجود تأثير في مستويات المصل والعوامل المضادة للصرع الأخرى. كما يتم تحمله من قبل المرضى بشكل جيد. ولا توجد بينه وبين العقاقير الأخرى أي تفاعلات أو تداخلات (9). الاسم الكيميائي لعقار الليفيتراسيتام هو S-الفاثيل-2-اوكزو-1-بيروليديناسيتاميد-1-oxo-z-ethyl S-pyrrolidine acetamide.

بالرغم من أهمية هذا العقار في علاج حالات الصرع، فقد أجريت دراسات توضح التأثيرات الجانبية لعقار الليفيتراسيتام في أعضاء الجسم المختلفة. ففي دراسة حديثة، تبين بأن عقار الليفيتراسيتام يؤثر في إفراز هرمون السيروتونيد القاعدي (10). كما أجريت دراسة طويلة الأمد على معاملة الجرذ بعقار الليفيتراسيتام، وكان مبيض الحيوانات المعاملة أكبر بشكل معنوي، وازداد عدد الأجسام الصفراء والجريبات المبيضية، مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة (11).

وعليه، يتحدد هدف هذه الدراسة بمعرفة تأثير العقار في عدد الغدد الرحمية وعدد الأوعية الدموية في بطانة الرحم بتأثير الاستخدام الطويل الأمد لعقار الليفيتراسيتام في إناث الفأر الأبيض.

## المواد وطرق العمل

في هذه الدراسة، تم استخدام عقار الليفيتراسيتام المجهز من قبل شركة UCB pharma, Inc., Smyrna, Ga., USA، على شكل شراب فموي سائل، بتركيز واحد فقط كان 1.14 mg/kg/day، وتم حفظه في مكان بارد لحين الاستعمال. شملت عينة الدراسة أربعين (40) فأراً من نوع (Swiss mice) Musmusculus من سلالة BAIB/C، تم إحضارها من مركز الرقابة الدوائية، بلغ معدل أوزانها (24-28) غم وتراوحت أعمارها (8-12) أسبوعاً.

جدول رقم (4): تأثير العقار في سمك الصفيحة الأصلية

متوسط سمك الصفيحة الأصلية Mean± S.E.	عدد الفئران في كل مجموعة N	مدة المعاملة
165.684±26.578	10	السيطرة
253.998±14.309 <sup>Aa</sup>	10	عقار 14 يوم
233.033±15.742 <sup>Aa</sup>	10	عقار 30 يوم
315.793±13.274 <sup>Aa</sup>	10	عقار 45 يوم

a: وجود فروق معنوية ( $p < 0.0.5$ ) مقارنة بمجاميع المعاملة بالعقار  
A: وجود فروق معنوية ( $p < 0.0.5$ ) مقارنة بمجموعة السيطرة

جدول رقم (1): تأثير العقار في عدد الغدد الرحمية

متوسط عدد الغدد الرحمية Mean± S.E.	عدد الفئران في كل مجموعة N	مدة المعاملة
41.40±2.731	10	السيطرة
26.40±1.691 <sup>Aa</sup>	10	عقار 14 يوم
20.60±2.182 <sup>Aa</sup>	10	عقار 30 يوم
10.40±2.542 <sup>Aa</sup>	10	عقار 45 يوم

a: وجود فروق معنوية ( $p < 0.0.5$ ) مقارنة بمجاميع المعاملة بالعقار  
A: وجود فروق معنوية ( $p < 0.0.5$ ) مقارنة بمجموعة السيطرة

## المناقشة

وفقاً لنتائج هذه الدراسة، فإن بطانة الرحم لحيوانات مجموعة السيطرة والمجموعات المعاملة بالعقار تتكون من النسيج الظهاري العمودي البسيط الذي يغطي سطح البطانة، كما تحتوي على صفيحة أصيلة سميكة Thick lamina propria تتكون من عدد من الأوعية الدموية Blood vessels ، وغدد البطانة الرحمية Endometrial gland، كما توجد أعداد مختلفة من الخلايا الليفية وخلايا الدم البيضاء في سطح الصفيحة الأصلية لبطانة الرحم، وهذا مماثل لما هو موجود في دراسة (17)، إذ يتطابق تماماً مع بقية اللبائن من حيث الطراز العام المكون من النسيج الظهاري العمودي والصفيحة الأصلية.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاضاً في عدد الغدد الرحمية للحيوانات المعاملة بالعقار لمدة 14، 30، 45 يوماً عند المقارنة مع مجموعة السيطرة، ويرجع سبب ذلك إلى تأثير هرمون الإستروجين بعقار الليفيتراسيتام، وقد أشار (11) إلى أن عقار الليفيتراسيتام يؤدي إلى خفض هرمون الإستروجين، كما بين أن هرمون الإستروجين يحفز نمو الأنسجة المشاركة في التكاثر، ونتيجة لتحفيز هرمون الإستروجين، تتكاثر ظهارة المهبل وبطانة الرحم، وتتضخم عضلة الرحم وتتكاثر قنوات الثدي، كما أن البروجسترون يتم تصنيعه وإفرازه بواسطة الأجسام الصفراء، وهو يقلل من تكاثر ونمو الظهارة المهبليّة، وتحويل ظهارة الرحم من تكاثرية إلى إفرازية، وقد بين (11) أن الاستخدام الطويل لعقار الليفيتراسيتام يؤدي إلى زيادة هرمون البروجسترون وزيادة الأجسام الصفراء، ويمكن الاعتماد على هذا الأساس في تفسير انخفاض عدد الغدد الرحمية بفعل الاستخدام الطويل لعقار الليفيتراسيتام في الدراسة الحالية.

كما أوضحت الدراسة زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في عدد الأوعية الدموية في الحيوانات المعاملة بالعقار لمدة 14، 30، 45 يوماً، وقد يعود سبب زيادة عدد الأوعية الدموية في بطانة الرحم في الحيوانات المعاملة بالعقار نتيجة لحدوث التهاب في بطانة الرحم، حيث أشارت دراسة (18) إلى أن ارتفاع التجهيز الوعائي High vasculature يكون متزامناً مع المناعة النسيجية عند التهاب بطانة الرحم في الفئران.

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في ارتفاع الخلايا الظهارية وسمك الصفيحة الأصلية مقارنة مع مجموعة السيطرة، وتفسير ذلك أن عقار الليفيتراسيتام ربما أثر في المبيض وهرمونات المبيض، إذ أشار (11) إلى أن المعالجة على المدى الطويل لعقار الليفيتراسيتام يؤثر بشكل كبير في وظيفة الغدد الصماء الإنجابية، كما يؤثر في شكل المبيض وزيادة في وزن المبيض وأعداد الأجسام الصفراء.

وقد أوضحت دراسة حديثة باستعمال الخلايا الجريبية المبيضية في الخنازير قبل البلوغ أن عقار LEV يؤثر على إفراز هرمون الاستيرويد القاعدي (10). وقد أشارت دراسة (19) إلى أن الاضطراب في المبيض يؤدي إلى تضخم الرحم، كما بينت دراسة (11) أن عقار الليفيتراسيتام يؤدي إلى ارتفاع هرمون الشحمون الخصوي الذي يعمل مع الإستروجين على زيادة تخنن بطانة الرحم والخلايا الظهارية (20).

أشارت دراسة (21) إلى أن معاملة إناث الفئران بهرمون الشحمون الخصوي يؤدي إلى تضخم الخلايا Hypertrophy في بطانة الرحم والطبقة العضلية، بينما أوضحت نتائج دراسة (22) أن مضادات الإستروجين تؤدي إلى ضمور في بطانة الرحم وعضلة الرحم والمهبل. وقد جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع نتائج دراسة (21) في أن زيادة هرمون الشحمون الخصوي يؤدي إلى

أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في عدد الأوعية الدموية Blood vessels للمجموعات المعاملة بالعقار لمدة 14، 30، 45 يوماً على التوالي بالمقارنة بمجموعة السيطرة. سجلت النتائج عدم وجود فرق معنوي ( $P < 0.05$ ) عند المقارنة بين المجموعات التجريبية الثلاثة المعاملة بالعقار أو حتى مع بعضها لمدة (14، 30، 45) يوماً على التوالي (جدول رقم 2).

جدول رقم (2): تأثير العقار في عدد الأوعية الدموية

متوسط عدد الأوعية الدموية Mean± S.E.	عدد الفئران في كل مجموعة N	مدة المعاملة
6.60±0.748	10	السيطرة
12.60±1.470 <sup>A</sup>	10	عقار 14 يوم
15.80±1.828 <sup>A</sup>	10	عقار 30 يوم
17.20±2.818 <sup>A</sup>	10	عقار 45 يوم

A: وجود فروق معنوية ( $p < 0.0.5$ ) مقارنة بمجموعة السيطرة

أدت المعاملة بعقار الليفيتراسيتام إلى وجود زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في ارتفاع الظهارة المخاطية Mucosa epithelium في بطانة الرحم للحيوانات المجرعة لمدة (14، 30، 45) يوماً على التوالي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة، كما سجلت النتائج وجود فرق معنوي ( $P < 0.05$ ) في ارتفاع الخلايا الظهارية عند المقارنة بين المجموعتين الأولى والثانية من جهة، وبين المجموعتين الأولى والثالثة من جهة أخرى، في حين لم تظهر النتائج وجود فرق معنوي ( $P < 0.05$ ) عند المقارنة بين المجموعتين الثانية والثالثة (جدول رقم 3).

سجلت نتائج الدراسة الحالية وجود زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في سمك الطبقة الأصلية Lamina propria في بطانة الرحم المخاطية للحيوانات المجرعة لمدة (14، 30، 45) يوماً على التوالي عند المقارنة بمجموعة السيطرة، وعند المقارنة بين المجموعات التجريبية، أظهرت المجموعة الأولى فرقاً معنوياً ( $P < 0.05$ ) عند مقارنتها بكل من المجموعة الثانية والثالثة، في حين لم تظهر المجموعة الثانية فرقاً معنوياً ( $P < 0.05$ ) عند مقارنتها مع المجموعة التجريبية الثالثة (جدول رقم 4).

جدول رقم (3): تأثير العقار في ارتفاع الخلايا الظهارية

متوسط ارتفاع الخلايا الظهارية Mean± S.E.	عدد الفئران في كل مجموعة N	مدة المعاملة
11.912±0.647	10	السيطرة
19.839±1.073 <sup>Aa</sup>	10	عقار 14 يوم
25.995±1.496 <sup>Aa</sup>	10	عقار 30 يوم
29.046±0.883 <sup>Aa</sup>	10	عقار 45 يوم

a: وجود فروق معنوية ( $p < 0.0.5$ ) مقارنة بمجاميع المعاملة بالعقار  
A: وجود فروق معنوية ( $p < 0.0.5$ ) مقارنة بمجموعة السيطرة

13. Kiernan JA. (2002). Histochemical methods (theory and practice) 3<sup>rd</sup>. ed. Butter Worth Heinemann, Oxford. Pp.:1-6.
14. Spano M.; Bartoleschi C.; Cordelli E.; Leter G.; Tiveron C. and Pacchierotti F.(1996). Flow cytometric assessment of trophosphamide toxicity on mouse spermatogenesis. *Cytomet.* 24:174-180.
15. Sahlin H.; Masironi B.; Eriksson E. and Hirschberg L.(2007). Effects of testosterone treatment on endometrial proliferation in postmenopausal women. *J.Clin. Endocrinol. Meth.* 92(6): 2169-2175.
16. Hopy RV. and Balash KJ.(1988). Induced alteration in spermatogenesis of mature albino mice injected with caffeine. *J.Biol. Sci. Res.*19 :457-466.
17. Junquera L.; Carneiro J. and Hill M.(2005). Basic histology, Text and Atlas. 12<sup>th</sup> ed. North America. P.:435.
18. Nowak NM. (2008). Development and evaluation of two mouse models for endometriosis focused on the involvement of the immune system in endometriosis establishment, Dissertation, Fachbereich Biologie, der Freien University, Berlin.
19. Wordinger R. and Morrill A. (1985). Histology of the adult mouse oviduct and endometrium following a single prenatal exposure to diethyl stilbestrol. *Cell. Pathol.* 50:71-79.
20. Hong Z.; Lena S.; Britt M.; Elina E. and Angelica H.(2007). Effect of testosterone treatment on endometrial proliferation in postmenopausal women. *J. Endocrinol. Metabol.* 92(6): 2169-2175.
21. Abbas E.(2012). Effects of testosterone one structure of uterus in female mice BALB/C. *Bas. J. Vet. Rec.* 11:2-9.
22. Shougi L.; Antigone S.; Claude L.; Sylvain G; Yves M.; Alain B. and Fernand L.(1998). Effect of twenty – four week treatment with the antiestrogen EM-800 on estrogen – sensitive parameters in intact and ovariectomized mice. *Endocrinol.* 139(5):2645-2656.

فرط التنسج ببطانة الرحم (الطبعة الظهارية والصفحية الأصلية)،  
بينما كانت مخالفة لدراسة (22).

#### المصادر

1. Potschka H.; Baltes S. and Loscher W.(2004). Inhibition of multi-drug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilep. Res.* 58: 85-91.
2. Gambardella A.; Labate A.; Colosimo E.; Ambrosio R. and Cuttrone A.(2008). Monotherapy for partial epilepsy: focus on levetiracetam. *Neuropsychiat. Dis. Treat.* 4:33-38.
3. Kavishna K.; Raut AL.; Gohel KH. and Dove P. (2011). Levetiracetam. *JAPI.* 59: 652-654.
4. Farooq MU.; Bhatt A.; Majid A.; Gupta R. and Khasnis A.(2009). Two years of experience in the treatment epilepticus with intravenous levetiracetam. *Epilep. Behav.* 15:467-469.
5. Isojarvi JI.; Tauboll E. and Herzog AG. (2005). Effect of antiepileptic drug on reproductive endocrine function in individuals with epilepsy CNS drugs. *CNS. Drug.*19: 207-223.
6. Johannesen SL.; Battino D.; Berry DS.; Bialer M.; Kramer G. and Thomason T. (2003). Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drug. *Ther. Drug. Monit.*25: 347-363.
7. Tauboll E.; Sojarvi JI. and Harbo HF.(1999). Long –term valproate treatment induces changes in ovarian morphology and serum sex steroid hormone levels in female Wistar rats. *Seizure.* 8:490-493.
8. Roste LS.; Tauboll E.; Berner A.; Isojarvi JI. and Gjerstad L. (2001). Valproate, but not lamotrigine, induces ovarian morphological change in wistar rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 52:542-552.
9. Kavita K.; Asawari L.; Kushal HG. and Priti D. (2011). Levetiracetam. *JAPI.* 59:652-654.
10. Tauboll E.; Gregoraszczyk EL.; Tworzydlo A.; Wojtowicz AK. and Ropstad E.(2006). Comparison of reproductive effects of levetiracetam and valproate studied in prepubertal porcine ovarian follicular cells. *Epilep.* 47: 1580-1583.
11. Svalheim S.; Tauboll E.; Surdova K.; Ormel L.; Dahl E.; Aleksandersen M.; McNeilly A.; Gjerstad L. and Ropstad E.(2002). Long term levetiracetam treatment affects reproductive endocrine function in female Wistar rats. *Biol. Reprod.* 78 (2):278-289.
12. Humason GL.(1967). Animal tissue techniques. 2<sup>nd</sup> ed. W.H. Freeman Company. San Francisco.

## تأثير المستخلص الميثانولي لقشور الرمان *Punica Granatum L.* على كبد و كلى ذكور الفئران البيضاء

عبيد محمد حسين، بسمة علي جاسم، نورس عبد المحسن مزاحم

قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: mhammed836@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة إلى معرفة تأثير المستخلص الميثانولي لقشور الرمان في كبد و كلى ذكور الفئران البيضاء . تم تنفيذ تجربة الدراسة على عينة شملت 24 فأراً تم تقسيمها إلى ثلاث مجموعات (المجموعة الأولى وهي مجموعة السيطرة ، المجموعة الثانية جرعت بالمستخلص بتركيز 250 ملغم / كغم يومياً، المجموعة الثالثة جرعت بالمستخلص بتركيز 500 ملغم / كغم يومياً) عن طريق الفم. استمرت التجربة مدة 35 يوماً. تبين من نتائج الدراسة أن للمستخلص الميثانولي لقشور الرمان تأثيراً سلبياً في نسيج الكبد و الكلى للمجموعة المعاملة بتركيز 250 ملغم / كغم، مقارنة بمجموعة السيطرة، وكانت نتائج المجموعة المعاملة بالتركيز 500 ملغم / كغم مشابهة تقريباً للمجموعة المعاملة بتركيز 250 ملغم / كغم، ولكنها كانت أكثر سلباً على نسيج الكبد والكلى . وتخلص الدراسة إلى أن للمستخلص الميثانولي لقشور الرمان تأثيراً سلبياً في نسيج الكبد والكلى.

**الكلمات المفتاحية:** مستخلص ميثانولي ، قشور الرمان ، كبد ، كلى ، ذكور الفئران البيضاء.

## The effects of methanolic extract of *Punica Granatum L.* peel on liver and kidney of male albino mice

Abeer M. Hussain, Basma A. Jasim and Nawras A.M. Muzahim

Dept. of Biology / College of Sciences for Women/ University of Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The present study aimed to determine the effects of methanolic extract of *Punica Granatum* peel on liver and kidney in albino male mice . total sample of 24 male mice were included, where they were divided into three groups (1<sup>st</sup> group considered control group, 2<sup>nd</sup> group treated by 250 mg/kg from extract, and 3<sup>rd</sup> group were treated by 500 mg/kg from extract) . The experiment lasted for 35 days. Results showed that methanolic extract for *Punica Granatum* peel had negative effect on liver and kidney tissues in the second group (250 mg/kg concentration) when compared with the control group. The results also showed that the third group, which was treated by 500 mg/kg from extract had same effect to the second group, however, the effect of the extract was more negative on liver and kidney tissues than on the second group.

The study concluded that the methanolic extract of *Punica Granatum* peel have negative effects on liver and kidney tissues in two different concentrations.

## المقدمة

مستوى مستقر للجلكوز من خلال إفرازه أو خزنه بشكل جليكوجين. أما الدهون، فإنها تعبر مباشرة بعد امتصاصها في الأمعاء إلى الكبد عن طريق الوريد البابي الكبدي (25).

تقع الكليتين إلى الأعلى من الجانب الظهري للبطن، على جانبي العمود الفقري، أعلى قليلاً من قياس الخصر، وتكون محمية من الضرر بواسطة الأضلاع السفلى، ولها شكل يشبه حبة الفاصولياء، وتوجد أعلى كل كلية الغدة الكظرية. Adrenal gland (26). تتكون الكلية من منطقتين أساسيتين، هما القشرة واللب، وتتألف الكلية من وحدات أساسية تسمى النفرون Nephron (27). يحتوي النفرون الواحد على كبيبة و زوج من القنوات التي تنقل المواد من الشبكة الكلوية. تقع الكبيبة في منطقة القشرة وتحاط بمحفظة بومان، التي تكون مبطنة بخلايا طلائية endothelial cell وتحتوي شبكة من الشعيرات الدموية، التي تقوم بترشيح الدم، أما الغشاء القاعدي للكبيبة، فيتكون من خلايا تسمى Podocyte تدخل الجزيئات إلى النبيب المتلوي القريب Proximal convoluted tubule، ثم عروة هنلي Loop of Henle، ثم النبيب المتلوي البعيد Distal convoluted tubule، لتقوم الخلايا المبطنة للنبيبات بإعادة امتصاص الماء والبروتينات الصغيرة والأحماض الأمينية (28). وللكلية وظائف أساسية عديدة، منها تنظيم  $H_2O$ ، إنتاج هرمونات Angiotensin، (Renin-Prostaglandin)، والتخلص من الفضلات (اليوريا والأمونيا)، وتنظيم إنتاج خلايا الدم الحمراء، من خلال إفراز هرمون Erythropoietin، الذي يؤثر على الخلايا الجذعية في نقي العظم منتجاً خلايا الدم الحمراء (29).

## المواد وطرق العمل

## تحضير المستخلص

تم جمع ثمار الرمان من أحد الأسواق في بغداد، وبعد التخلص من البذور، أخذت القشور وغسلت بالماء وتركزت لتجف تحت الشمس. جرى بعد ذلك طحنها، وأخذ منها ما مقداره 50 غم وتمت إذابته في 100 مل من كحول الميثانول Methanol لمدة ساعة، ثم تم ترشيح الناتج للتخلص من بقايا القشور وتم وضعه في الفرن بدرجة حرارة 50 د°، وتم خزنه بالتجفيف (30).

## تهيئة الحيوانات

تم تهيئة 24 ذكراً من الفئران البيضاء السويسرية، بمعدل أوزان (20 - 30) غم، و بعمر 8 أسابيع. تم جرى تقسيمها إلى ثلاث مجموعات بواقع 8 حيوانات في كل مجموعة، واستمرت التجربة مدة 35 يوماً. وقد جاء تصنيف المجموعات بالشكل التالي:

- 1- المجموعة الأولى: وهي مجموعة السيطرة، وعولمت بالماء والغذاء طوال مدة التجربة.
- 2- المجموعة الثانية: أعطيت جرعة 250 ملغم / كغم يومياً من المستخلص، عن طريق الفم بطريقة التجريب وباستخدام السرنجات الخاصة بالأنسولين.
- 3- المجموعة الثالثة: أعطيت جرعة 500 ملغم / كغم يومياً من المستخلص عن طريق الفم بطريقة التجريب وباستخدام السرنجات الخاصة بالأنسولين حسب ما جاء في (31).

## التضحية بالحيوانات

بعد انتهاء مدة التجربة، تم قتل الحيوانات بطريقة فصل الرأس عن الجسم بالسحب. وبعدها تم عمل شق من الجانب السفلي للبطن بشكل حرف T مقلوب، وتم استئصال كل من الكبد والكلية، وتم وضعها على ورق ترشيح للتخلص من الدم والأنسجة المرتبطة بها. ثم وضعت العينات المذكورة بمحلول فورمالين بتركيز 10 %، و تركت لحين عمل المقاطع النسيجية لها.

## المقاطع النسيجية

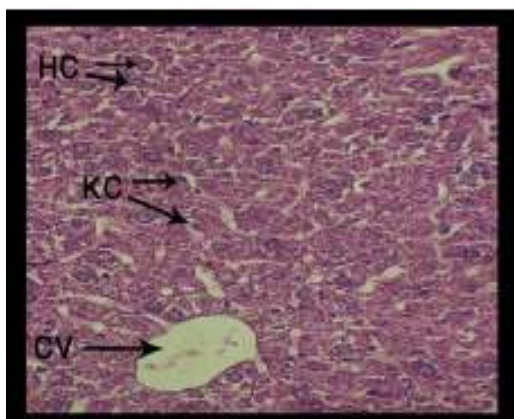
أخذت العينات ( الكبد ، الكلى ) الموجودة في الفورمالين وتم تعريضها لسلسلة تصاعدية التركيز من الكحول الإيثيلي لسحب

ينتمي نبات الرمان *Punica granatum* إلى عائلة *punicaceae* ويسمى Pomegranate، وهو ينمو بشكل شجيرات منتصبه (1). تنتشر زراعة الرمان بالمناطق القمية و شبه القمية في كل من إيران وشمال باكستان وشمال الهند (2)، كما تنتشر زراعته أيضاً في بعض أجزاء الولايات المتحدة الأمريكية (3). يحتوي الرمان على العديد من المركبات الكيميائية مثل Polyphenol، Anthocyanidine و Flavonoids (4)، حيث تعد بذور الرمان والجزء الصالح للأكل من الثمرة غنية بالفيتامينات والسكريات المتعددة (5). و تعد ثمرة الرمان غنية بنوعين من المركبات Polyphenolic (1) : anthocyanine (cyanidin)، Tannin (2) : delphinidin، pelargonidin، punicalagin، gallagic acid، ellagic acid، pedunculagin (3)، والتي تمتلك 92 % من فعالية مضادات الأكسدة في الثمرة جميعها (6). ويحتوي مستخلص بذور الرمان على فعالية قوية مضادة للأكسدة نتيجة احتوائه على anthocyanidine (7). كما أن عصير الرمان وقشرته تحتويان خواصاً مضادة للأكسدة. وقد أشارت بعض الدراسات إلى أن المركبات ( Flavonoid، anthocyanidine ) الموجودة في بذور وقشرة الرمان تمتلك فعالية مضادة للأكسدة أقوى من تلك الموجودة في الشاي الأخضر أو النبيذ الأحمر (8)، و تحتوي بذور الرمان على Estrogen، testosterone، estradiol (9)، كما أن مستخلص القشور يقلل من أكسدة الدهون البروتينية قليلة الكثافة Low – density Lipo Protein (10).

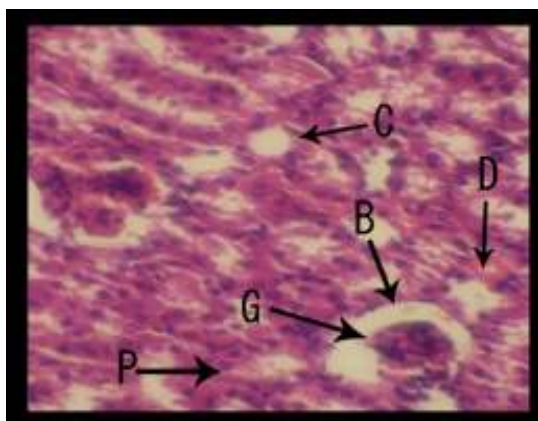
أشارت دراسة (11) إلى أن مستخلص قشور الرمان له القابلية على تثبيط تكوين بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  الناتج من أكسدة الدهون البروتينية Lipoprotein oxidation LPO في خلايا الدم الحمراء، الكبد، الكلية والقلب. في حين أوضحت دراسة كل من (12، 13) أن مستخلص القشور يقلل من تركيز Sodium azide، وهي مادة سامة تنتجها بكتيريا *Salmonella typhimurium*، كما له القدرة على الحد من تكاثر خلايا الورم.

لوحظ أن عصير الرمان له القدرة على رفع مستوى Follicle stimulating hormone FSH، testosterone، LH Luteinizing hormone بعد معاملة ذكور الجردان برباعي كلوريد الكربون  $CCL_4$  (14). كما أن له القدرة على رفع مستوى إنزيمات الكبد SOD superoxide dismutase، CAT، glutathione peroxidase GPx، catalase، glutathione reductase GR و S – transferase GST بالإضافة إلى قدرته على إنقاص مستوى أوكسيد النترية NO (15). وقد دلت بعض الدراسات على أن تناول الرمان يسهم في تحسين تركيز النطف بالبربخ، وزيادة الخلايا المولدة للنطف، وتحسين أقطار النبيبات المنوية، وحركة النطف، وفي التقليل من عدد النطف المشوهة (16). هذا، ويعد مستخلص قشور الرمان مثبطاً قوياً لعدة أنواع من البكتيريا، منها *Listeria*، *Staphylococcus aureus*، *monocytogenes*، *Escherichia coli* و *Yersinia enterocolitica* (17). ومنذ وقت طويل و ليوماً هذا يستخدم الرمان في علاج قرحة المعدة gastric ulcer (18)، وعلاج الخثرة الدموية وحماية القلب (19)، كما يستخدم كمضاد للفطريات والفيروسات (20)، ويستخدم الرمان لتقليل آلام الربو asthma، والتهاب القصبات الهوائية Bronchitis، والسعال cough، والإسهال diarrhea، وسوء الهضم dyspepsia، والحمى fever، والجروح wound، وإصابات الجهاز التنفسي Respiratory system disorders، وفي علاج تصلب الشرايين Atherosclerotic diseases (21)، (22).

يعد الكبد من أكبر أعضاء الجسم ويقع في الجانب الأيمن العلوي من التجويف البطني أسفل الحجاب الحاجز، بموازاة المرارة وقناة الصفراء (23). يتألف الكبد من مجموعات من خلايا parenchymal cell تسمى الخلايا الكبدية وخلايا non-parenchymal التي تسمى خلايا Kupffer cell، وهي خلايا بلعمية، ويتم تخزين الدهون في الخلايا الشبكية stellate cell، إضافة إلى الخلايا البطانية endothelial cell (24). و للكبد وظائف عديدة، أهمها أيض الكربوهيدرات، البروتين والدهون. و هو المسؤول عن بناء وإفراز الصفراء، وعن بناء البروتينات الدهنية وبروتينات الدم، ومنها عوامل الخثرة. يحافظ الكبد على



شكل رقم (1): مقطع من كبد فئران مجموعة السيطرة: الخلايا الكبدية Hepatocyte (H) والوريد المركزي (CV) وخلايا كُفر Kupffer cell (KC). هيماتوكسيلين - إيوسين (400X)



شكل رقم (2): مقطع مستعرض في كلية فأر من مجموعة السيطرة: الكلية (G) Glomerulus محفظة بومان (B) Bommain capsule والنباتات الكلوية الدانية Proximal renal tubules (P) والقاصية (D) Distal renal tubules والجامعة (C) Collecting tubules. هيماتوكسيلين - إيوسين (400X).

الماء منها Dehydration ، وكانت تراكيز الكحول (70 % ، 80 % ، 90 % ، 95 % ، 100 % ، 100 %) ولمدة ساعة واحدة لكل تركيز، ثم استعمل الزايلين Xylene لتنظيف العينة Clearing لمدة ساعة واحدة . وضعت العينات بمادة الزايلين وشمع البارافين المنصهر بنسبة 1 : 1 لمدة ربع ساعة داخل الفرن، إذ تمت إذابة الشمع مسبقاً بالفرن بدرجة انصهار (56-58) درجة مئوية . بعد ذلك، وضعت العينات مرتين بشمع منصهر لوحده مدة ساعة كاملة داخل الفرن، لتتبع العينة بالشمع بعملية التشريب Infiltration . وبعدها جرت عملية الطمر Embedding والتي تتلخص بوضع العينة بالشمع المنصهر الموجود في قوالب الصب البلاستيكية بواسطة ملقط ساخن معقم. تمت هذه العملية داخل الفرن لمدة ساعة كاملة. بعدها تم استخراج القوالب التي تحوي العينات، وتركت بدرجة حرارة الغرفة ليتصلب الشمع. جرت عملية التقطيع Sectioning للعينات بأشرطة مستمرة Ribbons بجهاز المشرع Rotary microtome اليدوي، وبسمك 6 مايكرومتر . تم وضع الشريط في حمام مائي ساخن لإذابة الشمع المحيط بالعينات، ثم أخذت شريحة نظيفة وتم مسح سطحها العلوي بلاصق ماير وتم إنزاله بصورة مائلة بالحمام المائي قرب الشريط، ثم نقل الشريط من الحمام المائي للشريحة وتركت الشريحة لمدة 24 ساعة . تمت بعدها مرحلة التصبغ Staining ، حيث تم وضع الشرائح لمدة ربع ساعة في الزايلين مرتين لإذابة ما تبقى من الشمع المحيط بالعينات بالحاويات الخاصة بالتصبغ (Coplins Jars)، وبعد الزايلين بدأت سلسلة تنازلية من الكحول الإيثيلي (100 % ، 95 % ، 90 % ، 80 % ، 70 %) لمدة دقيقتين لكل تركيز، وبعدها بالماء المقطر لمدة دقيقتين لإزالة الكحول، ثم بعدها بصبغة الهيماتوكسيلين - هاريس Harris - Hematoxylin لمدة 5 دقائق . غسلت الشرائح بماء الصنبور الجاري لمدة 5 دقائق ، ونقلت للحاوية الخاصة بصبغة الأيوسين Eosin ، لصبغ المكونات القاعدية لمدة 3 دقائق . مررت الشرائح بعد ذلك على سلسلة كحولات تصاعدية (70 % ، 80 % ، 90 % ، 95 % ، 100 % ) ، ثم في الزايلين لمدة ربع ساعة مرتين. ثم تأتي المرحلة الأخيرة، التحميل Mounting ، إذ تم وضع قطرتين من كندا بلسم Canada balsam على الشريحة، ووضع عليها غطاء الشريحة Cover slide ، و تركت الشرائح على الصفيحة الساخنة بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة (32).

#### التصوير المجهرى

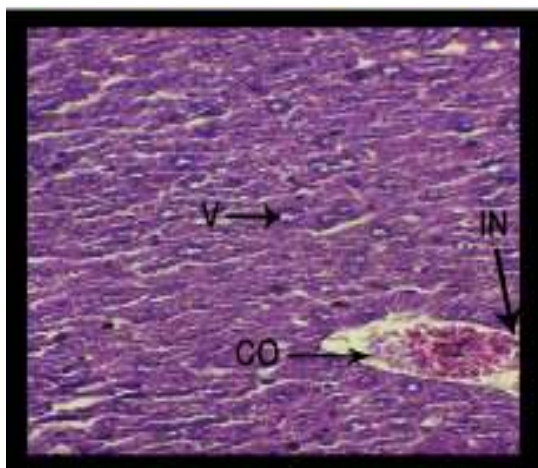
تم فحص الشرائح الحاوية على العينات في كلية العلوم للنباتات / قسم علوم الحياة في مختبر التصوير المجهرى، باستخدام مجهر مركب Compound Microscope، وتحت قوة تكبير 40 X، ثم صورت المقاطع باستخدام كاميرا تصوير فوتوغرافي موصلة بمجهر مركب من نوع Olympus BH.

#### النتائج

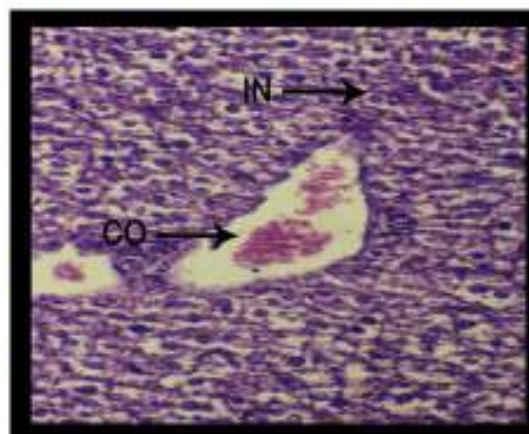
لوحظ من النتائج الموضحة في كل من صورة رقم (3، 4) كبد وكلية المجموعة المعاملة بتركيز 250 ملغم/ كغم حدوث احتقان دموي congestion في الكبد وارتشاح للخلايا الالتهابية infiltration (خروج الكريات البيضاء من الوريد الكبدي، وانتشارها بين خلايا الكبد)، وفي الكلية glomerulus للكلية. أما المجموعة المعاملة بتركيز 500 ملغم / كغم (صورة 5، 6)، فقد أظهرت وجود فجوات بخلايا الكبد، واختفاء للترتيب الشعاعي للخلايا مع احتقان دموي congestion وارتشاح للخلايا الالتهابية infiltration . أما الكلية فقد أظهرت احتقاناً دمواياً congestion وارتشاحاً Infiltration وضموراً في بعض الأنوية من خلايا النبيتات الجامعة collecting tubule.

أظهرت مجموعة السيطرة ان نسيج الكبد يتألف من الفصوص الكبدية Hepatic lobes، في كل فص وريد مركزي central vein، تترتب حوله الخلايا الكبدية بصف أو صفين من الخلايا التي تدعى الحبال الكبدية Hepatic cord، التي تحصر بينها الجيبانيات الدموية sinusoids والتي تصب في الوريد الكبدي. وتترتب الجيبانيات والحبال الكبدية شعاعياً حول الوريد المركزي (شكل رقم 1). أما الكلية، فقد أظهرت تركيباً نسيجياً مؤلفاً من منطقة القشرة Cortex للخارج الذي يحوي وحدات الترشيح البولي (الكبيبات الكلوية Glomerulus) والنباتات الكلوية القاصية والدانية Proximal and distal renal tubules، وتحاط الكلية بطبقة رقيقة من النسيج الضام يدعى المحفظة Capsule (شكل رقم 2).

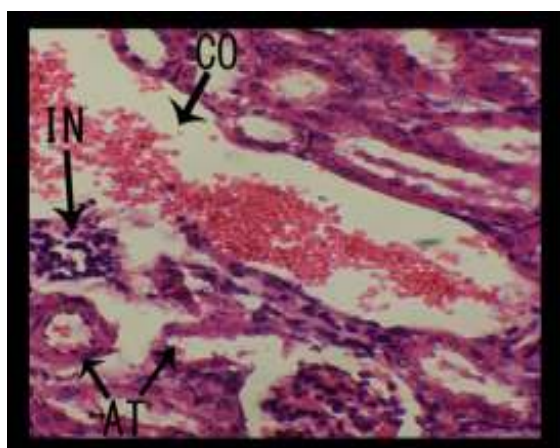




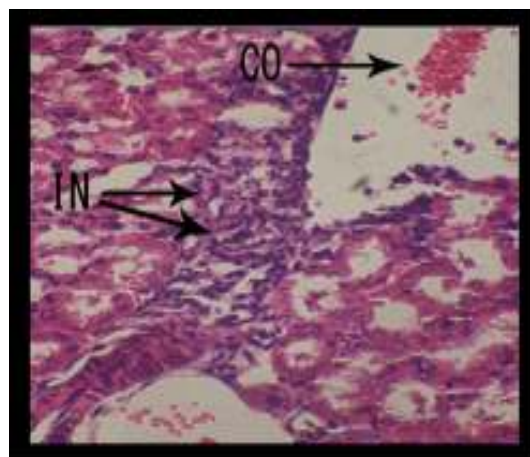
شكل رقم (5): مقطع من كبد فأر من المجموعة المعاملة بتركيز 500 ملغم / كغم: وجود احتقان دموي Congestion (CO) وفجوات بالخلايا الكبدية (V) Vacules وارتشاح Infiltration (IN) هيماتوكسلين – إيوسين . (400 X).



شكل رقم (3): مقطع في كبد من مجموعة الفئران المعاملة بتركيز 250 ملغم/ كغم : وجود احتقان دموي Congestion ( CO ) . هيماتوكسلين – إيوسين . (400 X)



شكل رقم (6): مقطع مستعرض من كلية فأر من المجموعة المعاملة بتركيز 500 ملغم / كغم: احتقان دموي Congestion (CO) وارتشاح Infiltration ( IN ) وضمور الأنوية ( AT) . هيماتوكسلين – إيوسين . (400 X)



شكل رقم (4): مقطع في كلية من مجموعة الفئران المعاملة بتركيز 250 ملغم/ كغم : وجود احتقان دموي Congestion (CO) وارتشاح للخلايا الالتهابية Infiltration ( IN ) . هيماتوكسلين – إيوسين . (400 X)

#### المناقشة

يعد الرمان من المصادر الغنية بمركبات anthocyanin ، Polyphenol و Tannin ومشتقاتها (33)، حيث إن tannin موجود في النباتات وله قابلية عالية على الذوبان في الماء مكونا معقدات مع البروتين، نظرا لاحتوائه على نسبة كبيرة من مركبات Phnolic hydroxyl . ويقسم التانين لمجموعتين رئيسيتين هما Hydrolysable tannin (HT) و condensed tannin (CT) (34). وقد أشارت دراسة (35) إلى أن مركبات التانين لها القابلية على التحلل بسهولة داخل الجسم، فضلا عن قدرتها على التداخل مع امتصاص الحديد من خلال تكوينه لمعقدات، وهو في تجويف الأمعاء، ليقال من توافر الحديد. ويلعب Polyphenol دورا واثقا ضد الأمراض وسمية الأدوية، إلا أن القليل من الدراسات قد أشارت إلى سميته (36). الجدير بالذكر أن مركبات Polyphenol توجد في جميع الفواكه والخضروات، لكنها تسبب تمزقا في الإنزيمات، ولها القدرة على الارتباط بالمعادن ، الفيتامينات ، الكربوهيدرات لتجعلها مقيدة غير حرة (37). يتم امتصاص Polyphenol من قبل جدار الخلية مسببا تمزقا في الغشاء واضطرابا في الوظيفة (38).



تخليق البروتينات، إذ إن هناك توازناً لتخليق البروتين وتحلله داخل الخلية، وبناءً على ذلك، فإن زيادة عملية التحلل البروتيني تؤدي إلى حالة الهدم Catabolism، وبالتالي حدوث حالة الضمور، فيؤدي إلى تحلل الأنزيمات الحالة داخل الخلايا (54).

#### المصادر

1. Jasim AS.; Abdul-Wahid AT.; Abdul-Gabbar LA. and Yussif BK. (2014). Evaluation of antimicrobial activity of phenolic extract from *Punica Granatum* L. peel. Bas. J. Vet. Res. 1(1): 26-32.
  2. Umran MA.; Ibraheem SR. and Abed RM. (2013). Evaluation of the effects of three types of pomegranate fruit extract on some biochemical markers and cytogenetic parameters in mice administrated with iron dextran to iron overload. Iraqi. J. Sci. 54(4): 862-871.
  3. Mohammed A. and Saeed SHZ. (2012). Nephro – protective effect of *Punica Granatum* in gentamicin – induced nephrotoxicity in rats. Med. J. Babylon. 9(1): 220 – 228.
  4. Zaid MA.; Afaq F.; Syed DN.; Dreher M. and Mukhtar H. (2007). Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. Photochem. Photobiol. 83(4):882-888.
  5. Graca M.; Fontes C.; Antunes D.; Neves A. and Martins D. (2004). Anthocyanin concentration of “Assaria” pomegranate fruits during different cold storage conditions. J. Biomed. Biotechnol. 5: 833-842.
  6. Gil MI.; Tomas-Barberan FA.; Hess-Pierce B.; Holcroft DM. and Kader AA. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J. Agric. Food. Chem. 48 (1): 4581-4589.
  7. Singh RP.; Chidambara A.; Murthy KN. and Jayaprakasha GK. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. J. Agric. Food Chem. 50 (1):81-86.
  8. Lansky EP. and Newman RA. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J. Ethnopharmacol. 109(2):177-206.
  9. Mori-Okamoto J.; Otawara-Hamamoto Y.; Yamato H. and Yoshimura H. (2004). Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. J. Ethnopharmacol. 92 (1): 93-101.
  10. Aviram M.; Dornfeld L.; Kaplan M.; Coleman R.; Gaitini D.; Nitecki S.; Hofman A.; Rosenblat M. et. al. (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. Drugs Exp. Clin. Res. 28(2-3):49-62.
  11. Parmar HS. and Kar A . (2008). Medicinal values of fruit peels from citrus sinensis, *Punica granatum*, and *musa paradisiaca* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum
- دراسة أخرى بينت أن معاملة ذكور الجرذان بمستخلص قشور الرمان سبب نقصاناً بمعدل وزن الكبد / وزن الجسم، و وزن الكلية / وزن الجسم ، بسبب نقصان في محتوى الدهون في الكبد، ومنها Low density lipoprotein و triglyceride ، cholesterol (LDL) وزيادة مستوى High density lipoprotein (HDL) ، ونقصان فعالية الإنزيمات Alanine aminotransferase (ALT) و Aspartate aminotransferase (AST) (39). كما أشارت دراسة أخرى إلى أن معاملة ذكور الفئران البيضاء بمستخلص قشور الرمان سبب نقصاناً بمستوى Alkaline phosphatase و Bilirubin في الكبد، مع زيادة نسبة اليوريا ونقصان مستوى Creatinine في الكلية (40). وقد لوحظ أن إعطاء مستخلص قشور الرمان سبب نقصاناً بمستوى Total Glutathione (41). و يعد Glutathione الخط الدفاعي الأول ضد الجذور الحرة (42)، ومن أصناف الجذور الحرة  $H_2O_2$  ،  $Superoxide\ O_2^-$  و  $Hydroxyl\ OH^-$  والتي تتفاعل مع مركبات الخلية مسببة أكسدة دهون الغشاء البلازمي، والتي لها القدرة على الارتباط مع DNA الخلية مسببة موت الخلية (43). ويعود سبب نقصان Glutathione إلى نقصان فعالية الإنزيم glutathione reductase ( GR ) الذي يعد مسؤولاً عن بناء Glutathione. ويرجع السبب إلى احتواء مستخلص قشور الرمان على مركبات polyphenol و Tannic acid والتي تكون السبب الرئيس في نقصان فعالية الإنزيم GR (44). وقد أشارت إحدى الدراسات إلى أن Polyphenol له القدرة على تغيير عملية الاستسناخ و الترجمة للبروتينات المرتبطة بمضادات الأكسدة الداخلية، من خلال التفاعل أو التداخل مع العناصر المسؤولة عن بناء مضادات الأكسدة (45). وفي دراسة أخرى هدفت إلى تحديد تأثير مركبات Polyphenol ومنها Quercetin ، لوحظ تسببها بأمراض الكلية المزمنة (46)، كما أن بعض أنواع Polyphenol تسبب السرطان (4،48). ويعمل Quercetin (أحد أنواع Polyphenol) على تثبيط O – Methylation في Catechol و estrogen ويتسبب بزيادة نسبتها 60 – 80 % من مادة 2 and 4 hydroxy estradiol ، التي تسبب زيادة دورة الأكسدة والاختزال في Catechol estrogen و estradiol ، والذي يحفز توليد الورم في الكلية (49).
- بينت دراسة (50) أن معاملة ذكور الجرذان بمستخلص القشور سببت نقصان فعالية إنزيمات Lysosome ، حيث إن للمستخلص تأثيراً مثبطاً لفعالية الغشاء البلازمي في Lysosome في الكبد. كما أوضحت نتائج دراسة أخرى أن معاملة ذكور الجرذان بمادة Quercetin قد أدت إلى حدوث نقصان بوزن الجسم وسببت إضراراً بالكلى، ومنها زيادة أعداد الخلايا Hyperplasia و Neoplasia ( نمو غير طبيعي يحدث في الخلايا البطانية لنسببات الكلية ) كما سببت Benign tumor ( ورم حميد يحدث خارج الجسم ولا ينتشر لمناطق أخرى من الجسم ) (46).
- إن المقاطع النسجية لكبد ذكور الجرذان المعاملة بمستخلص القشور أظهرت تغيراً في الدهون في الخلايا الكبدية و تخفيفاً بالجيبانيات الدموية (39).
- ومن خلال نتائج الدراسة الحالية، لوحظ حدوث احتقان دموي congestion في كبد و كلى الفئران المعاملة بالمستخلص بالتركيزين 250 و 500 ملغم / كغم ، بسبب التهاب حاد بالأوعية الدموية نتيجة استرخاء وتمدد الوعاء الدموي، وهذا يتفق مع النتائج التي جاءت في دراسة (51). كما لوحظ أن المعاملة بالمستخلص سببت توقف الخلايا عن الانقسام نتيجة احتوائه على مركبات Phenol ذات التأثير المشابه لتأثير الكولجسين (52)، حيث يرتبط الكولجسين بخيوط المغزل ويمنعها من فصل الكروموسومات بطور Metaphase، ومن ثم لا تنتقل الخلية إلى الطور اللاحق (51). إن سبب الفجوات هو خلل في آلية النقل الأيوني بين الخلية والخلايا المجاورة، بسبب تجمع الماء بين الخلايا (53). أما سبب الارتشاح فهو نتيجة زيادة نفاذية الأوعية الدموية الناجم عن فقدان الأوعية للجسيمات الرابطة Desmosome بين الخلايا، مما يسمح بخروج خلايا الدم البيضاء (51).
- لوحظ أيضاً حدوث ضمور الخلايا المبطنة للنسببات الكلوية الجامعة، بحيث تبرز النوى باتجاه تجاويف النسببات، وقد أوضحت النتائج حصول حالة الضمور atrophy في تلك الخلايا كوسيلة دفاعية ضد مركبات Polyphenol، وبالتالي توسع التجاويف. إن الآلية الكيميائية الحياتية لهذه الحالة ربما تكمن في عملية تخليق وعدم

25. Giannini EG.; Testa R. and Savarino V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canad. Med. Assoc. Licensors*. 172(3):367-379.
26. Pandya S. and Pandya PS. (2012). *Save your kidney*. 1<sup>st</sup> ed. P.: 3.
27. Greger R. (1996). Functions of the kidney, fluid and electrolyte balance. P.: 1471.
28. Kurts C.; Panzer UIF.; Anders HJ. and Rees AJ. (2013). Basic kidney anatomy and physiology. *Nat. Rev. Immunol.* 13 (1):738 -753.
29. Anderson DJ. (2009). Clinical chemistry of the kidney and renal associated physiology. Pp.: 1-2. available at: <http://mycsu.csuohio.edu>
30. Parmar HS. and Kar A. (2008). Medicinal values of fruit peels from *citrussinensis*, *punica granatum*, and *musaparadiasiaca* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *J. Med. Food*. 11: 376-381.
31. Ahmed ATG.; Belal SKM. and Salem AGE. (2014). Protective effect of pomegranate peel extract against diabetic - induced renal histopathological changes in albino rats. *J. Dent. Med. Sci.* 13(10):94-105.
32. Nassar I.; Pasupati Th.; Judson JP. and Segarra I. (2010). Histopathological study of the hepatic and renal toxicity associated with the co-administration of imatinib and acetaminophen in a preclinical mouse model. *Malays. J. Pathol.* 32(1):1-11.
33. Parseh H. ; Hassanpour SH.; Emam-djome Z. and Lavasani ASH. (2012). Antimicrobial properties of Pomegranate ( *Punica granatum L.* ) as a tannin rich fruit :a review . The 1<sup>th</sup> International and The 4<sup>th</sup> National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture. Pp.: 1-6.
34. Shahin HSH.; Sadaghian M.; Maherisis N.; Eshratkhah B. and Chaichisemsari M. (2011). Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep :*in vivo* study. *J. Am. Sci.* 7(5): 896-900.
35. Brune M.; Rossander L. and Hallberg L. (1989). Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Europ. J. Clin. Nut.* 43 (8):547-557.
36. Ray S.; Bagchi D.; Lim PM.; Bagchi M.; Gross SM.; Kothari SC.; Preuss HG. and Stohs SJ. (2001). Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 109(3-4):165-197.
37. Shuang CH.; Chang-Jiang G.; Ji-Jun Y.; Jing-Yu W.; Yunfeng L. and Jing X. (2005). Experimental study on hypolipidemic effect of polyphenolic extract from pomegranate peel. *J. Prev. Med. Chinese People's Liber. Army*. 3: 89-93.
38. Stern JL.; Hagerman AE.; Steinberg PD. and Mason PK. (1996). Phlorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol.* 22(10):1877-1899.
39. Sadeghipour A.; Eidi M.; Kavgani AI.; Ghahramani R.; Shahabzadeh S. and Anissian A. (2014). Lipid lowering effect of *punica granatum L.* peel in high lipid diet fed male rats. *EPC. Alter. Med.* 1-5.
40. Abdel Moneim AE.; Dkhil MA. and Al – Quraishy S. (2011). Studies on the effect of concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *J. Med. Food*. 11(2):376-381.
12. Negi PS.; Jayaprakasha GK. and Jena BS. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem.* 80 (3): 393-397.
13. Choi JG.; Kang OH.; Lee YS.; Chae HS.; Oh YCH.; Brice OO. *et. al.* (2011). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of *punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella* . *Evid. Based. Complem. Alter. Med.* 21(1): 1-8.
14. Al-Olayan EM.; El-Khadragy MF.; Metwally DM. and Abdel Moneim AE. (2014). Protective effects of pomegranate ( *Punica granatum* ) juice on testes against carbontetrachloride intoxication in rats. *BMC Complem. Alter. Med.* 14 (164 ):1-9.
15. Bhandary BS.; Sharmila KP.; Kumari NS. and Bhat SV. (2013). Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract of *punica granatum* (LINN ). Whole fruit and seeds and synthetic ellagic acid in Swiss albino mice. *Asian. J. Pharmaceut. Clin. Res.* 6 (4):192-198.
16. Yaseen NJ. and Al-Attar MSM. (2014). Protective effects of *punica granatum* seed extract against ifosfamide induced sperm abnormalities in male albino mice. *Zanco. J. Pure Appl. Sci.* 26 (2):97-104.
17. Al-Zoreky NS. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punicagranatum L.*) fruit peels. *Int. J. Food. Microbiol.* 134 (3):244-248.
18. Ajaikumar KB.; Asheef M.; Babu BH. and Padikkala J. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum L.* (pomegranate) methanolic extract. *J. Ethnopharmacol.* 96(1-2):171-176.
19. Bhargavan D.; Shetty H. and Krishna AP. (2015). Ameliorative effect of *punica granatum* ethanolic extract in cyclophosphamide induced toxicity in male Wistar rats . *Int. J. Appl. Biol. Pharmaceut. Technol.* 6 (3):229-236.
20. Khalil EAM. (2004). Antidiabetic effect of an aqueous extract of pomegranate (*punica granatum L.*) peels in normal and alloxan diabetic rats. *Egypt. J. Hosp. Med.* 16(1): 92-99.
21. Reddy MK.; Gupta SK.; Jacob MR.; Khan SI. and Ferreira D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *punica granatumL.* Research Institute of Pharmaceutical Sciences. pp.:1-7.
22. Abdul- Ghani ZS.; Azez ZS.; Gedhan AF. and Hussen RA. (2010). *In vitro* cytotoxicity activity of *punica granatum* rind extract against RD cell line .*Iraq. J. Cancer Med. Gen.* 3 (1):17-20.
23. Ulusoy E. and Eren B. (2006). Histological changes of liver glycogen storagein mice (*Mus musculus* ) caused by high-protein diets. *Histol. Histopathol.* 21(1):925-930.
24. Baratta JL.; Ngo A.; Lopez B.; Kasabwalla N.; Longmuir KJ. and Robertson RT. (2009). Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem. Cell Biol.* 131(6):713–726.

- compounds in *Lycopersicon Esculentum* mill. Gen. Molec. Biol. 8(1): 187-192.
53. Bigoniya P.; Singh CS. and Shukla A. (2009). A comprehensive review of different liver toxicants used in experimental pharmacology. Int. J. Pharmaceut. Sci. Drug Res. 1(3):124-135.
54. Kumar V.; Abbas AK.; Fausto N. and Mitchell RN. (2007). Robbins basic pathology. 8<sup>th</sup> ed . Saunders Elsevier. Pp.:632-634.
- pomegranate ( *punica granatum* ) juice and peel on liver and kidney in adult male rats. J. Med. Plants Res. 5(20):5083-5088.
41. Dkhil MA.; Al – Quraishy S. and Abdel Moneim AE. (2013). Effect of pomegranate ( *punica granatum* L .) juice and methanolic peel extract on testis of male rats. Pakistan J. Zool. 45(5):1343-1349.
42. Tachakittirungrod S.; Okonogi S. and Chowwanapoonpohn S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. Food Chem. 103 (2):381-388.
43. Abdel Moneim AE. (2012). Antioxidant activities of *punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. J. Med. Plants Res. 6(2):195-199.
44. Adams LS.; Seeram NP.; Aggarwal BB.; Takada Y.; Sand D. and Heber D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalag in suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. J. Agric. Food Chem. 54 (3):980-985.
45. Moskaug J.; Carlsen HM.; Myhrstad MC. and Blomhoff R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. Am. J. Clin. Nutr. 81(1): 277S-283S.
46. Dunnick JK. and Hailey JR. (1992). Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. Fundam. Appl. Toxicol. 19(3):423-431.
47. Hirose M.; Takesada Y.; Tanaka H.; Tamano S.; Kato T. and Shirai T. (1998). Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. Carcinogen. 19(1):207-212.
48. Catterall F.; Souquet JM.; Cheynier V.; Pascual-Teresa SD.; Santos-Buelgan C.; Clifford MN. and Ioannides C. (2000). Differential modulation of the genotoxicity of food carcinogens by naturally occurring monomeric and dimeric polyphenolics . Environ. Molec. Mutagen. 35(2):86-98.
49. Wyllie S. and Liehr JG. (1998). Enhancement of estrogen-induced renal tumorigenesis in hamsters by dietary iron. Carcinogen. 19(7):1285–1290.
50. Osman M.; Ahmed M.; Mahfouz S. and Elaby SH. (2011). Biochemical studies on the hepatoprotective effects of pomegranate and guava ethanol extracts. NY. Sci. J. 4 (3):27-41.
51. حسين، عبيد محمد، جاسم، بسمة علي، حبيب، سنا محمد، جاسم ، نور نعيم. (2015). تأثير المستخلص الكحولي لنبات السعد *Cyperus rotundus* في الكبد في ذكور الفئران البيضاء . مجلة بغداد للعلوم. 12(1): 27–33.
52. Bals A.; Capraru G.; Danaila M. and Popa VI. (2007). Cytogenetic effects induced by phenolic

## دراسة تأثير عقار الليفيتراسيتام في عملية نشأة النطف وأعداد خلايا لايدك وسرتولي وأقطار وسمك النيببات المنوية في الفأر البالغ

نهلة عبد الرضا البكري، فائزة جبار جودة

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد/ جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: fayzzabio@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

أجريت هذه الدراسة بهدف التعرف على التأثيرات التي يحدثها عقار الليفيتراسيتام في النسبة المنوية لنشأة النطف وتأثيره في أعداد خلايا لايدك وخلايا سرتولي وأقطار وسمك النيببات المنوية في الفئران البيضاء، حيث جرعت الحيوانات عن طريق أنبوب المعدة، بجرعة 0.1 مل من العقار. قسّمت الحيوانات المعاملة إلى ثلاث مجموعات: المجموعة الأولى جرعت بالعقار لمدة 14 يوماً، والمجموعة الثانية جرعت لمدة 30 يوماً، أما المجموعة الثالثة فجرعت بالعقار لمدة 45 يوماً. وقد أجريت الاختبارات على المجموعات التجريبية وتمّ مقارنتها بمجموعة السيطرة، حيث لوحظ انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في النسبة المنوية ليزرات النطف spermatogonia في خصى الحيوانات المعاملة بالعقار لمدة (14، 30، 45) يوماً مقارنة مع مجموعة السيطرة وللأيام نفسها. كما ارتفعت معنوياً ( $P < 0.05$ ) النسبة المنوية لخلايا النطف الأولية Primary spermatocyte، وخلايا النطف الثانوية Secondary spermatocyte، وطلائع النطف Spermatid للحيوانات المعاملة بالعقار لمدة (14، 30، 45) يوماً عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة وللأيام نفسها. وانخفضت النسبة المنوية معنوياً ( $P < 0.05$ ) لعدد النطف Spermatozoa في الحيوانات المعاملة بالعقار لمدة (14، 30، 45) يوماً عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة. وانخفضت أعداد خلايا لايدك وأقطار أنوبيتها معنوياً ( $P < 0.05$ ) في الحيوانات المعاملة بالعقار لمدة (14، 30، 45) يوماً عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة. وانخفضت أعداد خلايا سرتولي معنوياً ( $P < 0.05$ ) للحيوانات المعاملة بالعقار لمدة (14، 30، 45) يوماً عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة.

**الكلمات المفتاحية:** خلايا النطف الثانوية، خلايا لايدك، أقطار الأنوية، طلائع النطف، عقار الليفيتراسيتام

## Study the effect of levetiracetam on spermatogenesis with special focus on leyding, sertoli cells and seminiferous tubules thickness and diameter in adult albino mice

Nahla A. Al-Bakri and Faiza J. Juda

Dept. of Biology/ College of Education for Pure Sciences (Ibn- Al- Haitham) / University of Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The present study was conducted to determine the effect the of levetiracetam drug on spermatogenesis, numbers of leydig cells and diameter of Leydig nucleus, numbers of setoli cells and seminiferous tubules thickness and diameter in albino mice.

The animals were treated via stomach tube with one dose 0.1 ml. Treated animals were divided in three groups: first group was treated with drug and lasted for (14) days, the second group was treated with drug and lasted for (30) days, while the third group treated with drug and lasted for (45) days. The treated animals were compared with control group. Results showed significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the percentages of spermatogonia of treated animals with drug 14,30,45 days when compared with the control group. Results also showed significant increase ( $p < 0.05$ ) in the percentage of primary, secondary spermatocyte and spermatid of treated animals with drug in 14,30,45 days when compared with the control and significant decrease ( $p < 0.05$ ) of spermatozoa in treatment animals for 14, 30, 45 days compared with the control group. A significant decrease ( $P < 0.05$ ) was shown in the number of leydig cells and diameter of leydig nucleus of treated animals with drug for 14, 30, 45 days when compared with the control group. A significant decrease ( $p < 0.05$ ) in number of setoli cells of treated animals with drug 14, 30, 45 days when compared with the control group. A significant decrease ( $p < 0.05$ ) in both of mean of diameter and thickness of seminiferous tubules were observed of treated animals with drug 14,30, 45 days when compared with control group.

## المقدمة

عن طريق الفم، ويتم التخلص منه عن طريق طرحه من الكلى دون تغيير في شكله، وتتم آلية الطرح بالترشيح الكبيبي (20). أجريت العديد من الدراسات لمعرفة تأثير عقار ليفيتيراسيتام على أنسجة مختلف الأعضاء في الجسم، كدراسة أجريت لمعرفة تأثير العقار في سمك الحاجز الخلالي في مقاطع الرئة واضطراب وظائف الرئة (21). وقد تم تنفيذ الدراسة الحالية لمعرفة تأثير هذا العقار في عملية نشأة النطف وخلايا سرتولي وخلايا لايدك وأقطار أنويتها وقطر وسمك النبيبات المنوية.

## المواد وطرق العمل

تم استخدام عقار ليفيتيراسيتام والمجهز من قبل شركة UCB (pharma, Inc., Smyrna, Ga., USA)، على شكل شراب فموي سائل Oral Solution، وتم عمل تركيز واحد فقط (1.14) day/kg/mg، وجرى حفظه في مكان بارد لحين الاستعمال. شملت عينة الدراسة أربعين فأراً، من نوع *Mus musculus* (Swiss mice) من سلالة ABIB/C، تم الحصول عليها من مركز الرقابة الدوائية، وبلغ معدل أوزانها 24-28 غم و تراوحت أعمارها 8-12 أسبوعاً. نقلت الفئران إلى البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة ( ابن الهيثم ) / جامعة بغداد، وتم وضع كل 10 فئران في أقفاص بلاستيكية ذات أغشية معدنية مشبكة، تحت ظروف مختبرية موحدة من حيث الإضاءة ودرجة الحرارة والتهوية. كما أعطيت العليقة الخاصة والماء بصورة مستمرة. قسّمت الفئران إلى أربعة مجموعات. المجموعة الأولى جرعت بالعقار لمدة 14 يوماً، والمجموعة الثانية جرعت بالعقار لمدة 30 يوماً، والمجموعة الثالثة جرعت لمدة 45 يوماً، فيما اعتبرت المجموعة الرابعة مجموعة السيطرة وعوملت بالماء المقطر. تم التضحية بالحيوانات بعد الانتهاء من المعاملة، بطريقة الخلع الشوكي (Cervical dislocation)، وذلك بنثيت رأس الحيوان وسحب الذيل باستعمال مقص حاد، ثم عمل شق طولي في المنطقة الوسطى أسفل البطن حتى عظم القص لاستئصال الخصى Testes. وبعد إزالة المادة الدهنية المتصلة بها بواسطة ورق ترشيح، وضعت في محلول تثبيث بوبن (Bouin's solution) لغرض إجراء الدراسة النسجية لها، حيث تم تحضير المقاطع النسجية وفق طريقة (22)، حيث غسلت العينات عدة مرات بالكحول الإيثيلي 70% . تم تمرير العينات بعد ذلك بسلسلة تصاعدية من الكحول الإيثيلي ابتداءً من 70%-100% لمدة نصف ساعة لكل تركيز، بعدها وضعت بالزايلين لمدة 15 دقيقة، ثم وضعت العينات بخليط من الزايلين وشمع البارفين المنصهر بدرجة (56-58 °C) بنسبة (1:1) لمدة 15 دقيقة في الفرن الحراري بدرجة (60 °C). بعدها شربت العينات بوضعها في الشمع المنصهر مرتين ولمدة ساعة لكل مرة، ثم تم صب العينات في قوالب شمع وتركزت حتى تتصلب. بعدها تم تقطيعها بواسطة جهاز المشراح الدوار Microtome، وبسمك 5 مايكروميتر. تم عمل مقاطع مستعرضة من الخصى (23)، ثم ألصقت الأشرطة المتضمنة للمقاطع، بعدها تم تلوينها بالملون هيماتوكسيلين - أوسين (Eosin Hematoxylin). تم احتساب النسبة المئوية لخلايا نشأة النطف لعشر قراءات لكل عينة (حيوان) بحسب طريقة (24)، كما تم احتساب أعداد خلايا لايدك وسرتولي لعشرة قراءات لكل عينة (حيوان) وتم قياس أنوية خلايا لايدك بحسب طريقة (25). تم قياس أقطار وسمك النبيبات المنوية لعشرة نبيبات منوية لكل حيوان (26)، بواسطة برنامج تحليل الصور الرقمي Digital image analyzing soft wares (26).

عقار ليفيتيراسيتام Levetiracetam (LEV) هو من العقاقير المضادة للصرع من الجيل الثاني. تم اكتشافه أول مرة في أوائل عقد الثمانينات من القرن الماضي، وتمت الموافقة عليه من قبل منظمة الغذاء والدواء الأمريكية في عام 1999، وسرعان ما أصبح واحداً من الأدوية التي توصف على نطاق واسع لعلاج الصرع الجزئي والمعمم (1). كما تمت الموافقة عليه من قبل وكالة الأدوية الأوروبية لاستخدامه كعلاج وحيد في علاج النوبات الجزئية بدايةً مع أو بدون تعميم ثانوي في المرضى بعمر 16 عاماً، الذين يعانون من الصرع والذي تم تشخيصهم حديثاً، وفي علاج حالات نوبات الرمع العضلي عند البالغين والمراهقين من 12 سنة من العمر الذين يعانون من الصرع الرمعي للأحداث، وفي علاج النوبات التوترية الارتجاجية المعقدة الأولية في البالغين والمراهقين من 12 سنة من العمر والذين يعانون من الصرع المعمم مجهول السبب (2)، (3)، كما تمت الموافقة على استخدامه كأقراص في الهند عام 2005 (4).

قد تؤثر العقاقير المضادة للصرع في التكاثر (5)، ففي دراسة أجريت للمرضى الذين يعانون من الصرع، لوحظ انخفاض في معدلات الإنجاب لكل من الذكور والإناث الذين يتناولون الأدوية المضادة للصرع، وخصوصاً لدى الذكور (6). وهناك العديد من العقاقير المضادة للصرع الشائعة مثل الفينوباربيتال (PB) Phenobarbital، الفينيتوين (PHD) Phenytoin، كاربامازيبين (CBZ) Zarbamazepine. وتعد هذه العقاقير من عقاقير الجيل الأول المضادة للصرع، عندما تؤخذ كعلاج وحيد ترتبط مع مستويات المصل SHBG العالية، ويترتب على ذلك تضالو الأندروجين والإسترايول الحرة Free androgen and estradiol، والذي قد يكون السبب وراء المشاكل التي تحدث في الوظيفة الجنسية لدى كل من الرجل والمرأة تحت تأثير العلاج، حيث يتم تصنيع الهرمون الجنسي المرتبط بالجلوبين Hormone Sex banding Glubin (SHBG) في الكبد، وهو يربط وينظم النشاط الحيوي لكل من هرمون الشحمون الخصوي والإسترايول (7، 8).

ونظراً لزيادة الآثار الجانبية الناتجة من استخدام عقاقير الجيل الأول المضادة للصرع، وتداخلها مع العقاقير الأخرى، فضلاً عن كونها تتطلب مراقبة علاجية (9)، تم استبدالها بعقاقير الجيل الثاني الجديدة. إلا أن بعض الدراسات قد أوضحت أن لعقار حامض الفاليرييك (VPA) تأثيراً على خصوبة الذكور، حيث يعمل عقار حامض الفاليرييك (VPA) Volaproic acid على تقليل مصل الكونادوتروبين والأندوستيرون في الرجال. وقد تبين أنه يؤثر في حركة الحيوانات المنوية ويترافق مع زيادة في تكرار وجود حيوانات منوية غير طبيعية (5، 8، 10).

يعد عقار ليفيتيراسيتام من عقاقير الصرع الجديدة المستخدمة على نطاق واسع كبديل لعقار (VPA) للكثير من المرضى منذ أن اكتشفت الآثار الجانبية له على الغدد التكاثرية (11)، ومع ذلك، فقد أوضحت دراسة (12) أن تعرض خلايا الغدة الكظرية خارج الجسم *In vitro* لتراكيز عالية من عقار ليفيتيراسيتام يؤدي إلى خفض هرمون الشحمون الخصوي. وقد أشارت دراسة (13) إلى أن عقار ليفيتيراسيتام يسبب ضرر الجهاز التكاثري في الفئران البيضاء. يستعمل عقار ليفيتيراسيتام (LEV) في علاج الصرع الحساس وفي علاج الرمع العضلي بعد التهاب الدماغ الحاصل من نقص الأكسج (5)، كما يستخدم في علاج حالات غير صرعية كالهوس ومتلازمة توريت Tourette syndrome، وخلل الحركة المتأخرة Tradive dyskinesia، واضطراب القلق، وإصابات الدماغ والسكتة الدماغية (14-17).

الاسم الكيميائي للعقار هو Levetiracetam، ويكون مفرداً متمثلاً سوريا وهو - الفا - أثيل - 2 - أوكسو - 1 - بيروليدين - S-alphaethyl - z-oxo-1-pyrrolidine acetamide (18، 19).

يعد عقار ليفيتيراسيتام (LEV) سريع الامتصاص وبشكل كامل بعد تناوله عن طريق الفم، ويصل تركيز الذروة بعد ساعة من تناوله تم التقاط صور فوتوغرافية للعينات باستعمال مجهر تصوير نوع MELST بكاميرا Canon في مختبر الأجنة المتقدم في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة ( ابن الهيثم ) / جامعة بغداد . تم تحليل النتائج إحصائياً بتطبيق اختبار ONE WAY Anova ضمن المستوى (P<0.05) (27).

## النتائج

## التغيرات في النسبة المئوية لخلايا نشأة النطفة

بينت نتائج الدراسة الحالية انخفاضاً معنوياً ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية لبزرات النطف في خصى الحيوانات المعاملة بعقار الليفيتراسيتام لمدة 14، 30، 45 يوماً مقارنة مع مجموعة السيطرة. كما سجلت النتائج زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية لخلايا النطف الأولية للخصى المعاملة بالعقار للأيام 14 و 30 و 45 يوماً بعد التجريب عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (جدول رقم 1، شكل رقم 1).

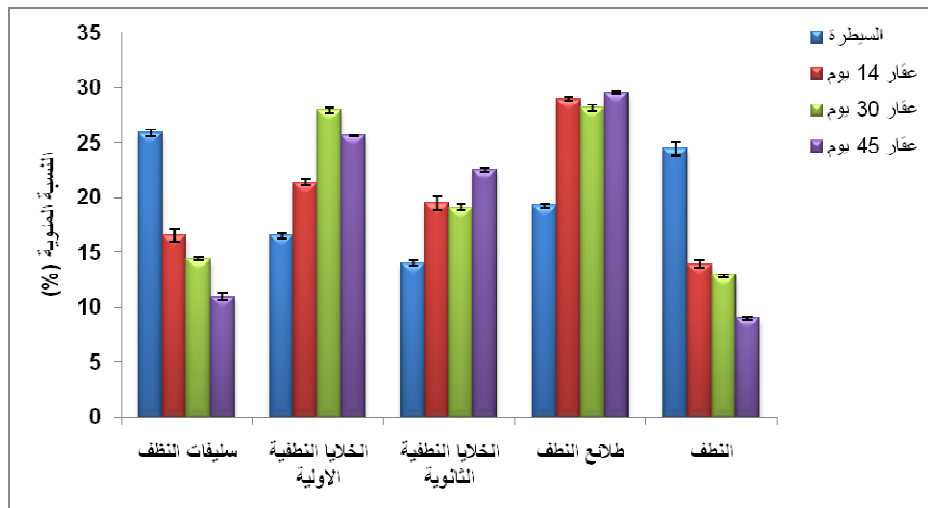
وأظهرت النتائج وجود زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية لخلايا النطف الثانوية في الحيوانات المعاملة بعقار الليفيتراسيتام للأيام 14، 30، 45 يوماً بعد التجريب عند المقارنة مع مجموعة السيطرة. وأدت المعاملة بالليفيتراسيتام إلى حدوث زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية لطلائع النطف للحيوانات المعاملة للأيام 14، 30، 45 يوماً بعد التجريب عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة.

وسجلت النتائج وجود انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في النسبة المئوية لعدد النطف للحيوانات المعاملة بالعقار 14، 30، 45 يوماً بعد التجريب عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة.

جدول رقم (1): تأثير العقار في النسبة المئوية لخلايا نشأة النطف في النبيتات المنوية

مدة المعاملة	N	سليقات النطف	الخلايا النطفية الأولية	الخلايا النطفية الثانوية	طلائع النطف	النطف
Mean± S.E.						
السيطرة	10	25.860±0.317	16.540±0.224	14.020±0.247	19.220±0.165	24.480±0.652
عقار 14 يوم	10	16.540±0.510 <sup>A</sup>	21.360±0.271 <sup>A</sup>	19.500±0.659 <sup>A</sup>	29.000±0.148 <sup>A</sup>	13.940±0.332 <sup>A</sup>
عقار 30 يوم	10	14.440±0.120 <sup>A</sup>	25.660±0.235 <sup>A</sup>	19.080±0.245 <sup>A</sup>	28.160±0.276 <sup>A</sup>	12.880±0.159 <sup>A</sup>
عقار 45 يوم	10	10.960±0.348 <sup>A</sup>	27.940±0.074 <sup>A</sup>	22.500±0.192 <sup>A</sup>	29.580±0.097 <sup>A</sup>	9.020±0.142 <sup>A</sup>

A وجود فروق معنوية ( $p < 0.05$ ) مقارنة بمجموعة السيطرة



شكل رقم (1): تأثير عقار الليفيتراسيتام في النسبة المئوية لخلايا نشأة النطف

## التغيرات في أعداد الخلايا

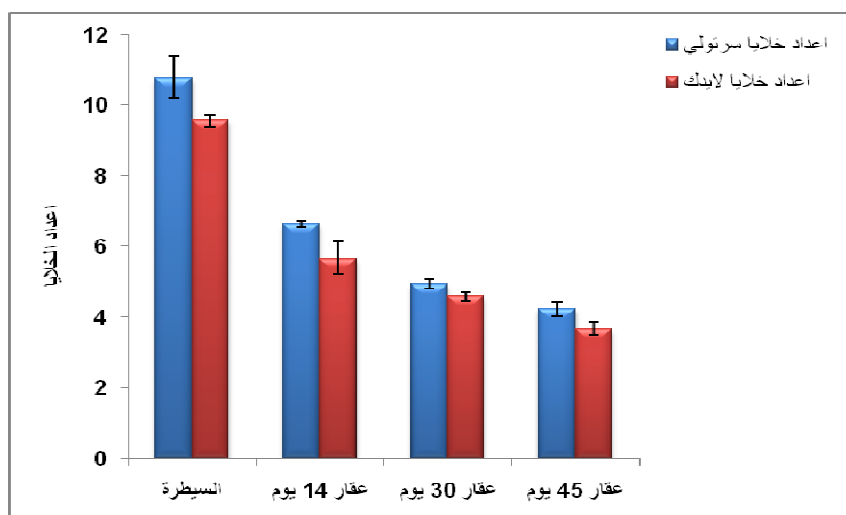
بينت النتائج حدوث انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في أعداد خلايا سرتولي للحيوانات المعاملة بالعقار للأيام 14، 30، 45 يوماً بعد التجريب عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (جدول رقم 2، شكل رقم 2).

وبينت النتيجة الحالية انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في أعداد خلايا لايدك للحيوانات المعاملة بالعقار لمدة 14، 30، 45 يوماً عند المقارنة مع مجموعة السيطرة. كما أظهرت وجود انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في أقطار أنوية خلايا لايدك في الحيوانات المعاملة للأيام 14، 30، 45 يوماً بعد التجريب عند المقارنة مع مجموعة السيطرة (شكل رقم 3).

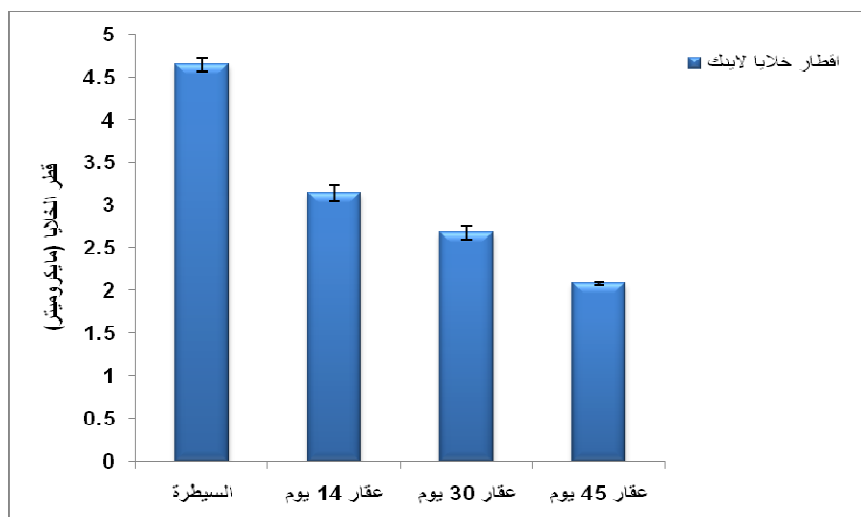
جدول رقم (2): تأثير العقار في أعداد خلايا سرتولي وأقطار أنوية خلايا لايدك

مدة المعاملة	N	أعداد خلايا سرتولي	خلايا لايدك	
			الأعداد	أقطار الأنوية (مايكرومتر)
			Mean± S.E.	
السيطرة	10	10.800±0.599	9.580±0.185	4.651±0.081
عقار 14 يوم	10	6.660±0.081 <sup>A</sup>	5.680±0.459 <sup>A</sup>	3.147±0.093 <sup>A</sup>
عقار 30 يوم	10	4.960±0.116 <sup>A</sup>	4.600±0.134 <sup>A</sup>	2.677±0.0790 <sup>A</sup>
عقار 45 يوم	10	4.240±0.206 <sup>A</sup>	3.700±0.192 <sup>A</sup>	2.080±0.021 <sup>A</sup>

A وجود فروق معنوية ( $p < 0.05$ ) مقارنة بمجموعة السيطرة



شكل رقم (2): تأثير عقار الليفتراستام في أعداد خلايا لايك وخلايا سرتولي



شكل رقم (3): تأثير عقار الليفتراستام في أقطار أنوية خلايا لايدك

45 يوما بعد التجريب عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة. كما سجلت النتائج انخفاضاً معنوياً ( $P < 0.05$ ) في سمك جدار النيبات المنوية للحيوانات المعاملة بالعقار للأيام 14، 30، 45 يوما بعد التجريب عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (جدول رقم 3، شكل رقم 4).

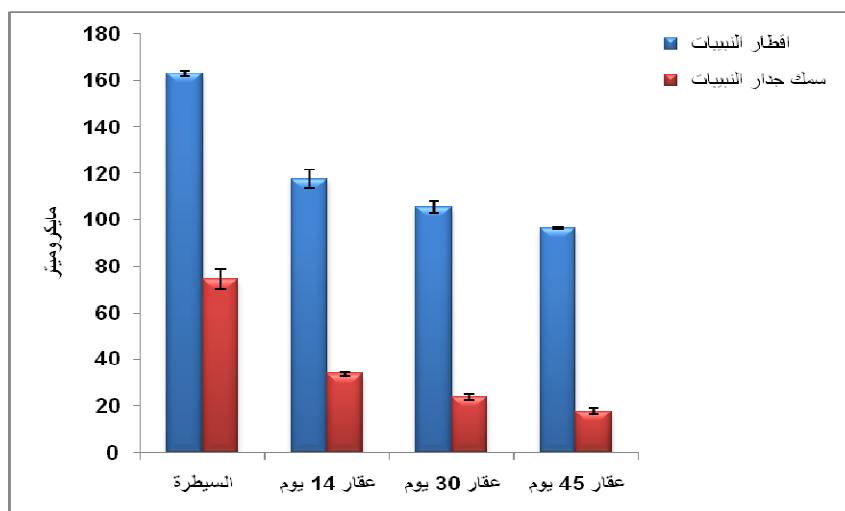
#### التغيرات الحاصلة في النيبات المنوية

أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في معدل أقطار النيبات المنوية للحيوانات المعاملة بالعقار لمدة 14، 30،

جدول رقم (3): تأثير العقار في قطر وسمك النيبات المنوية

سمك جدار النيبات (مايكرومتر)	أقطار النيبات (مايكرومتر)	N	مدة المعاملة
Mean± S.E.			
74.618±4.220	163.307±1.320	10	السيطرة
33.710±0.778 <sup>A</sup>	117.749±3.874 <sup>A</sup>	10	عقار 14 يوم
24.018±1.269 <sup>A</sup>	105.658±2.555 <sup>A</sup>	10	عقار 30 يوم
17.707±1.433 <sup>A</sup>	96.328±0.486 <sup>A</sup>	10	عقار 45 يوم

A. وجود فروق معنوية ( $p < 0.05$ ) مقارنة بمجموعة السيطرة



شكل رقم (4): تأثير عقار الليفتراسيتام في أقطار وسمك النسيبات المنوية

الكالسيوم في الخلايا يعتبر المفتاح أو الإشارة الأولى لبدء عملية الانقسام والتمايز والنضج للخلايا المنشأة للنفطة. وهناك احتمال آخر لتذبذب عملية نشأة النفطة هو أن الكالسيوم دورا مهما في تحفيز خلايا سرتولي، والخلايا الهيكلية في إفراز البروتين الرابط للأندروجين (34)، وأن للأندروجين دورا مهما في تكوين الروابط البروتوبلازمية بين خلايا سرتولي. وقد أشارت دراسة (35) إلى أن LEV يرتبط مع  $SV_2A$ ، والذي يتم توزيعه على نطاق واسع في معظم أنسجة الغدد الصم، بما في ذلك مناسل الذكور وعقار الليفتراسيتام، يعمل على خفض مستوى الكالسيوم من خلال سد قنوات  $Ca^{+}$  (32).

إن تكوين الروابط البروتوبلازمية بين خلايا سرتولي تعتمد على الإندروجين من خلال تحفيز تدفق أيونات الكالسيوم حيث يعطي الكالسيوم الإشارة الأولى لبدء تنظيم الارتباط بين الروابط البروتوبلازمية وخلايا سرتولي والتي هي من نوع Gap junction فضلا عن ذلك فإن للكالسيوم دورا مهما في تحفيز خلايا سرتولي والخلايا الهيكلية في إفراز البروتين الرابط للأندروجين (34). كما أشارت دراسة (36) إلى أن الروابط البروتوبلازمية بين خلايا سرتولي لها أهمية في المحافظة على عدد تلك الخلايا وأداء وظيفتها في إفراز البروستوكلاندين Prostaglandin D-S PG D-S، والذي له أهمية في عملية نشأة النفطة. وقد أثبتت الدراسة نفسها (36) إلى أنه عندما تكون الروابط بين خلايا سرتولي، تبدأ بإفراز P GD-S، ويكون هذا مترافقا مع نشأته في الحاجز الدموي الخصوي Blood testis barrier، وكذلك بينت دراسة (36) أن تمزق الروابط بين خلايا سرتولي يؤدي إلى موتها وانخفاض عددها، وهذا يفسر سبب انخفاض أعداد خلايا سرتولي في هذه الدراسة في خصى الفئران المعاملة بعقار الليفتراسيتام.

كما أشارت دراسة (37) إلى وجود منطقة تعرف بالمنطقة المتخصصة للهيليول Ecotoplasmic specialization بين خلايا سرتولي وطلائع النفط، وأن نقص منسوب هرمون الشحمون الخصوي سوف يعطل الارتباط بين خلايا سرتولي وطلائع النفط. ومن المعروف أن خلايا سرتولي لها دور في حماية وتغذية الخلايا المولدة للنفط، ويعتقد أن هذا يفسر زيادة عدد طلائع النفط وعدم تحولها إلى نطف بلبلة أو موت خلايا سرتولي، مما يؤدي إلى انفصالها، وجودها في وسط تجويف النبيب المنوي. كما أن انخفاض أعداد خلايا لايدك وأقطار أنويتها قد يكون سبب تأثير عقار الليفتراسيتام سلباً في خلايا لايدك، حيث أشارت دراسة (38) إلى أن الفشل الوظيفي في خلايا لايدك أو قلة عددها يؤثر في وظيفتها في تكوين الخمائر الستيرويدية وخميرة PGD. كما أوضحت الدراسة نفسها أن انخفاض مستوى الإندروجينات سببه قلة أعداد خلايا لايدك وتمايزها، وهذا يؤثر في عملية نشأة النفطة (38). وقد اعتمد تفسير نتائج الدراسة الحالية على هذا الأساس، وجاءت متفقة مع دراسة (39) في تسبب عقار الليفتراسيتام بضرر الجهاز التكاثري في الفئران البيضاء، في حين اختلفت نتائج الدراسة

## المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تأثير أعداد الخلايا المنشأة للنفطة ولجميع المراحل وللفترات الزمنية المختلفة 14، 30، 45 يوما على التوالي بعد التجريب مقارنة مع مجموعة السيطرة، حيث لوحظ حدوث انخفاض معنوي ( $P < 0.05$ ) في عدد خلايا سرتولي وخلايا لايدك وأقطار أنوية خلايا لايدك في الحيوانات المعاملة للأيام 14، 30، 45 يوما على التوالي بعد التجريب عند المقارنة مع مجموعة السيطرة للأيام نفسها. وقد يعود سبب ذلك إلى تأثير هرمون الشحمون الخصوي بالعقار، وقد أشارت نتائج دراسة (28) إلى أن قلة أعداد خلايا لايدك يؤدي إلى خفض مستوى هرمون الشحمون الخصوي الذي يكون ضرورياً لخلايا سرتولي، التي تعمل على دعم عملية نشأة النفطة. كما أوضحت نتائج دراسة (29) أن تعرض خلايا الغدة الكظرية خارج الجسم *in vitro* لتركيز عالية من عقار الليفتراسيتام يؤدي إلى خفض مستوى هرمون الشحمون الخصوي، الذي يلعب دوراً كبيراً في عملية نشأة النفطة، فهو يحفز تكوين بزررات النطف من الطبقة الطلائية الجرثومية للنسيبات المنوية والضرورية لتكوين الخلايا النطفية وطلائع النفط، وأن التذبذب الحاصل في أعداد الخلايا النطفية الأولية والثانوية يعتمد على انقسامات سليفات النفط وتحولها إلى هذه الخلايا ضمن مرحلة الانقسام الانتصافي. ويمكن تفسير نتائج الدراسة الحالية فيما يتعلق بالنسبة المنوية لأعداد الخلايا المنشأة للنفطة بأن المعاملة بالليفتراسيتام ربما سببت انخفاضاً في مستوى هرمون الشحمون الخصوي، مما نتج عنه انخفاض في أعداد خلايا سرتولي والذي ربما يكون التذبذب الحاصل في أعداد خلايا النطفية سبباً له. وقد أشارت بعض الدراسات المناعية إلى وجود علاقة متداخلة بين خلايا سرتولي والخلايا الجرثومية. فقد بينت دراسة (30) دور خلايا الجرثومية في تنظيم وإفراز  $\alpha-2$  Macroglobulin من قبل خلايا سرتولي، مما أثر سلباً في العمليات الانتصافية وتسبب في حدوث اضطراب في عملية نشأة النفطة.

وقد اعتمدت الدراسة الحالية على هذا الأساس في تفسير التذبذب الحاصل في عملية نشأة النفطة من جراء استخدام عقار الليفتراسيتام. وجاءت نتائج الدراسة الحالية مخالفة لدراسة (31)، وهناك احتمال آخر بأن عقار الليفتراسيتام يسبب انخفاضاً في مستوى الكالسيوم والصوديوم في الدم (32)، وأن لأيونات الكالسيوم والبوتاسيوم دوراً مهماً في عملية نشأة النفطة، وأن انسداد قنوات البوتاسيوم يعني خفض مستواه، ويؤثر في تحول الخلايا النطفية، ويؤثر كذلك في المراحل المبكرة لعملية التحول النطفي لطلائع النفط. أما انسداد قنوات الكالسيوم يتسبب في تثبيط حيوية ونضج النفط والتفاعل الأكروسوميكا. أشارت دراسة (33) أن مستوى



13. Urso L.; Zummo L.; Gammino M.; Fierro B.; Pavone C. and Daniele O. (2014). Anti epileptic drugs sexual function and serum hormonal profile in males with epilepsy. *Med. Surg. Urol.* 3(1):1-5.
14. Ben-Menachem E. (2003). Preliminary efficacy of levetiracetam in monotherapy. *Epilep. Disord.* 5(Supl.): s551-s555.
15. Kavishna K.; Raut AL.; Gohel KH. and Dove P. (2011). Levetiracetam . *JAPI.* 59: 652-654.
16. Woods SW.; Skasa JR.; Baker CB.; Cohen SJ. and Tek C. (2008). Effect of levetiracetam on tordire dyskinesia: a randomized, double – blind , placebo- controlled study . *J. Clin. Psychiat.* 62:546-554.
17. Farooq MU.; Bhatt A.; Majid A.; Gupta R. and Khasnis A.(2009). Two years of experience in the treatment epilepticus with intravenous levetiracetam, *Epilep. Behav.* 15:467-469.
18. Hedderick EF.; Morris CM. and Singer HS. (2009). Double – blind, Cross ver study of clonidine and levetiracetam in Tourette syndrome. *Pediatr. Neural.* 40:420-425.
19. Bialera M.; Johannessn SI.; Kupferbery HI.; Levy RH.; Perucca E. and Tomson T. (2004). Progress report on new antiepileptic drug : a summary of the seventh Eilat conference (EILAT VII). *Epilep. Res.* 61:1-48.
20. Hasan HS. and Nabil JA.(2011). Levetiracetam extended release as adjuvant therapy for the control of partial – onset seizures. *J.Cent. Nerv. Syst. Dis.* 3:17-25.
21. Omer H. and Kutb M.(2014). Chronic histopathological effects of levetiracetam on some internal organs of adult albino rats. *J. Forensic. Sci.* 5:41-45.
22. Kiernan JA. (2002). Histochemical methods (theory and practice) 3<sup>rd</sup> ed. Butter Worth Heinemann, Oxford. Pp.: 1-6.
23. Spano M.; Bartoleschi C.; Cordelli E.; Leter G.; Tiveron C. and Pacchierotti F. (1996). Flow cytometric assessment of trophosphamide toxicity on mouse spermatogenesis. *Cytometr.* 24:174-180.
24. Al-Wachi SN and Balash KJ. (1988). Induced alteration in spermatogenesis of mature albino mice injected with caffeine. *J.Biol.Sci.Res.*19:457-4.
25. Flickinger CJ. and Loving CK.(1976). Fine structure of the testis and epididymis of rats treated with cyproterone acetate. *Amm. J. Anat.* 146:359-384.
26. France LR.; Leal MC.; Sasso- Cerri E.; Vasconcelos A.; Debeljuk L. and Russell LD. (2000). Cimetidine (Tagamet) is are productive toxicant in male rats effecting peritubular cells. *Biol. Reprod.* 63:1403-1421.
27. Hogy RV. and Balash KJ.(1988). Induced alteration in spermatogenesis of mature albino mice injected with caffeine. *J. Biol. Sci. Res.* 19 :457-466.
28. Fattah E.; Parivar K.; Jorsaraei G. and Moghadamina A.(2009). The effects of diazinon on testosterone, FSH and LH levels and testicular tissue in mice. *J. Reprod. Med.*7(2): 59-64.
29. Krogh K.; Harjen H.; Almas C.; Zimmer K.; Dahl E.; Olsaker I.; Tauboll E.; Ropstad E. and Verhaegen A. (2010).The effect of valproate and

الحالية مع نتائج دراسة (31) التي أفادت بأن عقار الليفتراسيتام ليس له تأثير في الوظيفة التكاثرية. بينت الدراسة الحالية حدوث انخفاض معنوي ( $P<0.05$ ) في معدل أقطار النبيبات المنوية وسمك جدرانها للحيوانات المعاملة بالعقار للأيام 14، 30، 45 يوما بعد التجريع، وانخفاض معنوي عند المقارنة بين المجموعات التجريبية ( جدول رقم 1). ويعتقد أن سبب الانخفاض الحاصل في أقطار النبيبات وسمك جدارها يعود إلى ضمور النبيبات المنوية ونقص التنسج، وضمور ظهارتها الجرثومية من جراء تأثير العقار في مستوى هرمون الشحمون الخصوي. وقد بينت نتائج دراسة (28) إلى أن التراكم العالية من عقار الليفتراسيتام تؤدي إلى خفض مستوى هرمون الشحمون الخصوي. وتكمن أهمية الشحمون الخصوي كونه هرمونا بنائيا Anabolic hormone، بالإضافة إلى أهميته في عملية الانقسام الخلوي في الأنسجة الخصوية. وعلى هذا الأساس فسرت نتائج الدراسة الحالية في حدوث انخفاض معنوي في أقطار وسمك النبيبات المنوية، فجاءت متفقة مع دراسة (28)، ومخالفة لدراسة (31).

#### المصادر

1. Potschka H.; Baltes S. and Loscher W. (2004). Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood – brain barrier penetration of levetiracetam in rats . *Epilep. Res.* 58: 85-91.
2. Philip N.; Patsalos F. and Bourgeois D. (2010). Levetiracetam. In: *Epilepsy prescribers guide to antiepileptic drugs.* UK, Cambridge University Press. Pp.: 124-133.
3. Uges JWF. and Vecht CI.(2010). Levetiracetam. In :Atlas of epilepsies. C.P. Panayiotopoulos ed, UK, Springer-Verlag, London limited. 271. pp.:1775-1785.
4. Kavita K.; Asawari L.; Kushal HG. and Priti D. (2011). Levetiracetam . *JAPI.* 59:652-654.
5. Isojarvi JI.; Tauboll E. and Herzog AG. (2005). Effect of antiepileptic drug on reproductive endocrine function in individuals with epilepsy CNS drugs . *CNS. Drug.* 19: 207-223.
6. Artama M.; Isojarvi JI. and Auvinen A. (2006). Antiepileptic drug use and birth rate in patients with epilepsy a population – based cohort study in Finland . *Human Reprod.* 21(9): 2290-2295.
7. Isojarvi GI.; Pakarinen AG.; Lukkarinen O. and Myllyla VV.(1995). Carbamazepine, phenytoin, sex hormones, and sexual function in men with epilepsia. *Epilep.* 36: 366-370.
8. Rattya I.; Pakarinen AJ.; Knip M.; Repo-Outakoski M.; Myllyla VV. and Isojarvi JI.(2001). Early hormonal change during valproate or carbamazepine treatment at 3-month study. *Neurol.* 57:440-444.
9. Johannesen SI.; Battino D.; Berry DS.; Bialer M.; Kramer G. and Thomason T. (2003). Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drug. *Ther. Drug Monit.* 25: 347-363.
10. Roste LS.; Tauboll E.; Berner A.; Isojarvi JI. and Gjerstad L. (2001). Valproate, but not lamotrigine, induces ovarian morphological change in wistar rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 52:542-552.
11. Svalheim S.(2010). Epilepsy, hormones and antiepileptic drug. Ph.D. thesis, Faculty of Medicine. University of Oslo.
12. Radtke RA.(2001). Pharmacokinetics of levetiracetam. *Epilep.* 42(Supl.4): 24-27.

levetiracetam on steroidogenesis in forskolin-stimulated H2, 5R cells. *Epilep.* 5(11):2280-2288.

30. Bajjalieh SM.; Frantz GD. and Weimann TM.(1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2(sv2) isoforms. *J. Neuro. Sci.* 14: 5223-5235.

31. Urso L.; Zummo L.; Gammino M.; Fierro B.; Pavone C. and Daniele O. (2014). Anti epileptic drugs sexual function and serum hormonal profile in males with epilepsy. *Med. Surg. Urol.* 3(1):1-5.

32. Vogl C.; Mochida S.; Wolff C.; Whalley B. and Stephens W.(2012). The SV2A ligand levetiracetam inhibits presynaptic CACHANNLES via an intracellular pathway. *Dio.* 10(12): 101-105.

33. Santi CM.; Santos T.; Herndes-Cruz A. and Drson A.(1998). Properties of a novel Ph dependent Ca<sup>2+</sup> permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J. Gen. Physiol.* 112(1):33-53.

34. Skinner MK. and Fritz IB.(1985). Androgen stimulation of Sertoli cell function is enhanced by peritubules cells. *Moll. Cell Endocrinol.* 40:115-122.

35. Lynch BA.; Lambeng N. and Nocka K.(2004). The antiepileptic drug levetiracetam. *Pro.Nat.Acad.Sci.* 101:9861-9866.

36. Samy ET.; Jonathan CHL.; Grima J.; Lee WM.; Silvestrini B. and Ceng CY.(2002). Sertoli cell prostaglandin D2 synthetase is a multi-functional molecule: Its expression and regulation. *Endocrinol.* 141:719-721.

37. McLachlon RL.; Wraford NG.; Odonnell L. Kretser DM. and Robetson DM.(1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: In dependent role of testosterone and FSH. *J.Endocrinol.* 148:1-9.

38. Oshaughenssy PJ.; Johnston H.; Willerton L. and Baker PJ.(2002). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen –receptor- deficient mice. *J. Cell. Sci.* 115: 3496.

39. Calabro R. and Bramanti P.(2013). Levetiracetam- induced sexual disorder. *Seizure.* 22(4):329.

## دراسة نسجية مقارنة للغلالة الوعائية في مقل عيون بعض الفقريات في البيئة العراقية

شيماء عواد عبد

قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: shaimaa\_awad84@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

هدفت الدراسة الحالية إلى التعرف على التركيب النسجي للغلالة الوعائية في عيون بعض الفقريات في البيئة العراقية من مختلف الأصناف والبيئات الحياتية، واختلاف طبيعة التغذية. شملت الدراسة السحلية الذهبية *Mabuyaaurataseptemaeniata*، وطائر العقعق *Pica pica* والجرذ البني *Rattusnorvegicus*، تم عمل المقاطع النسجية كجزء من التجربة باستخدام الملون الروتيني (هيماتوكسلين – إيوسين)، وفحصت المقاطع النسجية بالمجهر الضوئي. أظهرت النتائج بأن الغلالة الوعائية في جميع الأنواع المدروسة تتألف من ثلاثة أجزاء: المشيمية، والجسم الهدبي، والقزحية. وقد كانت المشيمية غنية بالأوعية الدموية في طائر العقعق مقارنة مع السحلية الذهبية والجرذ البني. كما كان الجسم الهدبي أملس في عين السحلية الذهبية، بينما تكون من طبقات في مقلة عين طائر العقعق والجرذ البني. وقد كانت المكونات التركيبية للقزحية متشابهة نوعاً ما من حيث الأساس في عين الأنواع المدروسة. وبهذا نستنتج بأن الاختلاف في كثافة الأوعية الدموية والخلايا الخضابية في الأنواع المدروسة يعود إلى مدى حاجة العين للتغذية والأكسجين وخفض الحرارة، وحماية العين من الأطوال الموجية القصيرة للضوء.

**الكلمات المفتاحية:** الغلالة الوعائية، طائر العقعق، السحلية الذهبية، الجرذ البني

## A comparative histological study of tunica vasculosa in the eyeballs of some selected vertebrates from Iraqi environment

Shaima A. Abed

Dept. of Biology/ College of Sciences for Women / University of Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The present study aimed to recognize the histological structure of tunica vasculosa in the eyes of some Iraqi vertebrates, that were collected from difference species, living environments and the nature of nutrition. The sample included Golden Lizard *Mabuyaaurataseptemaeniata*, Magpie *Pica pica*, and Brown Rat *Rattusnorvegicus*. Histological examination was done using stain routinely with haematoxylin– eosin. Tissue sections were examined under light microscope.

The results showed that the tunica vasculosa of all species studied consisted of three parts : the choroid, the ciliary body, and the iris. Choroid was rich in blood vessels in Magpie compared with Golden Lizard and Brown Rat. Ciliary body was smooth in the eye of Golden Lizard, while consisted of folds in the eyeball of Magpie and Brown Rat. Iris in the eye species were studied as well as structural components, where they were essentially similar. It can be concluded that the differences in the density of blood vessels and pigment cells in the species studied were due to the extent of the eye need for nutrition, oxygen, reduce heat, and eye protection from short wavelengths of light.

## المقدمة

## النتائج والمناقشة

تقع الغلالة الوعائية Tunica Vasculosa بين الغلالة الليفية Tunica Fibrosa والغلالة الداخلية (الشبكية) Tunica Interna ، وتتكون من المشيمية Choroid والجسم الهدبي Ciliary body والقزحية Iris في الأنواع المدروسة (أشكال أرقام c1,b1,a1)، وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما جاء في دراسة كل من (11، 1). وقد أظهر الفحص بالمجهر الضوئي بأن المشيمية في السلحفاة الذهبية، والعقق، والجرذ البني (أشكال أرقام c2,b2,a2) تتألف من ثلاث طبقات هي (من الخارج إلى الداخل): طبقة فوق المشيمية Epichoroid وتتألف من ألياف غراوية ترافقها خلايا خضابية، تليها طبقة الشعيرات المشيمية chorio – capillaries وهي غنية بالأوعية الدموية، وتقع ضمن نسيج ضام مفكك Loose connective tissue، وتمتد أسفل طبقة الشعيرات المشيمية طبقة متجانسة تعزل الأخيرة عن طبقة الظهارية المخضبة في الشبكية، تعرف بغشاء بروش Bruch's membrane. وهذه النتائج جاءت مشابهة لنتائج دراسات (11-14) من الناحية الأساسية، لكن كثافة الأوعية الدموية تختلف، فهي في مشيمية طائر العقق أعزج مقارنة بالسلحفاة الذهبية والجرذ البني، وهذا الاختلاف في كثافة الأوعية الدموية يعزى إلى مدى حاجة العين للزود الدموي والمرتبطة ببينة الكائن الحي ونوعه، وكثافة المحيط الضوئي الموجود فيه (15).

تعتبر المشيمية المصدر الرئيس لتزويد الشبكية بالتغذية والأكسجين، وتساهم في تبديد الحرارة الناتجة من امتصاص الضوء من طبقة الخلايا البصرية في الشبكية، وتحافظ على الضغط داخل العين (12). ولكون طائر العقق يعتمد على البصر بشكل كبير في البحث عن الغذاء، لذلك فهو يحتاج إلى مشيمية عالية الوعائية لتزويد الشبكية الوعائية بالتغذية والأكسجين، وتبديد الحرارة التي تسببها الخلايا البصرية الممتصة للضوء. تعمل الخلايا الخضابية في المشيمية على امتصاص الضوء المبعثر لعدم قدرة الخلايا الخضابية في الشبكية على امتصاصه، بحيث تمنع انعكاسه داخل العين (15).

تتشارك المشيمية والشبكية Retina في تكوين الجسم الهدبي (أشكال أرقام c3,b3,a3) والقزحية (أشكال أرقام c4,b4,a4)، وأوضحت نتائج الفحص النسيجي بأن الجسم الهدبي أملس في السلحفاة الذهبية، بينما يكون مؤلفاً من طبقات في العقق والجرذ البني، ويتكون من طبقة سطحية خارجية تتألف من صف واحد من نسيج ظهاري عمودي Columnar epithelial tissue يشكل استمراراً لطبقات الشبكية الحسية، وطبقة ظهارية مخضبة Pigmented epithelium ممتدة من الطبقة الظهارية المخضبة للشبكية، وطبقة رقيقة من نسيج ضام مفكك Loose connective tissue يحتوي على ألياف غراوية Collagenous fibers تتكون من طبقات المشيمية وتتخللها أوعية دموية (أشكال أرقام c5,b5,a5)، وهذه النتيجة تتفق مع ما جاء في دراسة كل من (11، 16). تزود طبقة النسيج الضام التي تحتوي على أوعية دموية العضلات الهدبية Ciliary muscle والبروزات الهدبية Ciliary process والقزحية Iris بالتغذية والأكسجين (17). يحتوي الجسم الهدبي على ثلاث مجموعات من العضلات الملساء لها دور في عملية التكيف للرؤية (1، 5، 13). يفرز الجسم الهدبي سائلاً مائياً يحافظ على الضغط داخل العين، ويسيطر على شكل العدسة من خلال العضلات الهدبية (18).

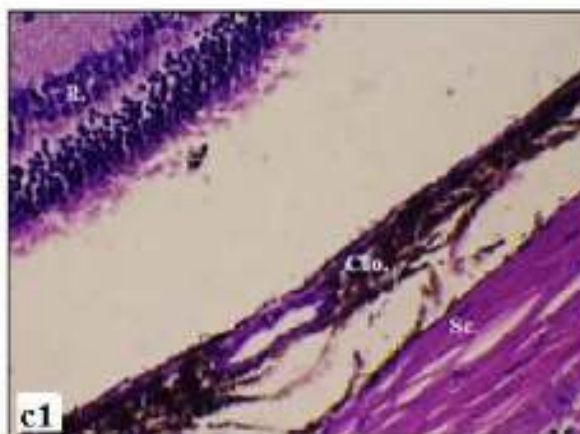
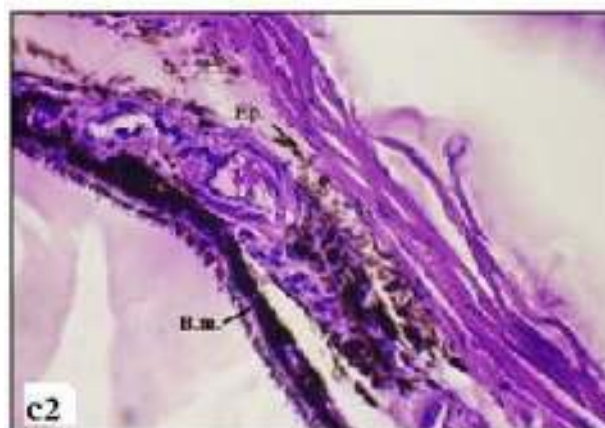
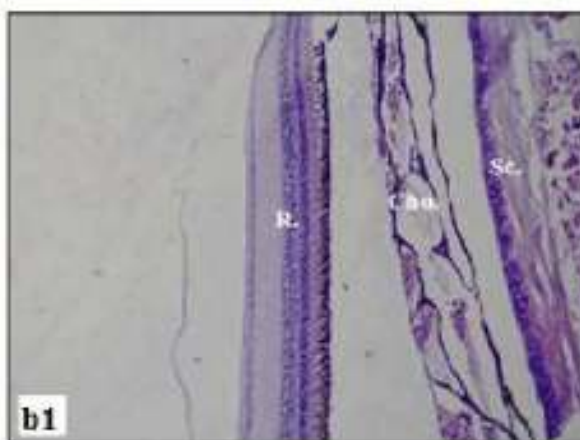
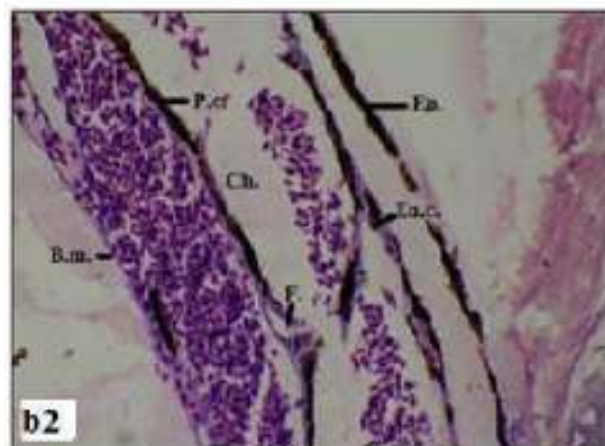
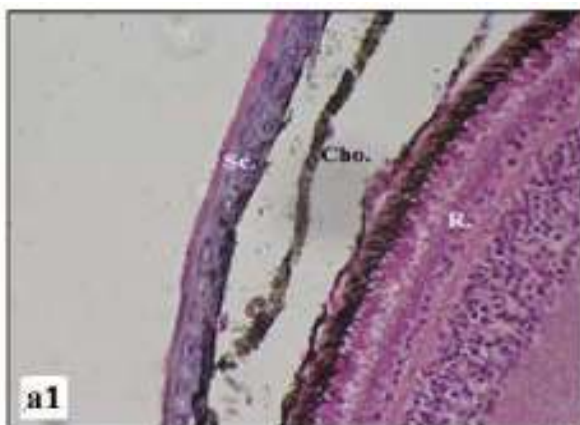
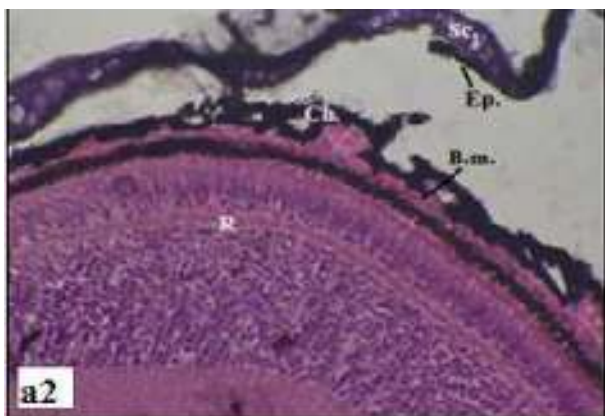
الغلالة الوعائية Tunica vasculosa أو العنبية Uvea عبارة عن الطبقة الوسطى التي تقع بين الغلالة الليفية Tunica fibrosa والغلالة الداخلية (الشبكية) Tunica interna (Retina). تتألف من ثلاث أجزاء هي (من الخلف إلى الأمام): المشيمية Choroid، والجسم الهدبي Ciliary body، والقزحية Iris (1). المشيمية Choroid طبقة خضابية عالية الوعائية تزود الشبكية بالمواد الغذائية والأكسجين (2، 3)، وتتألف نسيجياً من طبقتين هما: طبقة الشعيرات المشيمية capillary – Choroid والتي تكون غنية بالأوعية الدموية، وغشاء بروش Bruch's membrane الذي يفصل طبقة الشعيرات المشيمية عن طبقة الظهارية المخضبة Pigmented epithelium في الشبكية (4). الجسم الهدبي Ciliary body عبارة عن عضلات ملساء، يرتبط بالعدسة عن طريق الرباط المعلق Suspensory ligament، ويتألف من عضلات هضبية Ciliary muscle مسيطرة على التكيف البصري Visual accommodation (3). يتكون الجسم الهدبي نسيجياً من: طبقة ظهارية مخضبة Pigmented epithelium layer، وطبقة ظهارية غير مخضبة Non Pigmented epithelium layer، وطبقة السدى Stroma layer (5).

أما القزحية Iris، فهي تركيب قرصي تحدد لون العين عن طريق الصبغات الموجودة فيها، يوجد في وسطها فتحة تعرف باليوبؤ Pupil يدخل من خلالها الضوء إلى العين، ويسيطر على اتساع فتحة اليوبؤ عضلات موسعة Dilator muscles، وعلى انقباضها عضلات قابضة Sphinctor muscles (6). وتتألف نسيجياً من طبقتين: طبقة ظهارية مخضبة Pigmented epithelium layer، وطبقة السدى Stroma layer (1). وقد أجريت دراسات عن الفقرات العراقية (7، 8)، لكن لا زالت العديد من الجوانب لم تدرس، على الرغم من امتلاك العراق تنوعاً بيئياً واسعاً ينعكس على التنوع الإحيائي. ولتغطية بعض الجوانب العلمية لبعض الفقرات العراقية، فقد تم اختيار هذه الأنواع على أساس الاختلاف بالأصناف، والبيئة، وطبيعة التغذية، حيث تمت الدراسة الحالية على: السلحفاة الذهبية (Mabuya aurata septemlineata (Reuss, 1834)، وطائر العقق (Pica pica (Linnaeus, 1758)، والجرذ البني (Rattus norvegicus (Beikenhout, 1769).

## المواد وطرق العمل

جمعت العينات من بساتين بغداد، حيث اختيرت الحيوانات بالغلة وخالية من الأمراض، وصنفت في متحف التاريخ الطبيعي / جامعة بغداد. تم تخدير الحيوانات بمادة الكلوروفورم chloroform لمدة 5-10 دقائق، ثم تم قطع الرأس، وإزالة الجلد، ومن ثم فصل الفك السفلي وكسرت عظام الجمجمة، وبعدها أزيلت العين من محارها orbit، وقطعت العضلات المرتبطة بها، أما في طائر العقق، فقد اعتمدت نفس الخطوات السابقة بالإضافة إلى إزالة الريش.

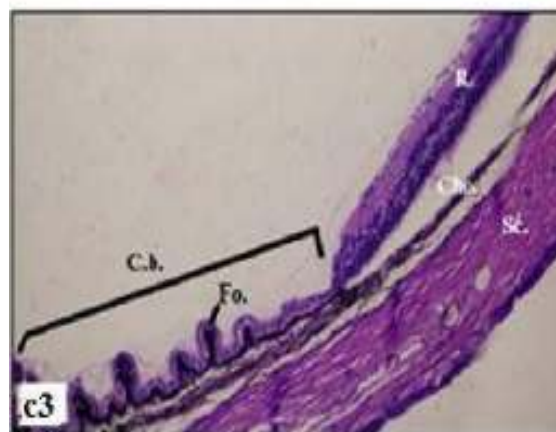
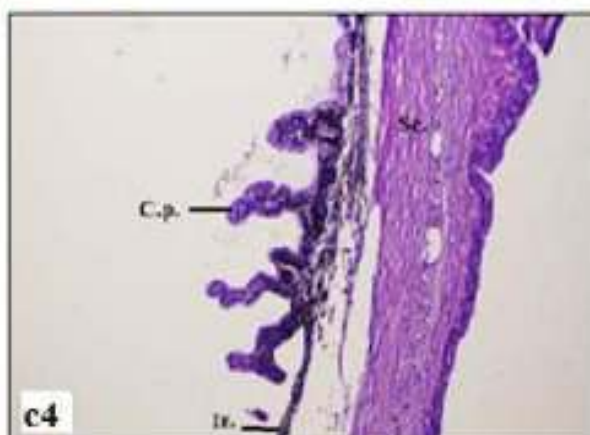
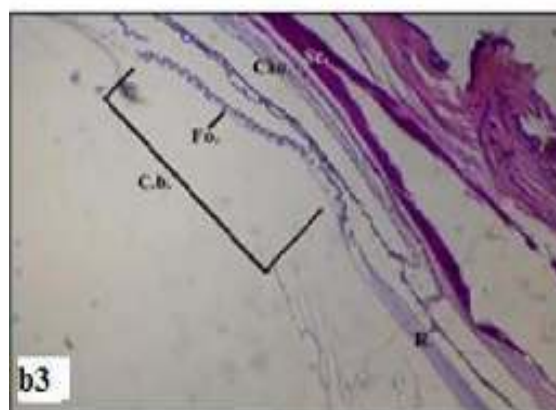
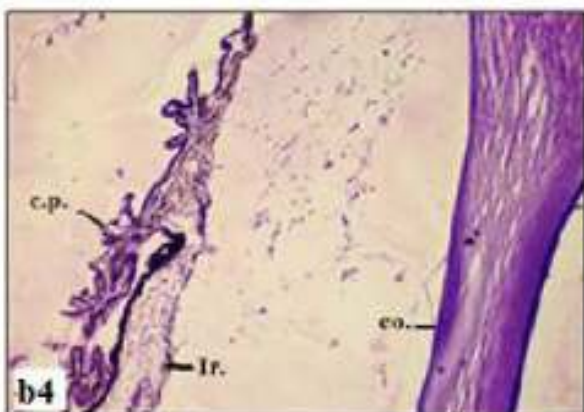
تم تثبيت العينات في محلول بون Bouin's fluid لمدة 4 ساعات، ثم جرى تقطيع العين إلى مقاطع مستعرضة وتركزت في محلول بون لمدة 10 ساعات، بعد ذلك غسلت العينات بكحول إثيلي تركيزه 70% (9)، وتركزت محفوظة فيه لليوم التالي لبدء عملية إنكاز العينات بسلسلة تصاعديّة من الكحول الإيثيلي. تم تروقة العينات بالزإليلين. وأعقب ذلك ارتشاح العينات بشمع البارافين، وبعد ذلك تم إسجاء العينات بالشمع المنصهر وفي قوالب خاصة، ثم تركت لكي تتصلب. قطعت النماذج بواسطة جهاز المشرع الدوار Rotry microtome وبصورة متسلسلة بسبك 6 مايكروميتر، وحملت الأشرطة المقطوعة على شرائح زجاجية نظيفة ومعلمة، ووضعت فوق صفيحة ساخنة درجة حرارتها 37 °م، وتركزت الشرائح لمدة 24 ساعة لكي تجف (9). لونت الشرائح بملون هيماتوكسيلين هارس Harris's haematoxylin، والأيوسين الكحولي Alcoholic eosin (10)، ثم فحصت الشرائح باستعمال مجهر ضوئي مركب وصورت باستخدام مجهر ضوئي مزود بكاميرا.



شكل رقم (2): مقطع طولي يوضح طبقات المشيمية في (a) السحلية الذهبية (ملون H.&E.400X)؛ (b) العقيق (ملون H.&E.400X)؛ (c) الجرذ البني (ملون H.&E.400X) ، (Ep.) Epichoroid, (Ch.) Chorio – capillaris, (B.m.) Bruch's membrane, (En.c.) Endothelial cell, (P.c.) Pigment cell, (F.) Fiber

شكل رقم (1): مقطع طولي يوضح طبقات العين في (a) السحلية الذهبية (ملون H.&E.100X)؛ (b) العقيق (ملون H.&E.100X)؛ (c) الجرذ البني (ملون H.&E.100X) ، (Sc.) Sclera, (Cho.) Choroid, (R.) Retina

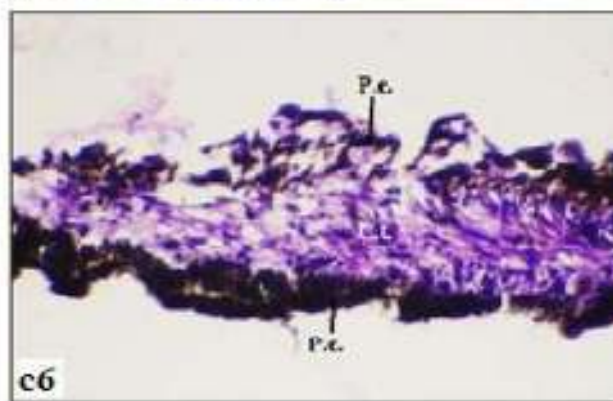
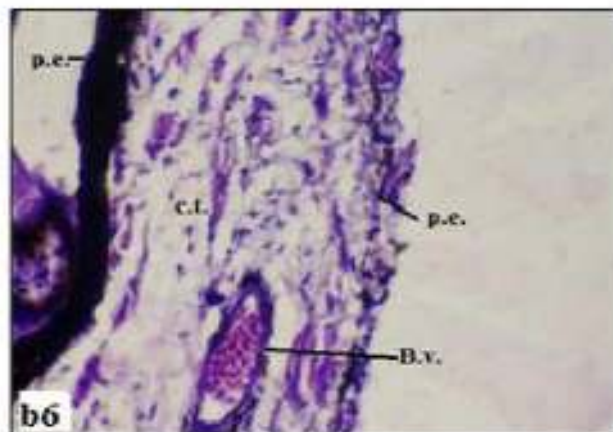




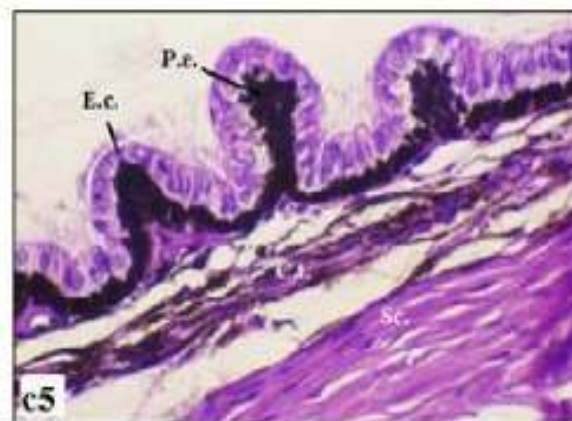
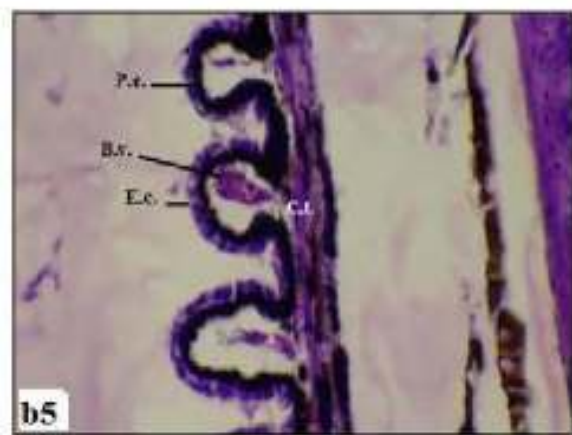
شكل رقم (4): مقطع طولي يوضح ارتباط القرنية بالبروزات الهدبية في (a) السحلية الذهبية (ملون H.&E.100X)؛ (b) العقعق (ملون H.&E.100X)؛ (c) الجرذ البني (ملون H.&E.100X)  
(Sc.) Sclera, (c.p.) ciliary process, (L.) Lens, (Ir.) Iris, (Co.) Cornea

شكل رقم (3): مقطع طولي يوضح ارتباط الشبكية والمشيمية في الجسم الهدبي في (a) السحلية الذهبية (ملون H.&E.400X)؛ (b) العقعق (ملون H.&E.100X)؛ (c) الجرذ البني (ملون H.&E.40X)  
(Sc.) Sclera, (Cho.) Choroid, (R.) Retina, (Fo.) Fold, (C.b.) Ciliary body

chamber والغرفة الخلفية posterior chamber (5)، وتساهم الخلايا الخضابية بامتصاص الضوء ذي الأطوال الموجية القصيرة، التي تسبب ضرراً للعين (7، 15). وقد أشارت دراسة (21) إلى أن العضلات في القزحية تسيطر على الضوء الداخل إلى العين من خلال التقلص والانبساط.



شكل رقم (6): مقطع طولي يوضح طبقات القزحية في (a) السحلية الذهبية (ملون / H.&E.400X)، (b) العقق (ملون / H.&E.400X)، (c) الجرذ البني (ملون / H.&E.400X) (P.e.) Pigmented epithelium, (B.v.) Blood vessel, (C.t.) Connective tissue, (L.) Lens



شكل رقم (5): مقطع طولي يوضح طبقات الجسم الهدبي في (a) السحلية الذهبية (ملون / H.&E.400X)، (b) العقق (ملون / H.&E.400X)، (c) الجرذ البني (ملون / H.&E.400X) (E.c.) Epithelial cell, (P.e.) Pigmented epithelium, (B.v.) Blood vessel, (C.t.) Connective tissue, (S.c.) Sclera

تشير النتائج الموضحة في أشكال أرقام (a6, b6, c6) إلى أن القزحية تتألف من الطبقات (من الداخل إلى الخارج): طبقة كثيفة من نسيج ظهاري مخضب Deeply pigmented epithelium، وطبقة السدى Stroma المؤلفة من نسيج ضام Connective tissue يحتوي على الليفاروية والألياف عضلية وأوعية دموية، وطبقة من النسيج الظهاري المخضب pigmented epithelium في السحلية الذهبية وطانر العقق والجرذ البني. وهذه النتيجة مشابهة مع ما جاء في دراسة كل من (11، 19). تعمل القزحية كحاجز أمام العدسة Lens، وتساهم في تكيف فتحة البؤبؤ Pupil التي تقع في مركزها (20)، وتفصل بين الغرفة الأمامية anterior

to the ciliary processes. Exp. Eye Res. 51(6): Abstract.

18. Zhao S.; Chen O.; Hung FC. and Overbeek PA. (2002). BMP signaling is required for development of the ciliary body. Develop. 129: 4435-4442.

19. Sweijid N. and Craig AJFK. (1991). Histological basis of age – related changes in iris color in the African pied starling (*Spreo bicolor*). The Auk. 108: 53-59.

20. Jones MP.; Pierce KE. and Ward D. (2007). Avian vision: A review of form and function with special consideration to birds of prey. J. Exotic. Pet. Med. 16(2): 69-87/

21. Murphy CJ.; Glasser A. and Howland HC. (1995). The anatomy of the ciliary region of the chicken eye. Investig. Ophthalmol. Visual. Sci. 36(5): 889-896.

#### المصادر

1. Mescher AL. (2013). Junqueira's basic histology text and atlas. 13<sup>th</sup> ed., McGraw Hill. Pp.: 484-486.

2. Nickla DL. and Wallman J. (2010). The multi-functional choroid. Prog. Retin. Eye. Res. 29(2): 144-168.

3. Kardong KV. (2012). Vertebrates comparative anatomy, function and evolution. 6<sup>th</sup>ed. McGraw – Hill. Pp.: 681-690.

4. Ross MH. and Pawlina W. (2011). Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology. 6<sup>th</sup> ed. MPS Limited Macmillan. Pp.: 902 – 907.

5. Treuting PM. and Dintzis SM. (2012). Comparative anatomy and histology. Mouse and Human Atlas. 1<sup>st</sup> ed. Elsevier Inc. pp.: 403 – 405.

6. غالي ، محمد عبد الهادي وداد ، حسين عبد المنعم (2014) . التشريح المقارن للحليبات. الطبعة الثانية. دار الدكتور للعلوم الإدارية والاقتصادية. ص: 801 – 802.

7. عبد ، علي أشكر ، أحمد ، دلال فوزي، حمودي ، هاني مال الله. (2010) . دراسة تشريحية ونسجية لتركيبة العين في طائر القطا العراقي *Pteroclesalchatacaudarus*. مجلة تكريت للعلوم الصرفة. 15(2): 246 – 260.

8. غالي، محمد عبد الهادي وعبد، شيماء عواد. (2015). دراسة مظهرية ونسجية مقارنة لشمش العين في نوعين من الطيور العراقية (العوسق *Falco tinnunculus* L. والفاخنة *Streptopeliadecaecto* F. 12(1): 8-12.

9. Bancroft JD. and Gamble M. (2002). Theory and practice of histological techniques. 5<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone. Pp.: 74 – 175.

10. الحاج ، حميد أحمد. (2010) . التحضيرات المجهرية الضوئية: النظرية والتطبيق . الطبعة الأولى . دار المسيرة للنشر والتوزيع ، عمان ، الاردن. ص: 17 – 137.

11. الجبوري ، شيماء عواد عبد. (2014). دراسة مظهرية ونسجية مقارنة للعين في نوعين من الطيور العراقية ( العوسق *Falco tinnunculus* L. والفاخنة المطوقة *Streptopeliadecaecto* F. رسالة ماجستير. كلية العلوم للنبات ، جامعة بغداد.

12. De – Stefano ME. and Mugnaini E. (1997). Fine structure of the choroidal coat of the avian eye : lymphatic vessels. Investig. Ophthalmol. Visual Sci. 38 (6):1241- 1260.

13. Jezler PCOC.; Braga MBP.; Perlmann E.; Squarizoni R.; Borella MI.; Barros PS M.; Milanelo L. and Antunes A. (2010). Histological analysis of eyeballs of the striped owl *Rhinoptynx clamator*. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education . pp.:1047 – 1054.

14. الخليفة ، إخلاص خليفة حامد. (2014). دراسة تشريحية ، نسجية ونسجية كيميائية للعين في الأفعى. المجلة العراقية للعلوم البيطرية. 28 (1): 25 – 36.

15. الحمداني ، أمير محمود طه عبد الله. (2012) . دراسة تشريحية نسجية مقارنة وتطورية عند مستوى المجهرين الضوئي والإلكتروني من العين والقناة الهضمية في ثلاثة أنواع من الطيور المختلفة في طبيعة الغذاء . رسالة دكتوراه. كلية التربية ، جامعة الموصل.

16. Hodges RD. (1974). The histology of the fowl. Academic Press. INC. pp.:525- 560.

17. Funk R. and Rohen JW.(1990). Scanning electron microscopic study on the vasculature of the human anterior eye segment, especially with respect



## الوصف العياني والتركيب النسيجي للكبد البنكرياسي والطحال البنكرياسي في سمكة الشبوط *Barbus grypus* في بغداد

أفين رمضان محسن

قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: [aveenramadhan2015@gmail.com](mailto:aveenramadhan2015@gmail.com)

### الملخص باللغة العربية

هدفت هذه الدراسة ، إلى التعرف على الشكل الخارجي ونسجية كبد وطحال سمكة الشبوط في دراسة تعد من الدراسات الأولى في هذا الموضوع والتي لم يتم تناولها سابقاً. تم جمع 10 عينات من أسماك الشبوط *Barbus grypus* بأطوال مختلفة من نهر دجلة في مدينة بغداد، وبعد فتح تجويف الجسم، تم دراسة شكل وتركيب الكبد والطحال، ومن ثم استخراجها ووضعها في محلول بون (Bouns solution) للتثبيت لمدة 24 ساعة، بعدها غسلت عدة مرات بالكحول الإيثيلي. طمرت العينات بشمع البرافين وقطعت وصبغت بصبغة الهيماتوكسيلين- إيوسين، وتم فحص الشرائح تحت المجهر الضوئي.

أظهرت النتائج أن كبد سمكة الشبوط ذو لون بني فاتح وأنها تمتلك كبدًا بنكرياسيًا Hepatopancreas يتألف من فصين، الفص الأيمن أطول من الفص الأيسر. ولم يلاحظ تميز الفصيصات والثالوث البابي ضمن النسيج الحشوي للكبد. أظهرت النتائج أيضاً أن نظام الجيبانيات- الخلايا الكبدية كان من نوع الحبال Cord-like ، أما نظام القنوات الصفراوية فهو من النوع المعزول Isolated type. ينتشر النسيج البنكرياسي الإخراجي حول أفرع الأوردة البابية، ويتألف من عنيبات مصلية و جزيرات بنكرياسية، كما ينتشر بشكل كتل صغيرة ضمن النسيج الدهني المحيط بالقناة الهضمية. تمتلك سمكة الشبوط طحالاً بنكرياسياً spleenopancreas ويكون النسيج البنكرياسي طبقة داخلية تلي النسيج الحشوي والمحفظة للطحال، ويتألف النسيج الحشوي للطحال من لب أحمر وآخر أبيض يصعب التمييز بينهما. كما ظهرت الأجسام الإهليلجية وخلايا Melanomacrophage center.

الكلمات المفتاحية: سمكة الشبوط، الكبد، الطحال

## Morphological and histological description of hepatopancreas and spleenopancreas of *Barbus grypus* in Baghdad

Aveen R. Mohsin

Dept. of Biology / College of Sciences for Women/ University of Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

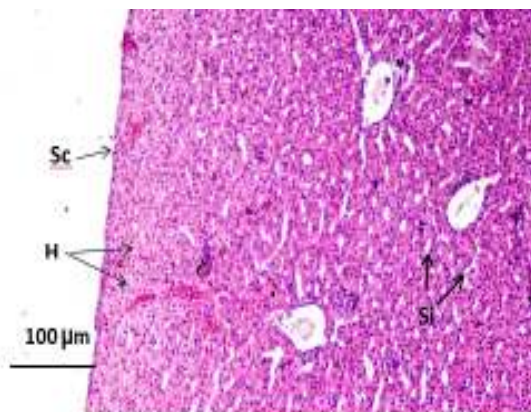
The aim of the present study was to determine the macroscopical and microscopical features of liver and spleen of Shabout fish. A total sample of (10) fish were collected with various length from Tigris river in Baghdad. After removing the organs, they were fixed with Bouins solution for 24 hrs. and washed with ethyl alcohol several times, and then, embedded with paraffin wax. Samples were cut and stained with Haematoxylin – Eosin. Slides were examined under light microscope.

Results showed that hepatopancreas of Shabout *Barbus grypus* has light brown color and hepatopancreas consisted of two lobes, right lobe, which was taller than the left lobe. Marked lobules and portal tracts were not observed in the liver. The hepatocyte-sinusoidal structure was Cord-like type, and the type of bile duct system was isolated type. Excretory pancreatic tissues are spread around the branches of the portal vein, and consists of serous acini and pancreatic islets within the adipose tissue surrounding digestive tract. *Barbus grypus* has spleenopancreas, where the pancreatic tissues make inner layer within the spleen, following the splenic stroma and capsule. Splenic stroma consists of red and white pulps. However, it was difficult to distinguish between them. Ellipsoidal arteriole and melanomacrophage center had emerged.

أظهرت النتائج أن النسيج البنكرياسي منتشر بشكل كتل صغيرة ضمن النسيج الدهني المحيط بالقناة الهضمية وعلى طولها (شكل رقم 6).

شكل رقم (1): منظر بطني لسمكة الشبوط (G) معى (L) كبد (S) طحال

شكل رقم (2): مقطع مستعرض مار خلال كبد سمكة الشبوط (H) خلية كبدية، (Sc) خلايا حرشفية، (Si) جيبانيات (ملون H & E)



## المقدمة

يمتاز الكبد Liver والبنكرياس Pancreas بعدة وظائف منها الإفراز (الصفراء، الإنزيمات)، الخزن (فيتامينات، دهون، وجلابوكوجين)، التصنيع (بروتينات الدم)، الأيض (بروتينات، دهون، كربوهيدرات) وغيرها (1). وتكون الكبد في بعض أنواع الأسماك طرفية التعظم على شكل عضو مركب، مؤلف من الكبد والبنكرياس أو من الطحال والبنكرياس (2). أما الطحال Spleen ، فهو العضو اللمفي الوحيد في الأسماك العظمية Teleost ، إذ لا تمتلك نقي عظم ولا عقد لمفاوية. وتعتبر الأسماك أولى الفقريات التي تمتلك طحالا (2-4)، الذي يعتبر جزءا من النسيج المكون للدم haemopoietic tissue ، إذ يقوم بإزالة وتصفية الأجسام الغريبة، وتكوين وخزن وتهديم كريات الدم في الأسماك (5).

تنتمي أسماك الشبوط إلى عائلة الشبوطيات Cyprinidae ضمن صنف الأسماك العظمية Osteichthyes ، وتعد من أهم أسماك التغذية في نهري دجلة والفرات (6). وقد تطرقت العديد من الدراسات إلى سمكة الشبوط في جوانبها التصنيفية والحياتية والجنينية والنسجية (7-10)، ولكن لا توجد دراسة نسجية حول الكبد والطحال لسمكة الشبوط في بغداد. وعليه، تأتي هذه الدراسة لأهمية أسماك الشبوط الاقتصادية.

## المواد وطرق العمل

جمعت عينة من أسماك الشبوط قوامها (10) سمكات بأطوال مختلفة من نهر دجلة في مدينة بغداد. وبعد فتح تجويف الجسم تم دراسة شكل وتركيب الكبد والطحال، و من ثم استخرجها ووضعها في محلول بون Boun solution للتثبيت لمدة 24 ساعة. ثم تم غسلها عدة مرات بالكحول الإيثيلي Ethanol بتركيز 70% . وبعد ذلك أخذت عينات من كل عضو ومررت العينات بترابيز متسلسلة من الكحول الإيثيلي (70%، 80%، 90%، 100%) وتم ترويق العينات بالزايلين Xylene ، ومن ثم تشريبها بشمع البرافين Paraffin wax ، ومن ثم طمرها بشمع البرافين. بعدها تم تقطيع العينات بجهاز المشراح الدوار Rotary microtome بسمك 6-7µm ، ومن ثم تحميلها على الشريحة الزجاجية وتصبيغها بصيغة الهيماتوكسيلين-إيوسين Haematoxylin-Eosin (11). تم فحص العينات تحت المجهر الضوئي Light microscope وتصويرها بواسطة كاميرا محمولة على المجهر الضوئي.

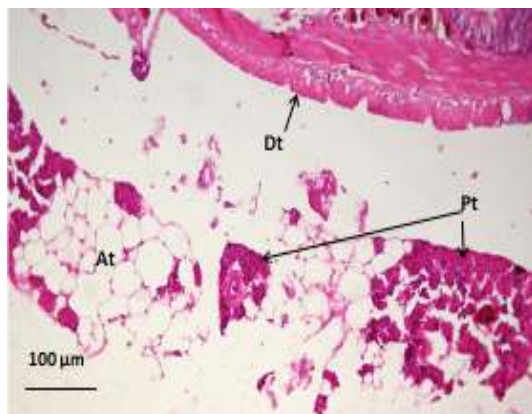
## النتائج

### الكبد البنكرياسي

أظهرت النتائج أن كبد liver سمكة الشبوط *Barbus grypus* ذو لون بني فاتح ويتألف من فصين، الفص الأيمن Right lobe والذي كان أطول من الفص الأيسر Left lobe (شكل رقم 1). يحاط الكبد نسيجيا بطبقة مصلية مؤلفة من صف من الخلايا الحرشفية squamous cells. ويتألف النسيج الحشوي من خلايا كبدية Hepatocyte والجيبانيات Sinusoids . ولم يلاحظ تميز الفصيصات Lobules والثالوث البابي portal trais ضمن النسيج الحشوي للكبد (شكل رقم 2).

ظهرت الخلايا الكبدية مضلعة الشكل Polygonal ذات نواة مركزية ونوية واضحة (شكل رقم 3)، وأن نظام الجيبانيات-الخلايا الكبدية من نوع الحبال Cord-like ، إذ تصطف الخلايا الكبدية بشكل حبال، وتحصر بينها جيبانيات كبيرة ومستقيمة (شكل رقم 2، شكل رقم 4). أما نظام القنوات الصفراوية bile ducts فهو من النوع المعزول Isolated type ، إذ تتوزع القنوات الصفراوية بصورة مستقلة ضمن النسيج الحشوي للكبد ومحاطة بغمد من نسيج ضام (شكل رقم 4).

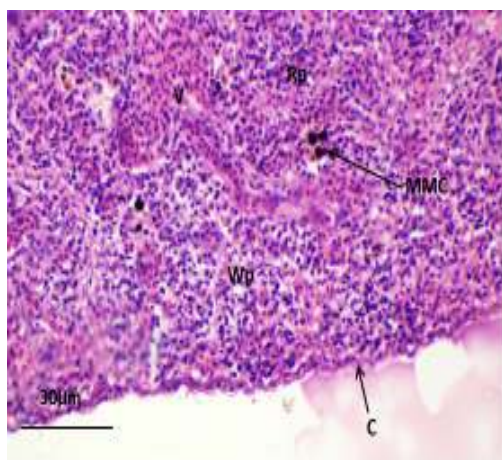
كما بينت النتائج أن كبد سمكة الشبوط هو عضو مركب مؤلف من الكبد والبنكرياس، ويدعى بالكبد البنكرياسي Hepatopancreas ، إذ ينتشر النسيج البنكرياسي الإخراجي حول أفرع الأوردة البابية portal veins ضمن النسيج الحشوي للكبد، ويتألف من غنبيات مصلية Serous acini تنفصل عن الخلايا الكبدية بحاجز رقيق من نسيج ضام (شكل رقم 3). كما ظهرت الجزيرات البنكرياسية Pancreatic islets ضمن النسيج البنكرياسي (شكل رقم 5). كما



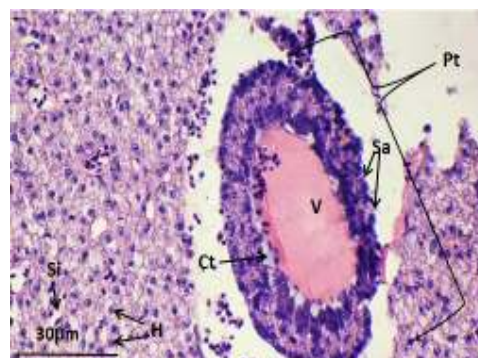
شكل رقم (6): مقطع في كبد سمكة الشبوط: (At) نسيج دهني، (Dt) قناة هضمية، (Pt) نسيج بنكرياسي (ملون H & E)

#### الطحال البنكرياسي

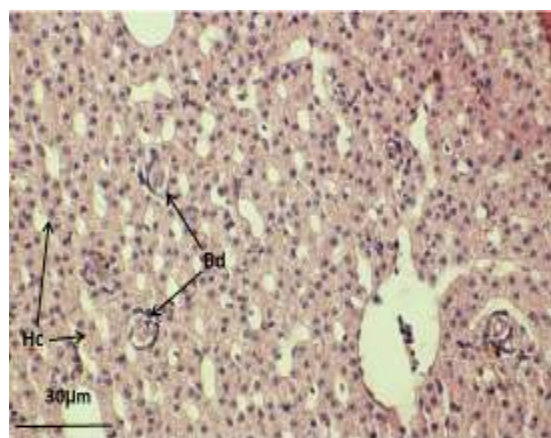
أظهرت النتائج امتلاك سمكة الشبوط لطحال Spleen بشكل متطاول يقع في مقدمة الجوف الجسمي والقناة الهضمية وذو لون احمر قاتم (شكل رقم 1). كما أظهرت النتائج أن طحال سمكة الشبوط من النوع المركب. يتألف من نسيج بنكرياسي ضمن النسيج الحشوي للطحال، ويدعى بالطحال البنكرياسي spleenopaneas . ويظهر التركيب النسيجي أن الطحال محاط بمحفظة Capsule رقيقة من نسيج ضام وألياف مطاطة ولا يكون حويجزات Trabecula ضمن النسيج الحشوي للطحال (شكل رقم 7)، وينعزل النسيج البنكرياسي عن النسيج الحشوي للطحال بطبقة من نسيج ضام (شكل رقم 8). يتألف النسيج الحشوي من لب أحمر Red pulp وآخر أبيض White pulp. يتألف اللب الأبيض من خلايا لمفاوية وخلايا شبكية تحيط بشرين Arteriole مركزي ويدعى بالجسم الإهليلجي Ellipsoids (شكل رقم 9). ينتشر اللب الأحمر ضمن اللب الأبيض، ويصعب التمييز بينهما، ويتألف من جيبانيات تحوي كريات دم حمراء وخلايا melanomacrophage center التي تكون بشكل تجمعات تنتشر بصورة غير منتظمة ضمن اللب الأحمر عادة حول الأوعية الدموية، وتصطبغ بلون بني غامق أو مصفر بصبغة H&E (شكل رقم 7)، ويكون النسيج البنكرياسي طبقة داخلية تلي النسيج الحشوي والمحفظة للطحال (شكل رقم 10).



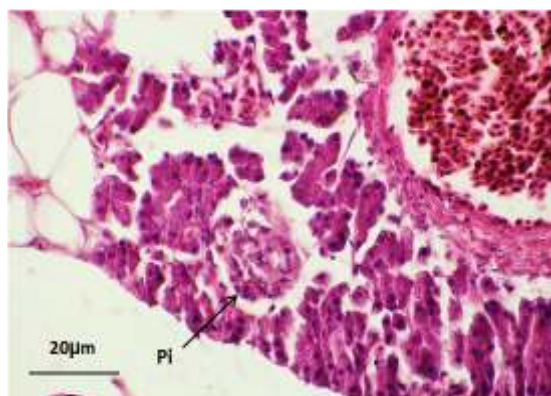
شكل رقم (7): مقطع في طحال سمكة الشبوط: (C) محفظة، (MMC) خلايا Melanomacrophage center، (Rp) لب أحمر، (V) وعاء دموي، (Wp) لب أبيض (ملون H & E).



شكل رقم (3): مقطع مستعرض مار خلال كبد سمكة الشبوط (Ct)، نسيج ضام (H) خلية كبدية (Sa) غنبيات مصلية (Si) جيبانيات (Pt) نسيج بنكرياسي (V) وريد (ملون H & E)



شكل رقم (4): مقطع في كبد سمكة الشبوط: (Bd) قناة صفراوية، (Hc) حبال كبدية (ملون H & E)



شكل رقم (5): مقطع في كبد سمكة الشبوط: (Pi) جزيرة بنكرياسية (ملون H & E)



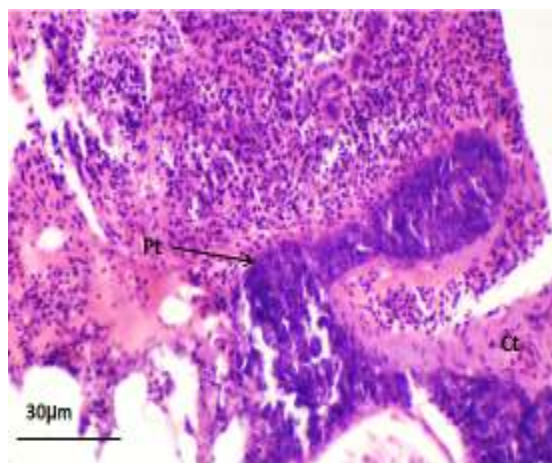
## المناقشة

## الكبد البنكرياسي

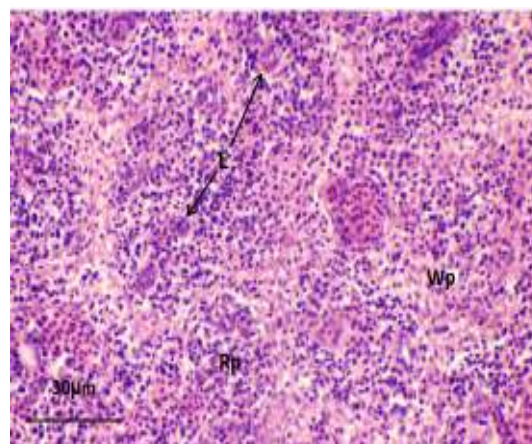
أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن كبد سمكة الشبوط *Barbus grypus* يتألف من فصين، الفص الأيمن وهو أطول من الفص الأيسر. وهذا ما لوحظ في غالبية الأسماك العظمية، كما في سمكة *Ctenopharyngodon idella* (12)، إذ يتألف كبد الأسماك بصورة عامة من فصين إلى ثلاثة فصوص، أو قد يكون غير مفصص كما في أسماك *Liza spp.* (13). ويكون في سمكة zebra fish ذو ثلاثة فصوص (5)، في حين أن الفص الأيسر في كبد سمكة *Nile Tilapia Oreochromis niloticus* يكون أكبر من الفص الأيمن (14). أظهرت النتائج أيضا أن كبد سمكة الشبوط ذو لون بني فاتح. وقد يرجع ذلك إلى كون سمكة الشبوط نباتية التغذية (14)، حيث يكون لون كبد الأسماك ذات التغذية الحيوانية بنيا محمرا، بينما في الأسماك ذات التغذية النباتية بنيا فاتحا (2). كما بينت النتائج أن كبد سمكة الشبوط هو عضو مركب مؤلف من الكبد والبنكرياس ويدعى بالكبد البنكرياسي *hepatopancreas*، وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما تم الإشارة إليه في سمكة *Copharyngodon idella* في دراسة (12)، وسمكة *Pangasius saintwongsei* في دراسة (15)، وسمكة *Pangasius hypophthalmus* في دراسة (1)، وسمكة *Oreochromis niloticus* في دراسة (14). وتمتلك سمكة *Barbus pectoralis* طحالا بنكرياسيا *Spleenopancreas* (16)، حيث أوضحت النتائج الحالية انتشار النسيج البنكرياسي ضمن النسيج الحشوي للكبد حول أفرع الأوردة البابية، وتتفق هذه النتيجة مع ما تم الإشارة إليه في سمكة *Grass carp Epinephelus* (12، 17)، وسمكة *chlorostigma* (18)، إذ يتكون النسيج البنكرياسي في الأسماك العظمية حول الوريد البابي خلال تكوين الفرد، فإما يبقى خارج الكبد أو ينتشر ضمن الكبد، وهذا يعتمد على النوع. ففي سمكة *Pimelodus maculatus* يكون البنكرياس عضوا مكتنزا *compact* ومغلف بطبقة رقيقة من نسيج ضام، ويرتبط بجدران المعدة والأمعاء على شكل كتل صغيرة من نسيج غدي (14)، أما في دائرية الفم *Cyclostome*، فيقع النسيج البنكرياسي في الطبقة المخاطية للأمعاء، وفي الشبوطيات *Cyprinidae* كما في سمكة الكارب *Cyprinus caprio* يتواجد النسيج البنكرياسي ضمن القنوات البوابية للكبد (19). أما سمكة *Trichomycterus brasiliensis*، فإنها تمتلك بنكرياسا مصمتا، بالإضافة إلى كبد بنكرياسي (20).

كما أظهرت النتائج الحالية أن النسيج البنكرياسي منتشر بشكل كتل صغيرة ضمن النسيج الدهني المحيط بالقناة الهضمية، وعلى طولها. وهذا ما تم الإشارة إليه في أسماك السلمون *Salmonids* (2)، وسمكة *African catfish Clarias* (5)، وسمكة *gariepinus B.* (21)، إذ يكون البنكرياس في الأسماك إما عضوا مكتنزا *Compact* أو بشكل منتشر *Diffused* ضمن عضو آخر كالكلبد أو البنكرياس، فيدعى بالكبد البنكرياسي *hepatopancreas* أو الطحال البنكرياسي *spleenopancreas*، أو يكون بشكل كتل *masses* مطمورة ضمن الدهون على طول الأمعاء (hoar 1969)، أو ضمن المساريق، كما في سمكة *Epinephelus chlorostigma* (18).

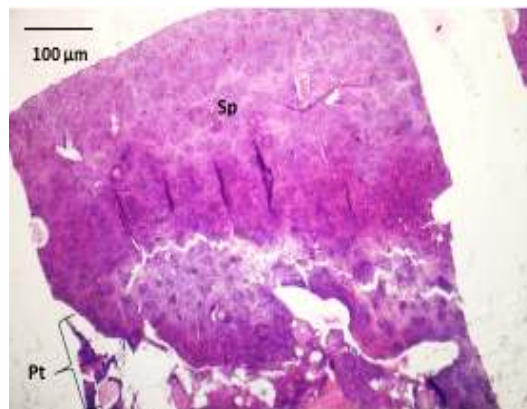
من ناحية أخرى، أظهرت النتائج عدم تميز الفصيصات الكبدية *Lobules* ولا الثالوث البوابي *Portal traid* ضمن النسيج الحشوي للكبد. وهذا ما لوحظ أيضا في سمكة *Zebra fish* (5)، وسمكة *Copharyngodon idella* (12)، إذ أشارت دراسة (22) إلى أن التنظيم الفصيصي الحاشي على وريد مركزي يعتبر ميزة في الفقريات العليا، أما في الأسماك فلا يكون واضحا أو متميزا بصورة عامة، ويتباين اعتمادا على النوع. أظهرت النتائج أن نظام الجيبانيات- الخلايا الكبدية كان من نوع الحبال *Cord-like*، وتصطف الخلايا الكبدية بشكل حبال، وتحصر بينها جيبانيات عريضة ومستقيمة. وبهذا يقسم كبد الأسماك حسب نظام الجيبانيات- الخلايا الكبدية إلى ثلاثة أنواع: شكل الحبال، الشكل الأنبوبي *Tubular*، والشكل المصمت *Solid form* (23). أما نظام القنوات الصفراوية فهو من النوع المعزول *Isolated type*، حيث يصنف نظام القنوات الصفراوية في الأسماك إلى أربعة أنواع: النوع المعزول، الشراييني- الصفراوي



شكل رقم (8): مقطع في طحال سمكة الشبوط: (Ct) نسيج ضام، (Pt) نسيج بنكرياسي (ملون H & E)



شكل رقم (9): مقطع في طحال سمكة الشبوط: (E) جسم إهليلجي، (Rp) لب أحمر، (Wp) لب أبيض (ملون H & E)



شكل رقم (10): مقطع في طحال سمكة الشبوط: (Sp) طحال، (Pt) نسيج بنكرياسي (ملون H & E)

بعض مراحل الخلية البيضية لسكة الشبوط *Barbus grypus* Heckel, 1843 في بغداد. المجلة الدولية للعلوم والتكنولوجيا. (3): 138-134.

11. Suvarna SK.; Layton C. and Bancroft JD.(2013). Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone Elsevier. P.:603.

12. Alboghobeish N. and Khaksar MM.(2005). Histological study of liver and pancreas in *Ctenopharyngodon idella*. J. Sci. Vet. 9(11): 25-34.

13. Biagianti-Risbourg S. (1991). Fine structure of hepatopancreas in juvenile grey mullets: *Liza saliens* Risso, *L. ramada* Risso and *L. aurata* Risso (teleostei, mugilidae). J. Fish Biol. 39(5): 687-703.

14. Vicentini CA.; Franceschini-Vicentini IB.; Bombonato MTS.; Bertolucci B.; Lima SG. and Santos AS.(2005). Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. Int. J. Morphol. 23(3):211-216.

15. Seyrafi R.; Najafi G.; Rahmati-Holasoo H.; Hooshyari A.; Acbari R.; Shokrpour S. and Ghadam M. (2011). Histological study of hepatopancreas in Hi Fin Pangasius (*Pangasius sanitwongsei*). Afri. J. Biotech. 10(17):3463-3466.

16. Khakasry M.; Morowait H.; Arefi A. and Karamifar M. (2014). Anatomical and Histomorphological study of spleen and pancreas in Berzem (*Barbus pectoralis*). World. J. Fish Mar. Sci. 4(3):263-267.

17. Mokhtar DM.(2015). Histological, histochemical and ultrastructural characterization of the pancreas of the Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). Europ. J. Anat. 19(2):145-153.

18. Hassan AA.(2013). Anatomy and histology of the digestive system of the carnivorous fish, the brown-spotted grouper, *Epinephelus chlorostigma* (Pisces; Serranidae) from the red sea. Life Sci. J. 10(2): 2149-2164.

19. Hoar WS.; Randall DJ. and Brett JR. (1979). Fish physiology. Vol. VIII. (Bioenergetics and growth) Academic Press INC. Pp.: ix-782.

20. Ribeiro CAde O. and Fanta E. (2000). Microscopic morphology and histochemistry of the digestive system of a tropical freshwater fish *Trichomycterus brasiliensis* (Lutken) (siluriformes, Trichomycteridae). Revta. Bras. Zool. 17(4):953-971.

21. Ikpegu E.; Nlebedum UC.; Nnadozie O. and Agbakwuru IO.(2012). Histological structures of the accessory glands of the digestive system in adult farmed African Catfish (*Clarias gariepinus* B.). J. Agri. Vet. Sci. 1(6):41-46.

22. Takashima F. and Hibiya T. (1995). An atlas of fish histology, normal and pathological features. 2<sup>nd</sup> ed. Gustar fishcher Verlag. Stuttgart, New York.

23. Akiyoshi H. and Inoue A.(2004). Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. Zool. Sci. 21:841-850.

24. Aughey E. and Frye FL.(2001). Comparative veterinary histology: with clinical correlates. Manson Publishing Ltd. P:131.

الوريدية-الصفراوي Biliary-arteriolar tract (BAT) والنوع البوابي Biliary-venous tract (BVT) type. وتصنف رتبة الشبوطيات ضمن النوع المعزول (23).

### الطحال البنكرياسي

يبنيت النتائج امتلاك سكة الشبوط لطحال بنكرياسي spleenopancreas، كما في سكة *Barbus pectoralis* (16)، حيث تمتلك العديد من الأسماك العظمية والزواحف والبرمائيات نسيجاً بنكرياسياً منتشراً ضمن الطحال يدعى بالطحال البنكرياسي (24). كما أظهرت النتائج أن الطحال محاط بمحفظة رقيقة من نسيج ضام وألياف مطاطة، ولا تكون المحفظة حويصلات Trabecula ضمن النسيج الحشوي للطحال. وهذا ما تم الإشارة إليه في سكة *Salmo letnica* (4). أما سكة *Barbus pectoralis*، فهي تمتلك تلك الحويصلات. أظهرت النتائج أيضاً أن النسيج البنكرياسي في سكة الشبوط يأتي بشكل طبقة داخلية تلي المحفظة والنسيج الحشوي للطحال. وهذا ما تم الإشارة إليه في بعض أنواع الأسماك (2). كما لوحظ أن النسيج الحشوي للطحال يتكون من اللب الأحمر Red pulp واللب الأبيض White pulp، ويصعب التمييز بينهما. فالطحال في الأسماك العظمية يختلف عنه في اللبائن والفقرات العليا بصعوبة التمييز بين اللب الأبيض والأحمر (2، 3). كما لوحظ وجود melanomacrophage centers (MMC) ضمن اللب الأحمر، حيث توجد هذه الأجسام في طحال و كلية الأسماك، تؤدي دوراً مشابهاً لدور المركز الإنتاشي والعقد للمفاوية في اللبائن (3).

### المصادر

1. Seyrafi R.; Najafi G.; Rahmati-Holasoo H.; Hajimohammadi B. and Shamsadin AS.(2009). Histological study of hepatopancreas in Iridescent Shark catfish (*pangasius hyophthalmus*). J. Anim. Vet. Adv. 8(7): 1305-1307.

2. Mumford S.; Heidel J.; Smith C.; Morrison J.; MacConnell B. and Blazer V. (2007). Fish histology and histopathology. USFWS-NCTC.

3. Sandaresan M. (2014). Ultrastructure of spleen in the fresh water fish *Tilapia mossambica* (peters). Europ. Acad. Res. 11(2):2894-2899.

4. Rebok K.; Jordanova M. and Tavciiovskva V.(2011). Spleen histology in the female Ohrid Trout *Salmo letnica* (Kar.) (Teleostei, Salmonidae) during the reproductive cycle. Arch. Biol. Sci. 63(4):1023-1030.

5. Menke AL.; Spitsbergen JM.; Walterbeek APM. and Woutersen RA. (2011). Normal anatomy and histology of the adult Zebra fish. Toxicol. Pathol. 38: 759-775.

6. الدهام، نجم قمر. (1977). أسماك العراق والخليج العربي. الجزء الأول. منشورات مركز دراسات الخليج العربي. مطبعة الإرشاد. بغداد.

7. سلمان، علي نعيم. (2004). التكوين الجنيني والتركيب النسيجي لعين سكة الشبوط *Barbus grypus*. رسالة ماجستير. جامعة بغداد.

8. حسين، نجاح عبود، الطائي، ميسون مهدي صالح، العماري، مؤيد جاسم ياس. (2012). بعض الجوانب الحياتية لسكة الشبوط (*Barbus grypus* Heckel) في نهر الحلة /العراق. المجلة العراقية للاستزراع المائي. 9 (2): 39-58.

9. محسن، أفين رمضان، الراوي، عبد الحكيم أحمد، البكري، نهلة عبد الرضا. (2014). تكوين البويض في سكة الشبوط *Barbus grypus* Heckel, 184. مجلة بغداد للعلوم. 11 (2): 907-900.

10. محسن، أفين رمضان، الراوي، عبد الحكيم أحمد، البكري، نهلة عبد الرضا. (2015). التركيب الدقيق للغلاف المحي والمخ في

## تحضير ببتيدات ذات فعالية مناعية من بروتينات نخالة الحنطة

منال عبد الواحد السراج (1)، مكارم علي موسى (2)

(1) كلية الزراعة / جامعة كربلاء (2) كلية الزراعة / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: makaremal37@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

تم تحضير متحلل بروتيني من المركز البروتيني لنخالة الحنطة المحلية صنف ابا 99 باستعمال إنزيم التربسين، من مصدر ميكروبي عند ظروف مثلى كما يلي (تركيز الإنزيم/المادة الأساس 2% (وزن/حجم)، درجة حرارة 37 م، ورقم هيدروجيني 8، ووقت 240 دقيقة). تم فصل المتحلل الإنزيمي باستعمال تقنية الترشيح الهلامي، وتم الحصول على ثلاثة متحللات بروتينية قدرت تراكيزها (0.789، 0.234، 0.456) ملغم/مل على التوالي. جرى اختبار فعاليتها المناعية تجاه الخلايا اللمفية، وفعالية البلعمة لخلايا البلعمة الكبيرة لخلايا طحال الفئران من نوع (Albino mice). أظهرت النتائج أن المتحللات البروتينية المحضرة من بروتين نخالة الحنطة أظهرت فعالية مناعية عالية مما يمكن من إدخالها في تصنيع المنتجات المناعية.

**الكلمات المفتاحية:** متحلل بروتيني، نخالة الحنطة، الترشيح الهلامي.

## Preparation of immunological peptides from wheat bran protein

Manal A.W. Al-Sarag (1) and Makarim A. Mousa (2)

(1) College of Agriculture / University of Karbala (2) College of Agriculture / University of Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

Protein hydrolysates were prepared from local wheat bran class (Ibaa 99) that were enzymatically prepared by microbial protease (Trypsin). Protein hydrolysates were separated by gel filtration technique, and three concentrations were obtained (0.234, 0.456, 0.789) mg/ml.

Immunomodulating activity was evaluated by measuring their effects on *in vitro* proliferation of albino mice spleen lymphocytes and phagocytic activity of potential macrophages. The results showed that wheat bran protein hydrolysates have the highest immunomodulating activity at optimum conditions E/S 2% (w/v), temperature 37 C, pH 8 and time 240 min.

The results suggested that lower molecular weight and positively charged peptides released from wheat bran protein were effective in stimulating immunomodulating activity. Thus, it can be concluded that it can be used in the preparation of potent immunomodulating products.

## المقدمة

بقابليتها على حث كفاءة الخلايا البلعمية الكبيرة في جسم الإنسان (7).

بينت دراسة (8) أن هذه الببتيدات لها القدرة على تثبيط نمو الخلايا السرطانية، فضلاً عن قدرتها على حث تعزيز فعالية الخلايا المعوية، وتطوير قابلية الخلايا المناعية على إنتاج الأضداد. في حين لاحظت دراسة (9) أن المتحلات البروتينية المنتجة من حليب الأبقار بالتحلل الأنزيمي بأحد هذه الإنزيمات (Papain·Lactozym·Alcalase) كان لها تأثير واضح على مستقبلات البروتينات المناعية IgG و IgA. كما وجد أن الوزن الجزيئي لتلك المتحلات له دور واضح في تحديد فعاليتها، إذ إن المتحلات ذات الوزن الجزيئي الأقل من 12.4 كيلو دالتون لها دور في تقليل الحساسية، التي تعد من أحد أمراض المناعة الذاتية الخطرة عند الإنسان. كما استطاع (10) من خلال دراسته من إنتاج ببتيدات ذات فعالية مناعية من التحلل البروتيني لبروتين الرز باستخدام إنزيم Trypsin.

ذكرت دراسة (11) أن المتحلات البروتينية المشتقة من جلوبتين الحنطة تسهم في تعزيز دور الجهاز المناعي الذي ظهر بوضوح من خلال ازدياد أعداد الخلايا اللمفية وزيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural cells)، وتنظيم إفراز العديد من المدورات المناعية cytokine التي تؤدي دوراً مهماً في الحد من انتشار الخلايا السرطانية المصابة بالفيروسات وتنشيطها، خاصة عند الأشخاص المصابين بالسرطان وكبار السن، وفي تخليق الأضداد، كما تسهم في زيادة فعالية الخلايا المناعية للبطانة المعوية.

بينت نتائج دراسة (12) أن الببتيدة المعروفة Oryzatensin ذات التسلسل (Gly- Tyr- Pro- Met- Tyr- Pro- Leu- Pro- Arg) من الأحماض الأمينية هي ببتيدة مشتقة من التحلل البروتيني لبروتين الرز بأنزيم Trypsin، والتي اشتقت من الجزء الذائب بالماء (الألبومين)، كما أظهرت الببتيدة أو أجزاؤها خواصاً علاجية عند إجراء اختبار لها خارج جسم الكائن الحي، ويعود السبب في ذلك إلى تحفيز الخلايا على إطلاق الهيستامين في الوسط من ناحية أخرى، اقترح بعض الباحثين أن الببتيدات ذات الفعالية المناعية تعتمد أساساً على فعاليتها على التركيب الكيميائي لها من جهة، وعلى تسلسل الأحماض الأمينية فيها من جهة أخرى (13). ومن هذه المقترحات، ينتج أن وجود الحامض الأميني الأرجينين سواء كان بالطرف C-terminal أو من الطرف N-terminal له دور في تسهيل عملية الارتباط المتخصص بين تلك الببتيدات ومستقبلات الخلايا المناعية الموجودة ضمن الغشاء المبطن للأمعاء، مما يفسر التواجد المميز للحامض الأميني الأرجينين عند الطرف C في الببتيدات المشتقة من بروتين كازين الحليب. كما أشارت دراسة (14) إلى دور بعض الأحماض الأمينية في تعزيز الوظيفة الحيوية للجهاز المناعي، إذ لوحظ من خلال التجارب التي أجريت على حيوانات التجارب أن وجود الحامض الأميني الأرجينين له دور في تطور ونمو وازدياد أعداد الخلايا للمفاوية، وتعزيز تطور المناعة الأصلية، وازدياد كفاءة البلعمة للخلايا، وإنتاج الخلايا القاتلة الطبيعية natural killer cell. كذلك لوحظ وجود دور للحامض الأميني الجلوتامين، من خلال التجارب خارج جسم الكائن الحي (in vitro) والمتمثل في تعزيز كفاءة مستقبلات الخلايا المناعية للغشاء الخلوي.

أكدت العديد من الدراسات على دور الأحماض الأمينية المكونة للعديد من الببتيدات المشتقة من البروتينات الطبيعية، فالببتيدة المشتقة من بروتين الحنطة (الكليادين) بالتحلل الأنزيمي (Trypsin أو pepsin) لها دور مهم في زيادة تكاثر الخلايا اللمفية من نوع T، وتقليل الالتهابات المعوية الناتجة من إفراز معدلات عالية من المدورات الخلوية Cytokines، ويعمل الحامض الأميني الأرجينين على المساعدة في زيادة أعداد كل من الخلايا اللمفية والخلايا القاتلة الطبيعية الطبيعية، أما الحامض الأميني الجلوتاميك، فله دور واسع في تعزيز كفاءة مستقبلات الخلايا المناعية (15).

تتكون بروتينات نخالة الحنطة بصورة رئيسة من الألبومينات والجلوبيولينات وتشكل ما نسبته 15-20 % من مجموع بروتينات الحنطة، وتحتوي بصورة ثانوية على البروتينيزات. وتعتمد نسب هذه البروتينات على نوع الحنطة، وكذلك على موقع الزراعة (1). تتميز بروتينات النخالة بقيمة غذائية واقتصادية عالية، وتبلغ نسبتها 17.25 %. تعد الألبومينات أصغر بروتينات الحنطة، تتبعها الجلوبيولينات في الوزن الجزيئي، وتحتوي على كمية عالية من اللايسين والميثيونين مقارنة ببقية بروتينات الطحين (1)، وتوجد معظم الإنزيمات الفعالة فسيولوجياً في الألبومينات والجلوبيولينات، والتي تتركز في معظم الحبوب في غلاف البذرة، وخاصة طبقة الأليرون والجنين، ولذلك تذهب هذه البروتينات مع النخالة عند عمليات الطحن. وتشكل الألبومينات والجلوبيولينات حوالي 25 % من مجموع بروتينات حبة الحنطة (2). وقد أوضحت دراسة (3) أن معظم الإنزيمات (البروتينات) تتواجد في جزء النخالة من حبة الحنطة، حيث تمت في هذه الدراسة المقارنة بين بروتينات نخالة الحنطة وبروتينات الجنين وتبين أن بروتينات النخالة تحتوي على كمية أعلى من الأحماض الأمينية القاعدية، خاصة في الجلوبيولين، مقارنة ببروتينات الجنين، ومن أهم تلك الأحماض الأرجينين واللايسين، كما يحتوي الألبومين النخالة على كميات عالية من التايروسين والتريبتوفان والسيسيتين، بينما كانت نسبة الحامض الأميني الهستيدين متقاربة في كل من نخالة الحنطة والجنين. وقد ذكر (4) أن التحلل الأنزيمي يعد المقترح الرئيس للتحرير الفعال للببتيدات النشطة حيويًا من المصادر البروتينية، والتي تستعمل بصورة واسعة في تحسين الخصائص الغذائية والوظيفية للبروتين. يتأثر التحلل الأنزيمي بحجم الجزيئة البروتينية والمجموعات الفعالة فيها الكارهة للماء والمحبة للماء والمجموعات القطبية والأيونية للمتعللات البروتينية، والتي تؤثر بصورة مباشرة في الخواص الوظيفية وعلى مكونات الغذاء.

تعتمد فعالية الجهاز المناعي على درجة فعالية أنواع مختلفة من الخلايا، منها الخلايا البلعمية وحيدة النواة، والخلايا البلعمية مشكلة النواة، فضلاً عن الخلايا اللمفية التائية والبائية (T and B lymphocytes) والمسؤولة عن التصدي للأحياء المجهريّة الغريبة مثل البكتيريا والفيروسات والطفيليات.

وقد عرف (5) الببتيدات المحفزة للجهاز المناعي على أنها مركبات منخفضة الوزن الجزيئي، تتفاعل مع خلايا الجسم المختلفة في الجهاز المناعي، وتتضمن هذه الببتيدات (peptidic fragments of hormones, glycopeptides, immunoglobulins peptides isolated from food proteins).

تشكل المعدلات المناعية من مواد مختلفة التركيب الكيميائي، وتساعد في تنظيم الجهاز المناعي من خلال تحسين الاستجابة المناعية الخلوية والخلوية، وبحسب تركيبها الكيميائي. وتعد الببتيدات من أهم تلك المعدلات المناعية، وهي عبارة عن جزيئات كبيرة، لها القابلية على تعديل وتعزيز وظيفة خلايا الجهاز المناعي الذاتي Innate Immunity للجسم، من خلال تعزيزها لحيوية وتكاثر بعض أنواع الخلايا المناعية، منها الخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophage)، الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural Killer Cells)، وكل من الخلايا اللمفية التائية والبائية (T and B Lymphocytes)، كما تساهم في السيطرة على منع تطور الأورام في الجسم، من خلال زيادة نشاط الخلايا المناعية المختلفة من جهة، وزيادة قدرة تلك الخلايا المناعية النشطة على إفراز المدورات الخلوية Cytokines (6).

تتواجد العديد من البروتينات النباتية المعروفة بمحتواها من الببتيدات الحيوية، والتي تعمل على تحوير الاستجابة الخلوية المناعية المتخصصة وغير المتخصصة، وتشجيع إفراز المدورات الخلوية، التي تمتلك صفات قوية مضادة للالتهابات، وتؤدي دوراً مهماً في توازن الجهاز المناعي. ومن تلك البروتينات النباتية: بروتينات فول الصويا، إذ أمكن عزل ببتيدة أطلق عليها (Soymetide 13) والتي لها تسلسل من الأحماض الأمينية (His- Cys- Thr- Leu- Ala- Ile- Pro- Val- Asn- Lys- Pro- Gly- Arg) تم التعرف عليه بعد التحلل الأنزيمي للوحدة الثانوية β-conglycinin في تلك الببتيدة بإنزيم التربسين، والتي تتميز

جدول رقم (1): البروتينات القياسية وأوزانها الجزيئية

البروتينات	الوزن الجزيئي كيلو دالتن
Myosin	200
$\beta$ -galactosidase (Lactase)	116
phosphorylase b	97
serum albumin	66
Ovalbumin	45
carbonic anhydrase	31
Lysozyme	14
Aprotinin	7

## التطبيقات المناعية للمتخللات البروتينية

تم تنفيذ تجربة الدراسة على عينة من إناث الفئران البيضاء من نوع Swiss albino mice بلغت (20) فأرة، وجرى تقسيمها إلى أربع مجموعات، احتوت كل مجموعة على خمسة فئران بعمر (4-6) أسبوعاً وبوزن (18-22) غم، تم الحصول عليها من National centre for laboratory animal sciences, Hyderabad, India ، وقد تم تغذيتها على العليقة الخاصة بها وأذيت المتخللات البروتينية بالماء المقطر وأعطيت يومياً لمدة 45 يوماً بطريقة التجريب القموي. المجموعة الأولى مثلت مجموعة السيطرة وأعطيت ماء مقطراً فقط، والمجموعة الثانية أعطيت المتخللات البروتينية رقم 1 وبمقدار (0.5mg/kg) ، والمجموعة الثالثة أعطيت المتخللات البروتينية رقم 2 ، وأعطيت المجموعة الرابعة المتخللات البروتينية رقم 3.

## المواد المستعملة

- 1. تحضير الصبغة:** أذيب ما مقداره (0.005) غرام من الصبغة MTT(3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-bromide 2,5diphenyltetrazolium) في 1 مل من المحلول الملحي الوظيفي PBS ذي الأس الهيدروجيني 7، ووضعت على محرك مغناطيسي، وتم تمريرها على ورق ترشيح خاص للتخلص من البلورات الزرقاء غير الذائبة، وحفظت في قنينة معمة.
- 2. تحضير الوسط:** RPMI-1640 medium (Roswell Park memorial Institute) - medium (2) مكونات الوسط المحضر.

جدول رقم (2): مكونات وسط RPMI-1640

المركب	التركيز
RPMI with glutamine	16.4g
NaHCO <sub>3</sub>	2g
Nystatin(500,000U/100ml)	0.25ml
Streptomycin (1g/5ml)	0.5ml
Ampicillin(500mg/5ml)	1ml
Fetal calf serum (FCS)	100ml

تم مزج جميع المكونات ماعدا مصل العجل الجيني FCS (Fetal Calf serum) وأذيت بكمية قليلة من الماء المقطر منزوع الأيونات، ووضعت في مازج مغناطيسي، وتم ضبط الأس الهيدروجيني إلى 7.2، وأكمل الحجم إلى 900 مل، بعد ذلك أضيف 100 مل من مادة FCS وتم تعقيم الوسط باستعمال Nalgene filter unit (0.2µm) ، وتم توزيعه في قناني سعة 25 مل، ثم نقل إلى الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 3 أيام، للتأكد من تعقيمه وخلوه من التلوث، وحفظ في درجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

- 3. المشطر:** (Mitogen Concanavalin A Con A).
- 4. صبغة التريبيان الزرقاء Trypan blue:** تم تحضيرها بإذابة 1 غرام من الصبغة في 100 مل من المحلول الوظيفي ذي الأس الهيدروجيني PBS 7 ، ومررت خلال ورق ترشيح وإتمان رقم 1 (محلول خزين للصبغة) . حفظت بدرجة حرارة 4 م° ، وعند الاستعمال خففت الصبغة بعشرة أجزاء من PBS.

## المواد وطرق العمل

## المركز البروتيني

تم تحضير النخالة من خلال طحن حبوب الحنطة المحلية صنف إباء 99 المجهزة من دائرة البحوث الزراعية، وحضر المركز البروتيني منها بعد إزالة الدهن وفق طريقة (16).

## التحلل الإنزيمي

أجري التحلل الإنزيمي بحسب طريقة (16)، حيث تم توزيع المركز البروتيني في ماء أزيلت منه الأيونات 10:100 (وزن/حجم) في دوارق سعة 250 مل بمكررين . تم ضبط الأس الهيدروجيني لعلاق البروتين المعزول عند 7 باستعمال NaOH بتركيز 1N ، وتمت إذابة إنزيم Trypsin في محلول دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.05 مولار بنسبة (5 ملغم/ 5 مل) (إنزيم /محلول معادل). استخدم إنزيم التربسين Trypsin لإجراء عملية التحلل، وتمت إضافة الإنزيم إلى المحلول البروتيني ذي نسبة البروتين 10% ، وتم ضبط الرقم الهيدروجيني للخليط على 8، وهو الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم باستعمال هيدروكسيد الصوديوم تركيز (1 مولار). ثم تم نقله إلى حاضنة بدرجة حرارة 37 م°، وهي الحرارة المثلى لعمل الإنزيم لمدة ساعتين. بعد ذلك تم تثبيت فعالية الإنزيم بواسطة نقل الخليط إلى حمام مائي بدرجة حرارة 95 م° لمدة 10 دقائق. ثم أجريت له عملية نبذ مركزي بسرعة 8000 g لمدة 30 دقيقة . وقدرت درجة التحلل في النماذج، ثم جفد الراشح وحفظ للاستعمال لاحقاً.

## فصل المتخللات بتقنية الترشيح الهلامي

فصلت المتخللات بإمرار الراشح البروتيني على عمود السيفادكس G-25 ، الذي سبقت موازنته بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولاري، ذات الرقم الهيدروجيني 7 ، واستردت الأجزاء من العمود باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم نفسه الذي تم استعماله سابقاً في عملية الموازنة بسرعة جريان 30 مل /الساعة وبواقع 2 مل للجزء الواحد. بعدها تم قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانومتر بجهاز spectrophotometer لأجزاء الغسل والاسترداد، وجمعت الأجزاء على وفق المنحنيات الظاهرة، وتم الاحتفاظ بالأجزاء الناتجة في المجمدة بدرجة حرارة -18 م° لغرض إجراء التجارب اللاحقة.

## تقدير تركيز الببتيدات

لتقدير تركيز الببتيدات المتكونة أو المجموعات الأمينية الحرة تم أخذ 5 مل من الراشح (القمم) الناتجة من الترشيح الهلامي وتم خلطه مع 1 مل ماء مقطر، و10 مل من TCA بتركيز 12 %، مع التحريك لمدة 10 دقائق، ومن ثم تم ترشيحه بورق وإتمان 2، وخن الراشح بالتجميد لوقت التقدير، إذ تم إضافة 1 ملم كاشف (O-) OPA (Phthaldialdehyde) المحضر أنياً إلى 50 مايكروليتر من الراشح. وتم قياس الامتصاصية على طول موجي 430 نانومتر بجهاز spectrophotometer لمدة دقيقتين.

## تقدير الوزن الجزيئي للمتخلل البروتيني

اتبعت طريقة Laemmle (17) وطريقة Schagger (18) في تحديد الوزن الجزيئي للمتخلل البروتيني باستعمال الترحيل الكهربائي، بهلام متعدد الاكريل الأميد، وبوجود العوامل الماسخة (SDS- PAGE) باستعمال جهاز الترحيل الكهربائي المجهز من شركة Bio-Rad الأمريكية. تم استعمال البروتينات القياسية والموضحة بالجدول رقم (1) المجهزة من شركة Sigma، وحضرت البروتينات وفق تعليمات الشركة المجهزة.



- أضيف ما مقداره 100µl من مادة DMSO لكل حفرة لإذابة البلورات الأرومانية ووضعت الشريحة على سطح جهاز رجاج لمدة 10 دقائق.

- بعد ذلك أخذت قراءة الامتصاصية لكل حفرة على طول موجي 540nm باستعمال a multimode micro plate reader (BioTek, USA) وتم قياس الكثافة الضوئية للحفر مع وبدون إضافة Con A.

#### تقدير معامل البلعمة

اعتمدت الطريقة الموصوفة في (21)، مع تحويل طفيف، وكانت كالتالي:

- جمعت خلايا البلعمة الكبيرة (macrophages) بظروف معقمة، وحلت بمقدار 5 مل من وسط RPMI 1640 المبرد، وحضر عالق بقوة 1000g لمدة 10 دقائق.

- تم تحضير عالق من خميرة *Candida albicans* بواقع  $10^7$  (cell/ml) وعرض العالق لمعاملة حرارية 100 م° لمدة 10 دقائق. ثم علق في المحلول الوظيفي وتم الحصول على الفأر الذاتي PBS mouse autologous serum (10) % لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 37 م°.

- أضيف 0.2 ml من عالق الخميرة إلى 0.2 ml من عالق خلايا البلعم الكبيرة ( $10^6$  cell/ml) وترك المزيج ليتفاعل على حرارة 37 م° لمدة 30 دقيقة، بعد ذلك تم حساب كفاءة البلعمة على قوة امتصاصية بلغت 540 nm.

#### النتائج والمناقشة

تم الحصول على متحلات بروتينية، وقد لوحظ كما هو مبين في شكل رقم (1) أن أعلى درجة تحلل كانت 19.8% بعد مرور 240 دقيقة لجميع التراكيز، وأن درجة التحلل ازدادت مع زيادة تركيز الإنزيم المستخدم، وبلغت أعلى درجة تحلل 19.8% عند حجم 2مل إنزيم / 100 مل عالق بروتيني. وقد وجد (22) أن أفضل زمن للتحلل كان بعد مرور 240 دقيقة، حيث سجلت أعلى درجة تحلل للمتخلل البروتيني لبروتينات الشرش باستعمال إنزيم Trypsin، وكان أفضل تركيز للإنزيم هو 1/100 w/w. وفي دراسة (23)، جرى معرفة تأثير استعمال تراكيز مختلفة من إنزيم Alcalase على درجة التحلل الإنزيمي لبروتين نخالة الرز، حيث تم استخدام تراكيز من الإنزيم (0, 0.4, 1, 1.6, 2) % (E/S) (v/w)، وقد سجل أعلى درجة تحلل عند تركيز الإنزيم إلى المادة الأساس 2 % . وفي دراسة مماثلة، أجريت لمعرفة تأثير التحلل البروتيني للمعزول البروتيني لبروتين الشوفان وبروتين الحمص باستعمال إنزيم Trypsin وعلى رقم هيدروجيني 8 لمدة 3 ساعات وعلى درجة حرارة 37 م° أن أفضل تركيز للإنزيم كان (0.1) % (w/v).

#### 5. (DMSO) Dimethyl sulfoxide.

6. المصل البقري الجنيني (FBS) (Fetal bovine serum): بنسبة 10 %.

7. المحلول الملحي الوظيفي (PBS): وتم تحضيره من خلال مزج كل من: كلوريد الصوديوم NaCl (8) غرام، كلوريد البوتاسيوم KCl (0.2) غرام،  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.15) غرام،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2) غرام، حيث مزجت جميع المكونات وأضيفت في كمية قليلة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 1000 مل، وتم تعقيمه بالمؤعدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1 جو لمدة 30 دقيقة.

#### تحضير عالق خلايا أحادية النواة من الطحال

تم تحضير محلول الخلايا أحادية النواة من الطحال وفقاً لطريقة (19)، وعزل الطحال بظروف معقمة وتحت السيطرة، ووضع في قنار معقمة تحتوي على 3 مل من وسط RPMI-1640 medium المبرد، وتم ضغط الخلايا بمنخل معدني، وغسل العالق الناتج مرتين باستعمال وسط RPMI-1640 medium، وعومل بالطرد المركزي بقوة 200g لمدة 5 دقائق. بعد ذلك تم التخلص من الراشح وتم إعادة إذابة الخلايا في وسط RPMI-1640 medium complete الذي يحتوي على 10 % من محلول مصال العجل الجنيني FBS. تم حساب أعداد الخلايا باستعمال صبغة التريبيان الزرقاء، وأمكن تمييز الخلايا الحية عن الميتة التي تأخذ الصبغة خلال ثوان عدة بصورة ممتازة، حيث تمت العملية وفقاً للخطوات التالية:

- أخذ جزء واحد من عالق الخلايا بمقدار (0.2 ml) ومزجه مع حجم متساو من صبغة التريبيان الزرقاء (0.2 مل من صبغة التريبيان الزرقاء في 1.6 مل من المحلول الملحي الوظيفي).  
- أخذ 20µl من عالق الخلايا ووضعه على حافة chamber haemocytometer ثم تركه لمدة دقيقتين، ثم حساب أعداد الخلايا في أكبر مربع بمساحة (1mm<sup>2</sup>) باستعمال العدسة بقوة 40X. بعدها تم حساب أعداد الخلايا بتطبيق المعادلة التالية:

$$\text{Cell concentration (cell/ml)} = n \times d \times 10^4$$

حيث،

n = number of counted cells

d = dilution factor = 10 . 10

= inversion of volume index  $10^4$

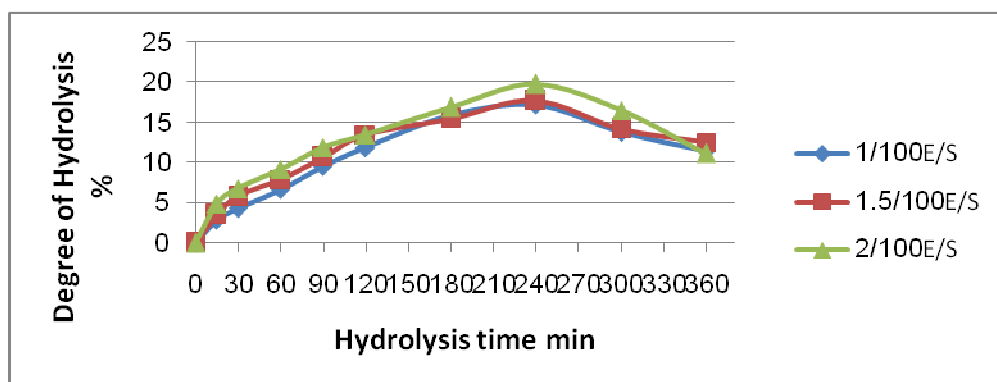
تم تقدير معامل البلعمة من خلال المعادلة التالية:

$$\text{عدد الخلايا المتبلعمة / عدد الخلايا الكلية} \times 100$$

#### قياس إنتاج الخلايا للمفوية

تم قياس تزايد أعداد خلايا المفوية باتباع الطريقة الموصوفة من قبل (20)، مع إجراء بعض التعديلات، كما يلي:  
- وزعت خلايا الطحال بواقع 200µl ( $5 \times 10^6$  cell/ml) لكل حفرة من الحفر للشريحة ذات bottom plate 96-well حفرة معقمة حاوية على المشطر Con A (2.5 µg/ml) وكانت نماذج السيطرة control غير حاوية على المشطر ConA، وحضنت بحاضنة مزودة بجو ثاني أوكسيد الكربون بنسبة 5 %، ودرجة حرارة 37 م° لمدة 72 ساعة.

- أضيف ما مقداره 10µL من MTT (5mg/ml) لكل خط وحضنت لمدة 4 ساعات تحت نفس الظروف.  
- عرضت الشريحة للطرد المركزي على 200g لمدة 10 دقائق، ثم تم التخلص من الراشح.

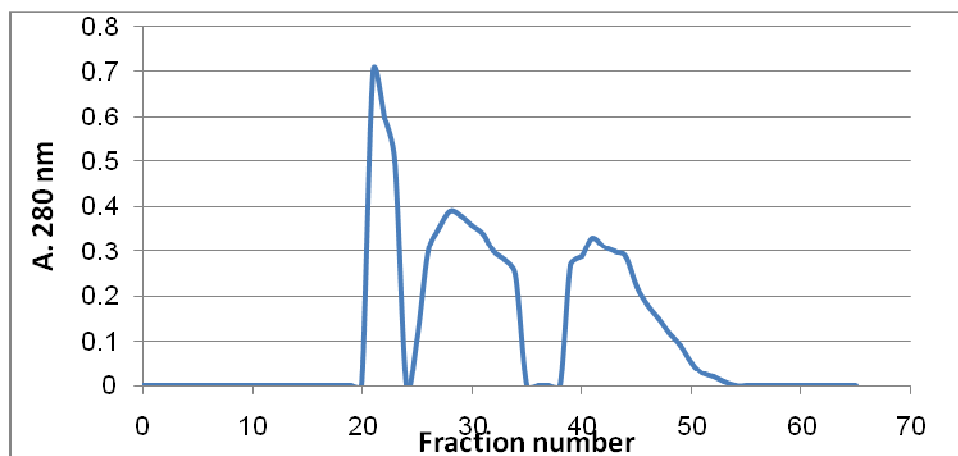


شكل رقم (1): منحنى يمثل التغير في درجة التحلل DH الإنزيمي للمركز البروتيني للنخالة الحنطة باستخدام إنزيم Trypsin بتركيزات مختلفة من المادة الأساس v/v (1:100, 1.5:100, 2:100).E/S ratios

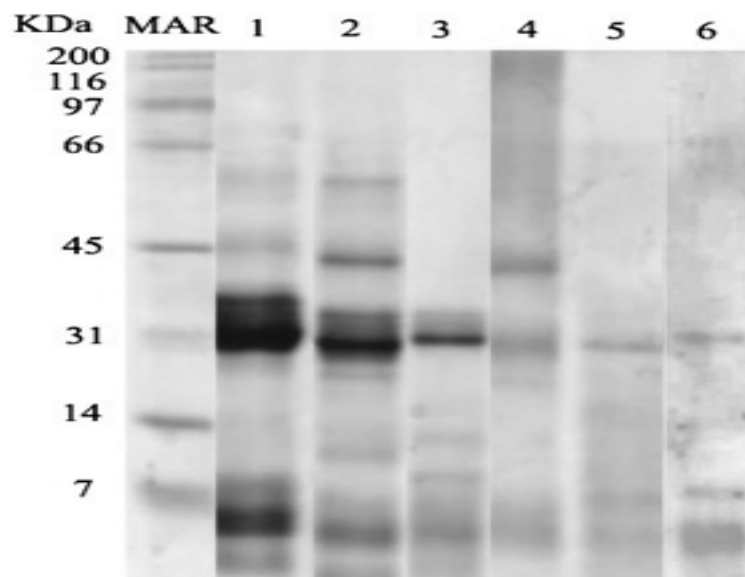
الجزئية للمتخللات البروتينية المقدره بطريقة الترحيل الكهربائي لمدة ساعة، حيث تبين أن معظم الأوزان الجزئية للبروتينات الموجودة في المركز البروتيني للنخالة تراوحت ما بين (66-96) كيلو دالتون، وأن الجزء الأعظم منها كان ضمن (35-41)، ويلاحظ ظهور حزم واضحة لبولي بيتايد في التحلل الإنزيمي ضمن مدى وزن جزيئي (31, 14, 10-5) كيلو دالتون، وهذا يتفق مع ما ذكرته نتائج دراسة (25)، حيث أمكن فصل ببتيدات نشطة بيولوجيا تتراوح أوزانها الجزئية بين (10-5) كيلو دالتون من بروتينات النخالة والتي أظهرت كفاءتها البيولوجية وامتلاكها فعالية مناعية.

وأظهرت نتائج الفصل بتقنية الترشيح الهلامي لمتحلل بروتينات نخالة الحنطة والذي تم تحلله باستخدام إنزيم Trypsin ولمدة 4 ساعات باستخدام عمود السيفادكس G-25 والموضح بالشكل رقم (2) الحصول على ثلاث قمم ظهرت في الأنابيب (21-24) و (25-34) و (39-53)، وقدرت تراكيز الببتيدات المفصولة ليكون أعلى تركيز للقمم رقم 3، إذ بلغ (0.789) ملغم/مل، تليها القمم رقم 2، إذ بلغت (0.546)، ثم القمم رقم 1، التي بلغ تركيزها (0.234) ملغم/مل.

وقد أظهرت نتائج دراسة (24) عند فصل متحلل بروتينات جنين الحنطة خلال عمود السيفادكس G-25 الحصول على خمس قمم، وبعد تقدير تركيز الببتيدات كانت تراكيزها أعلى مما تم الحصول عليه في الدراسة الحالية، إذ كانت (12.93، 16.32، 46.40، 16.60، 7.75) % على التوالي. يشير شكل رقم (3) إلى الأوزان



شكل رقم (2): الببتيدات الناتجة من كروماتوغرافي الترشيح الهلامي عبر عمود السيفادكس G-25 بأبعاد (1.5 X 55) سم باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.2 مولاري وبرقم هيدروجيني 7.0 وبسرعة جريان (30 مل/ساعة) وبمعدل (2 مل/أنبوبية)



شكل رقم (3): فحص الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد للمركز البروتيني في نخالة الحنطة ومحتلاتها باستعمال إنزيم التربسين Trypsin بدرجة حرارة حضان 37 م° ورقم هيدروجيني 8 ولفترات زمنية مختلفة MAR البروتينات القياسية 1- المركز البروتيني غير المتحلل. الأرقام من (2- 6) محتلات بعد فترات زمنية (0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4) ساعة على التوالي.

هذه النتائج متفقة مع ما ذكرته دراسة (25)، التي أجريت لمعرفة تأثير البيبتيدات المستحصل عليها من التحلل الإنزيمي لبروتين نخالة الحنطة، إذ وجد أن لها فعالية في تحفيز تضاعف الخلايا اللمفية. كما أظهرت نتائج دراسة (19) أن المحتلات البروتينية المستحصل عليها من التحلل الأنزيمي لبروتينات فول الصويا أعطت ازديادا في قيمة معامل SI إلى (1.356-1.578)، مقارنة بالسيطرة الخالية من المحتلات البروتينية، التي كانت (1.330 - 1.335)، فضلا عن الزيادة المعنوية بقيم كفاءة اليلعمة التي وصلت إلى (0.348-0.465). كما أكد (26) الفعالية المناعية للأجزاء المفصولة من نخالة الحنطة، حيث بين دورها في تحويل الاستجابة المناعية لخلايا الكبد والحث على إنتاج المدورات الخلوية. وقد أشارت مجموعة من الباحثين إلى إمكانية تحضير بيبتيدة ثلاثية أطلق عليها (Soymetide) والتي تتميز بفعاليتها العالية على تخصص الخلايا الجذعية إلى خلايا عادلة Neutrophile ، مما يؤدي إلى زيادة فعالية اليلعمة للإنسان نتيجة لزيادة أعداد تلك الخلايا في الدم، باعتبارها الخط الدفاعي الخلوي الأول في جسم الإنسان، وهو ما تم الاستدلال عليه من خلال القيم العالية للفعالية المناعية والتي وصلت إلى (10- 80) % (27).

وقد رت الفعالية المناعية لمحتلات بروتينات نخالة الحنطة خارج جسم الكائن الحي *In vitro* من خلال دراسة تأثيرها في ازدياد وتكاثر أعداد الخلايا اللمفية lymphocytes proliferation ، كذلك تقدير تأثيرها على الفعالية اليلعية لخلايا البلعم الكبيرة macrophage، واستعمل Con A وهو plant T-cell mitogen المعروف بقدرته وقابليته على حث تكاثر خلايا اللمفية كنموذج سيطرة. وتوضح النتائج المبينة في الجدول رقم (3) التأثير الواضح للمحتلات البروتينية لنخالة الحنطة في الخلايا الغير مستحثة (بدون إضافة المشطر Con A) والخلايا التي تم حثها بإضافة (Con A) ، إذ لوحظ فعل المحتلات في تعزيز ازدياد قيم المعامل SI index ، التي تراوحت من (0.26 – 0.59) ، وبلغت قيمته بعد إضافة Con A (0.30 - 0.98) . كما أمكنت ملاحظة فعل المحتلات البروتينية في ازدياد كفاءة عملية اليلعمة للخلايا اليلعية، والتي تعد الخط الدفاعي الأول تجاه الأجسام الغريبة. ويعتقد أن سبب ذلك يعود إلى قدرة تلك المحتلات على تحفيز إطلاق المدورات الخلوية cytokines ذات التأثير العالي على تحفيز وإظهار مستقبلات الخلايا المناعية، مما زاد من قابليتها على القيام بعملية اليلعمة، وبذلك ظهرت الزيادة المعنوية لمعامل اليلعمة الذي وصل إلى 0.767 ، مقارنة مع معامل السيطرة، الذي كان 0.231. وقد جاءت

جدول رقم (3): الفعالية المناعية للمحتلات البروتينية (1، 2، 3)

Phagocytic activity الفاعلية اليلعية	SI with Con A	SI without Con A	معامل اليلعمة %	المحتلات البروتينية
0.231	0.12	0.12(control)	0	1
0.245	0.30	0.26	63	
0.259	0.36	0.32	62	
0.302	0.49	0.29	63	
0.303	0.58	0.27	65	
0.233	0.12	0.12 (control)	0	2
0.344	0.59	0.51	56	
0.435	0.71	0.61	66	
0.455	0.78	0.61	64	
0.459	0.74	0.63	63	
0.202	0.12	0.12(control)	0	3
0.505	0.67	0.48	76	
0.561	0.83	0.53	79	
0.655	0.76	0.59	76	
0.767	0.98	0.57	78	

\*SI: Stimulation index

## المصادر

16. Adebisi A.; Adebisi A.; Ogawa T. and Muramoto K. (2008). Purification and characterization of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates. *J. Food Technol.* 43:35-43.
17. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.227: 680 – 690.
18. Schagger H.(2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1:16–22.
19. Kong X.; Guo M.; Hua Y.; Cao D. and Zhang C. (2008). Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioreso. Technol.* 99 :8873–8879.
20. Wang Y.; He H.; Wang G.; Wu H.; Zhou B.; Chen X. *et al.* (2010). Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. *Mar. Drug.* 8:255–268.
21. Duarte J.; Vinderola G.; Ritz B.; Perdigon G. and Matar C. (2006). Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiol.* 211:341–350.
22. Duan CC.; Yang LJ.; Li AL.; Zhao R. and Huo GC. (2014). Effects of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of whey protein concentrates. *Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol.* 13(4): 231-239.
23. Silpradit K.; Tadakittasarn S.; Rimkeeree H.; Winitchai S. and Haruthaithanasan V. (2010). Optimization of rice bran protein hydrolysate production using alcalase. *Asian. J. Food Agri.* 3(2):221-231.
24. Hu L.; Song R. and Gu Z. (2012). An antioxidant peptide produced by autolysis reactions from wheat germ. *Afr. J. Biotechnol.* 3640-3648.
25. Jack I. (2011). Studied on preparation and biological activity of wheat bran branpeptides. *Med. Res. (Abstract)*.
26. Neyrinck M.; Backer F.; Cani D.; Bindels B.; Stroobants A.; Portetelle D. and Delzenne M. (2008). Immunomodulatory properties of two wheat bran fractions – aleurone-enriched and crude fractions – in obese mice fed a high fat diet. *Int. Immunopharmacol.* 8:1423–1432.
27. Tsurukia T.; Kishia K.; Takahashia M.; Tanakaa M.; Matsukawaa T. and Yoshikawaa M.(2003). Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean L-conglycinin, is an fMLP agonist. *FEBS. Lett.* 540:206-210.
1. Jones D. and Gersdorff CEF. (1923). Proteins of wheat bran: albumine and prolamine analysis of globuline, isolation and elementary. *J. Biol. Chem.* 58:117-131.
2. Šramková Z.; Gregová E. and Šturdíka E.(2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta. Chimica. Slovaca.* 2(1):115-138.
3. Pedersen C. and Lindberg JE. (2010). Ileal and total tract nutrient digestibility in wheat wet distillers solubles and wheat dried distillers grains with soluble when fed to growing pigs. *Livestock Sci.* 132: 145-151.
4. Je JY.; Lee KH.; Lee MH. and Ahn CB. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res. Int.* 42:1266-1272.
5. Werner GH. (1987). Natural and synthetic peptides (other than neuropeptides) endowed with immunomodulating activities. *Immunol. Lett.* 16:363–370.
6. Abd El-Salam MH. and El-Shibiny S. (2013). Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. *Food Rev. Int.* 29(1):1-23.
7. Yoshikawa M.; Fujita H.; Matoba N.; Takenaka Y.; Yamamoto T.; Yamauchi R.; Tsuruki H. and Takahata K. (2000). Bioactive peptides derived from proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofact.* 12:143-146.
8. Meisel H. and Fitz-Gerald RJ. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.* 9(16):1289-1295.
9. Wroblewska B. and Jedrychowski L. (2005). Influence of enzymatic cow milk hydrolysates on IgA and IgG response of Balb/c mice organism. *Czech. J. Food Sci.* 23: 51–63.
10. Takahashi M.; Moriguchi S.; Yoshikawa M. and Sakasati R. (1994). Isolation and characterization of oryzanthen – a novel bioactive peptide with immunomodulating activities derived from rice albumin. *Biochem. Biol. Int.* 33:1151-1158.
11. Horiguchi N.; Horiguchi H. and Suzuki Y. (2005). Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subject. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (12):2445-2449.
12. Kannan A.; Hettiarachchy NS.; Lay JO. and Liyanage R. (2010). Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides.* 31:1629–1634.
13. Clare DA. and Swaisgood HE. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.* 83:1187-1195.
14. El-Gamal M.; Elmasry A.; El-Ghoneimy H. and Soliman M. (2011). Immunomodulatory effects of food. *Egypt. J. Pediatr. Allergy. Immunol.* 9(1):3-13.
15. Capozzi A.; Vincentini O.; Gizzi P.; Porzia A.; Longo A.; Felli C. *et al.* (2013). Modulatory effect of gliadin peptide 10-mer on epithelial intestinal CACO-2 cell inflammatory response. *J.PLOS. ONE.* 8(6):1-8.

## تقدير نسبة القلويد والفلافونيد والفيتامينات الذائبة في الدهون في جنين القمح

عبد المنعم حمد مجيد السامرائي، نهى علي هادي السامرائي

قسم الكيمياء / كلية التربية / جامعة سامراء / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: dr.abdulmonaim@uosamarra.edu.iq

### الملخص باللغة العربية

تم تقدير نسبة القلويد والفلافونيد في جنين القمح وكانت تساوي (8.4%) (7.6%) على التوالي. وتم احتساب النسبة المئوية للزيت المستخلص، فوجدت بأنها تساوي 11 % ، كما تم قياس تركيز الفيتامينات الذائبة بالدهون، أظهرت النتائج تراكيز كل من فيتامين A و D<sub>2</sub> و D<sub>3</sub> و E و K كما يلي: 3.12, 16.28, 0.338, 8.39, 27.29 بوحدة µg/ml على التوالي. تخلص الدراسة إلى أهمية جنين القمح غذائيا واقتصاديا.

**الكلمات المفتاحية:** الفلافونيد ، القلويد، الزيت المستخلص، الفيتامينات الذائبة بالدهون

---

## Estimation of alkaloids , flavonoids and fat soluble vitamins in wheat germ

Abdul-Monaim H.Al-Samarrai and Nuha A. H. Al-Samarrai

Dept. of Chemistry / College of Education / University of Samarra / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The present study aimed to estimate some of vital components of the wheat germ .The Percentages of flavonoids, alkaloid, fat and fibers were 7.6% ,8.4% ,1% and 15% respectively . The concentration of fat soluble vitamin K,E,D<sub>3</sub>,D<sub>2</sub> and A Were 3.12, 27.3, 8.4,0.34 and 16.3 µg/ml respectively. The results indicated the nutritional and economical importance of wheat germ as a good source of nutrition.

## المقدمة

## تحضير النموذج

تم اختيار حبوب القمح على أساس الجودة العالية والنوعية الممتازة المتواجدة بالأسواق المحلية في العراق، ومن ثم تم تهيئة العينة وتنظيف الحبوب بشكل جيد من أي شائبة موجودة فيها، وغسلها مرات عديدة بالماء، وتم تحضير (استنبات) جنين القمح وفقاً لطريقة (13).

## تقدير المكونات

**1- تقدير الرطوبة:** قدرت في فرن حراري على درجة حرارة (130) م لمدة ساعة واحدة ولحين ثبات الوزن (14)، وذلك وفقاً للمعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للرطوبة} = \frac{\text{وزن الرطوبة}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

**2- المكونات الصلبة الكلية:** قدرت بعد فقدان الرطوبة من العينة وفقاً للمعادلة التالية (14):

$$\text{المواد الصلبة الكلية} = 100\% - \text{النسبة المئوية للرطوبة}$$

**3- تقدير الفلافونويد:** قدرت كمية الفلافونيد بأخذ 10 غرام من الجنين واستخلصها عدة مرات وفقاً لطريقة (15).

**4- النسبة المئوية للدهن أو الزيت المستخلص:** قدرت في 100 غم من العينة (16).

**5- تقدير الفلوييد:** قدرت كمية الفلوييد بأخذ 10 غرام من الجنين واستخلصها عدة مرات بحسب طريقة (17).

**6- تقدير الألياف:** قدرت الألياف في 5 غرام من الجنين على أساس البضم بالحامض والقاعدة بحسب طريقة (14).

**7- تقدير الرماد:** قدرت في 2 غرام من الجنين بحسب طريقة (18).

## تقدير الفيتامينات الذائبة في الدهون

تم تقدير الفيتامينات الذائبة في الدهون باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC وباستخدام عمود الفصل C18 (10×3mm I.d) في شركة الحقول البيضاء – بغداد/ العراق، إذ تم فصل كل من فيتامين (A, E, D, K) وحسب طريقة (19)، وطبقاً للمعادلة التالية:

$$\text{التركيز بوحدة } \mu\text{g/ml} = \frac{\text{مساحة ذروة الفيتامين في العينة}}{\text{X التركيز القياسي X نسبة التخفيف}}$$

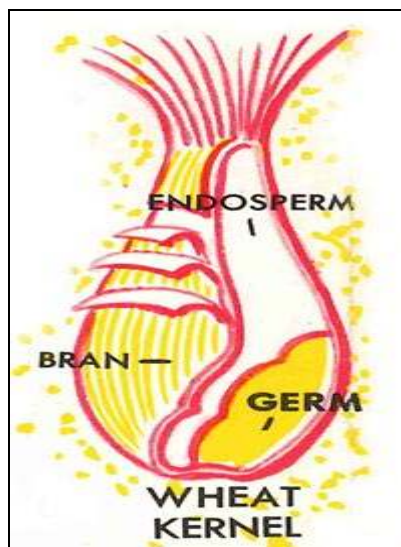
الذروة القياسية للفيتامين في المساحة القياسية

حيث،

التركيز القياسي = 25g/m

نسبة التخفيف = 1/1

رشيم القمح، أو جنين القمح، أو إنبات القمح هو الجزء الإنجابي الذي ينمو داخل النبتة، وهو جنين البذرة، حيث يوجد بين الأندوسبيرم وطبقات النخالة في الاتجاه المعاكس للشق الداخلي للحببة (1-3) شكل رقم (1). ويشكل جنين القمح الجزء الأسفل من حبة القمح، ولا يرى بالعين المجردة إلا بصعوبة بالغة، ولكنه يظهر جلياً إذا رطبت الحبة بالماء. وزنه يقدر بحوالي 4% من وزن الحبة. ويعد جنين القمح مصدراً غذائياً فعالاً، وهو عنصر النمو في حبة القمح، ويبلغ طوله حوالي 2 ملليمتر وعرضه حوالي 1 ملليمتر، وينمو منه ساق القمح وجذوره، ويتكون من جزئين رئيسيين هما: المحور الذي ينمو عند الإنبات مكوناً الساق والجذر، والقصعة وهي التي تعمل على إمداد المحور بالمواد الغذائية (2)، وعند الإنبات تقوم القصعة بتزويد المحور النامي بالغذاء المخزن بها، فضلاً عن إفراز الإنزيمات الهاضمة وإرسالها إلى الأندوسبيرم لهضم الغذاء المخزن به، ثم تمتصه وتوصله إلى المحور النامي. ولا يقتصر وجود الإنزيمات الهاضمة على جنين القمح، ولكنها توجد أيضاً في طبقة الأليرون، فضلاً عن الأندوسبيرم في حبة القمح. ويعتبر الرشيم (جنين القمح) أغنى مكونات حبة القمح بالمعادن والفيتامينات (4-6). وقد أطلق عليه تسمية (منجم المعادن و الفيتامينات). وهذا الجزء الصغير يتم إزالته أثناء إحدى مراحل تكرار حبوب القمح الكامل من أجل حفظ حبات القمح، إذ إن الزيوت الموجودة في جنين القمح سريعة التلف إذا لم يتم تصنيعها، وهذا ما يسبب التلف لحبات القمح، إذا لم تفصل عنها. وحينئذ، يتم حفظ جنين القمح في أوعية زجاجية معتمة لحمايته من عوامل الأكسدة (7، 8). يمتاز زيت جنين القمح بلون أصفر فاتح، وهو مستخلص من جنين القمح. له قوام سميك ورائحة قوية. كما أنه حساس جداً، يميل إلى تغيير خواصه إذا لم يتم تخزينه بالطريقة الصحيحة بعيداً عن الحرارة العالية، فيالتعرض للحرارة العالية قد يتعرض للتزنخ. ولكن إذا تم حفظه وتخزينه بالطريقة السليمة، قد يمتد عمره أشهراً عديدة (9)، حيث يعد مضاداً للأكسدة بسبب احتوائه على أحماض أوميغا الدهنية (10، 11). وله عدة فوائد منها حماية القلب بسبب احتوائه على مادة الأوكتاكوسانول والبوليكوسانول التي تسهم في تحسين وظائف القلب والأوعية الدموية. وقد وجد أيضاً أن للبوليكوسانول تأثيراً فعالاً في التحكم في إنتاج الكوليسترول عن طريق الكبد، وزيادة القدرة على التحمل، وقدرة العضلات بسبب احتوائه أوكتاكوسانول (12).



شكل رقم (1): شكل جنين القمح

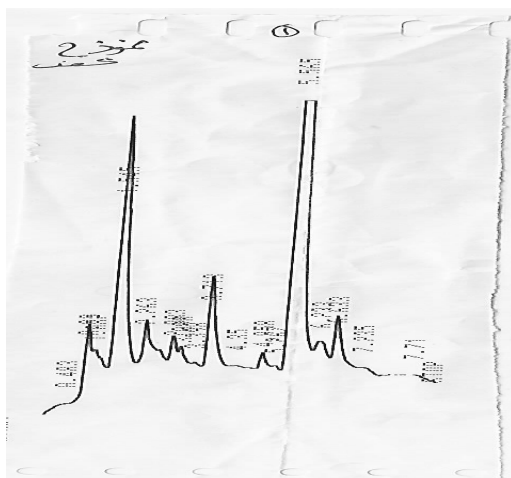
## النتائج والمناقشة

جدول رقم (2): زمن الاحتجاز والمساحة تحت القمة للفيتامينات القياسية المفصولة

Seq	Vit.	R.t	Area	Con. µg/ml.
1	Vit. A	1.52	95131	25 التركيز
2	Vit. D <sub>2</sub>	2.87	81259	µg/ml
3	Vit.D <sub>3</sub>	3.67	89039	
4	Vit.E	5.53	15201	
5	Vit.k	6.63	143245	

جدول رقم (3): تركيز وزمن الاحتجاز وعرض الحزمة واسم الفيتامين المفصول في الزيت المستخلص من جنين القمح، وذلك بالمقارنة مع زمن احتجاز وعرض الحزمة للفيتامينات القياسية

Seq	Vit.	R.t	Area	Con. µg/ml
1	Vit. A	1.54	61955	16.28 µg/ml
2	Vit. D <sub>2</sub>	2.88	1099	0.338 µg/ml
3	Vit.D <sub>3</sub>	3.713	29897	8.398 µg/ml
4	Vit.E	5.56	16597	27.29 µg/ml
5	Vit.k	6.63	17903	12.49 µg/ml



شكل رقم (2): الفيتامينات الذائبة في الدهون في الزيت المستخلص من جنين القمح والمفصولة بجهاز HPLC باستخدام عمود الفصل C18 (10×3mm I.d).

قدرت النسبة المئوية للرطوبة فكانت 12% ، أما المواد الصلبة الكلية فكانت 88% ، أما محتوى الألياف فكانت نسبته 15.1%. إن هذه النسبة المعتدلة تكون مفيدة لخفض مستويات الكوليسترول في الدم، وكذلك جلكوز الدم، بالإضافة إلى دور الألياف في خفض سرطان القولون (20)، وقد سجلت النسبة المئوية للزيت المستخلص 11% (جدول رقم 1).

تمتلك الألياف تأثيرات حيوية في امتصاص وإعادة امتصاص أحماض الصفراء، ومن ثم امتصاص الدهون الغذائية والكوليسترول. إن استهلاك كميات مناسبة من الألياف الغذائية يمكن أن يخفض مستوى الكوليسترول في مصل الدم ومخاطر أمراض القلب التاجية وارتفاع ضغط الدم والإمساك ومرض السكري وسرطان القولون (20).

وبعد ذلك أمرا طبيعيا، إذ يشكل وجود الدهون في البذور أعلى نسبة من أجزاء النبات الأخرى، لأنها تشكل غذاء للجنين في البذرة، وكذلك فإن الزيت يحتوي على الأحماض الدهنية غير المشبعة، وبالأخص أحماض أوميغا الدهنية، التي تمنع تصلب الشرايين، وتقلل من أمراض القلب الوعائية، كما يحتوي على مادة تسمى فيتوستيرول phytosterol، هذه المادة هامة جدا لخفض نسبة الكوليسترول الضار، مما يساعد على صحة القلب، ويعتبر جنين القمح أكثر الأطعمة التي تحتوي على هذه المادة المنخفضة للكوليسترول، التي تقلل من أمراض القلب، وكذلك تقلل من مخاطر ارتفاع ضغط الدم العالي (11). أما نسبة الرماد، فكانت منخفضة، وهذا يدل على وجود مستوى العناصر المعدنية العالية في جنين القمح، والضرورية لحياة الإنسان (21)، والتي سجلت حوالي 2% . أما النسبة المئوية للفلافونيد، فقد كانت 7.6%.

وتعتبر الفلافونيدات المسؤولة عن مضادات الأكسدة، بسبب قدرتها على منح الهيدروجين، أو الإلكترون المفرد، إذ إن لها القابلية على اختزال الجذور الحرة، وتثبيط الإنزيمات المسؤولة عن توليد أنواع الأوكسجين التفاعلية، كما تعمل الفلافونيدات أيضا على ربط العناصر، وبالتالي توقف سلسلة التكاثر أثناء عملية الأكسدة، مما يؤدي إلى حماية الجزيئات البيولوجية الداخلة في تركيب الخلية الحية ضد الأكسدة (22). أما نسبة الفلويديات فكانت 8.4%، وهي مركبات مهمة في الطب، وتدخل في تركيب العديد من العقاقير المهمة، وتمتلك تأثيرات فيسيولوجية مهمة على الحيوانات. وتعد الفلويديات مثل Solasodine مادة أولية في تصنيع العقاقير السترويدية، وتمتلك بعض الفلويديات الموجودة في النبات خواصا مختلفة منها كمواد مضادة للتشنج Spasmolytic، ومضادة لغفران الكولين anti-cholinergic ، كما تستخدم كمادة مخدرة anesthetic (23).

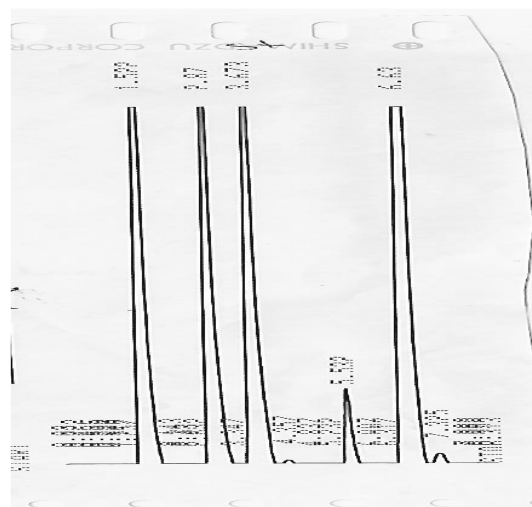
جدول رقم (1): التقديرات التي تم الحصول عليها من الدراسة من المواد الغذائية والرطوبة في جنين القمح

المواد الغذائية	تقدير النسبة %
الرطوبة	12
المواد الصلبة الكلية	88
الألياف	15.1
الرماد	2
نسبة الزيت المستخلص	11
الفلافونيدات	7.6
الفلويدات	8.4

## تقدير الفيتامينات الذائبة في الدهون

قدرت تراكيز الفيتامينات A, D<sub>2</sub>, E, K بالزيت المستخلص من جنين القمح وذلك بالمقارنة بين زمن احتجازها مع زمن الاحتجاز القياسي، حيث تراوحت التراكيز من أعلى تركيز سجل لفيتامين E 27.29 µg/ml، إلى أقل تركيز سجل لفيتامين D<sub>2</sub> 0.338 µg/ml، أما الفيتامينات الأخرى A, D<sub>3</sub>, K، فسجلت التراكيز 16.28 و 8.39 و 12.49 µg/ml على التوالي بوحدة µg/ml (جدول رقم 2، 3، شكل رقم 2، 3).

9. Marlene A. (2009). Healing with Aromatherapy. McGraw Hill. USA. P.: 406-410.
10. Bosquet J.; Chen DT. and Lancaster JM. (2012). Characterizing the efficacy of fermented wheat germ extract against ovarian cancer and defining the genomic basis of its activity. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 22(6):960-967.
11. Hargrove A.; Greenspan P.; Hartle DK. *et al.* (2004). Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Exper. Biol. Med.* 229(3):215.
12. Torres JJ.; Agell JL.; Bassilian N. and Cascante SM. (2002). Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis /pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J. Biol. Chem.* 277(48):46408-46414.
13. Bewley JD. and Black M. (1994). Seeds. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York.
14. Chopra SL. and Kanwar JS. (1991). Analytical agricultural chemistry. Kalyani Publications, New Delhi. P.: 297.
15. Mattila P. and Hellström J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J. Food Compos. Anal.* 20:152-160.
16. Jeffry GH.; Bassett J.; Mendham J. and Denney RC. (1987). Quantitative chemical analysis. Academic Press. USA. P.: 633.
17. Boham AB. and Kocipai AC. (1994). Flavonoid and condensed tannins from leaves of Hawaiian *vaccinium vacinulum* and *V. calycinium*. *Pacific. Sci.* 48:458-463.
18. دلالي، باسل كامل، الحكيم، صادق حسن (1987). تحليل الأغذية. كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل. العراق.
19. Graeve M. and Janssen D. (2009). Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: application to exceptional marine lipids. *J. Chromatog.* 877:1815-1819.
20. Ifesan BOT.; Ijarotimi OS. and Osundahun OF. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of *Ocimum* sp. *J. Food Technol.* 4(4):318-321.
21. Bhat R.; Kiran K.; Arun A. and Karim A. (2010). Determination of mineral composition and heavy metal content of some nutraceutically valued plant products. *Food Anal. Method.* 3:181-187.
22. Okwu DE. (2004). Phytochemicals and vitamin content of indigenous spices of Southeastern. *Niger. J. Sustain. Agric. Environ.* 6(1): 30-37.
23. Denwick PM. (2002). Natural products: a biosynthetic approach. 2<sup>nd</sup> ed. England. John Wiley and Sons, Ltd. Pp.: 241-243.



شكل رقم (3): الفيتامينات القياسية الذاتية في الدهون والمفصولة بجهاز HPLC باستخدام عمود الفصل C18 (10×3mm I.d)

#### المصادر

1. Puztai AD. and Ewen SW. (1993). Antinutritive effects of wheat germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. National library of medicine. National Institutes of Health. USA. Pp.:313-321.
2. Rizzello CG.; Mueller T.; Coda R.; Reipsch F.; Nionelli L.; Curiel JA. and Gobetti M. (2013). Synthesis of 2-methoxy benzoquinone and 2,6-dimethoxybenzoquinone by selected lactic acid bacteria during sourdough fermentation of wheat germ. *Microb. Cell Fact.* 11-12(1):105.
3. Demidov LV.; Manziuk LV.; Kharkevitch GY.; Pirogova NA. and Artamonova EV. (2008). Adjuvant fermented wheat germ extract (Avenar) nutraceutical improves survival of high-risk skin melanoma patients: a randomized, pilot, phase II clinical study with a 7-year follow-up. *Cancer Biother. Radiopharm.* 23(4):477-482.
4. Brady PG.; Vannier AM. and Banwell JG. (1978). Identification of the dietary lectin, wheat germ agglutinin in human intestinal contents. *Gastroenterol.* 75(2): 236-239.
5. Puztai A.; Ewen SW.; Grant G. *et al.* (1993). Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N- acetylglucosamine-specific lectins. *Br. J. Nutr.* 70(1):313-321.
6. Megahad OA. and El Kinawy OS. (2002). Studies on the extraction of wheat germ oil by commercial hexane. *Grasas. Aceites.* 53 (4): 414-418.
7. Walter F.; Scholl I.; Untersmayr E. *et al.* (2004). Functionalisation of allergen-loaded microspheres with wheat germ agglutinin for targeting enterocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315(2):281-287.
8. Watz B.; Neudecker C.; Hansch GM. *et al.* (2001). Dietary wheat germ agglutinin modulates ovalbumin-induced immune responses in brown Norway rats. *Br. J. Nutr.* 85(4): 483-490.



## التحري عن أضداد البروسيلا باستخدام اختبارات التراص المصلي و2- ميركايتوإيثانول لدى بعض المراجعين للعيادات الخارجية في مدينة سامراء وضواحيها

أسماء عيسى محمود

قسم التحليلات المرضية / كلية العلوم التطبيقية / جامعة سامراء / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: asma\_easa@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

تضمنت الدراسة تشخيص حمى مالطا (داء البروسيلا) لدى أشخاص يشتبه بإصابتهم بداء البروسيلا، وكذلك عينة من أشخاص أصحاء لمعرفة فيما إذا كان هناك أشخاص حاملين لهذه الأضداد، وخاصة في المناطق الريفية باستخدام الاختبارات المصلية، والكشف عن أضداد هذه الجرثومة. بينت النتائج أن نسبة (76,7%) من العينات التي أعطت نتيجة موجبة كانت تعود لمرضى يقطنون الأرياف و (23,3%) للأشخاص في مركز المدينة، بينما أعطت جميع العينات التي جمعت من أشخاص أصحاء نتيجة سالبة. تم استخدام طريقة RBT و STAT في الكشف عن أضداد البروسيلا لبيان أفضل الطرق.

**الكلمات المفتاحية:** حمى مالطا، اختبار الروز بنغال، اختبار الانابيب ، 2- ميركايتوإيثانول

## Investigation of *Brucella* antibodies using serological agglutination tests and 2-Mercaptoethanol in some outpatients in the city of Samarra and its suburbs

Asmaa E. Mahmood

College of Applied Sciences / University of Samarra / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The study was carried out employing RBT and STAT methods for diagnosis of Malta fever in patients suspected of Brucellosis as well as in apparently healthy individual living in the city and in the suburb areas to identify the carrier cases of the disease. The study showed that, 77% of the cases that gave positive result, were came from patients living in the suburb areas, while only 23% of the positive cases came from individuals living in the city. None of healthy individual gave positive reaction. Comparison from using RBT and STAT tests was carried out to discover the best methods for detecting brucella antibodies.

## المقدمة

معقمة، بعدها نقلت النماذج إلى المختبر في صندوق من الفلين المتلج، بعدها تم فصل المصل باستخدام جهاز الطرد المركزي 3000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم حفزت المصل بدرجة حرارة 4 درجة مئوية.

## الاختبارات المصلية

أخضعت جميع عينات المرضى إلى الفحوصات التالية: RBT و STAT و 2ME test.

1- اختبار تالزن الشريحة (Rose Bengal Test - RBT): تم إجراء هذا الاختبار بحسب ما ورد في (12).

2- اختبار التالزن بطريقة الأنابيب (Standard Tube Agglutination Test - STAT): تم إجراء هذا الاختبار حسب ما ورد في (13).

## النتائج والمناقشة

في هذه الدراسة، تم جمع عينات من أشخاص مراجعين للعيادات الخارجية في مدينة سامراء وضواحيها (الريف)، ممن ظهرت عليهم أعراض مرض البروسيللا، وبواقع (98) عينة: (30) من الذكور و (68) من الإناث، وبين الجدول رقم (1) أن (43) عينة ونسبة 43.9% من مصول الأشخاص الذين يشتبه بإصابتهم بحمى مالطا أظهرت إيجابية لمرض البروسيللا. كما يبين الجدول أن عدد الإناث المراجعات للعيادات كان أعلى بكثير من عدد الذكور، مما يمكن تفسيره بأن بعض النساء ربما تعاني من آلام المفاصل التي تشترك أعراضه مع أعراض حمى مالطا.

جدول رقم (1): الأعداد والنسب المئوية للإصابة بحمى مالطا بحسب الجنس

النتائج	الذكور		الإناث		المجموع
	العدد	النسبة%	العدد	النسبة%	العدد
إيجابية	17	56.6	26	38.2	43
سلبية	13	43.4	42	61.8	55
المجموع	30	30.6	68	69.4	98

كما أظهرت النتائج في جدول رقم (2) أن ما نسبته 49 % من المراجعين الذين تظهر عليهم أعراض مرض البروسيللا هم من سكان النواحي الريفية لمدينة سامراء، في حين كانت النسبة المتبقية من مركز المدينة. ومن ملاحظة النتائج يتبين أن الأعداد متقاربة لأن أعراض هذا المرض تشترك مع أعراض أمراض أخرى، وخاصة التهاب المفاصل وارتفاع درجة الحرارة.

لكن، بملاحظة ما جاء من نتائج في جدول رقم (3)، يتبين أن نسبة الإصابة لدى سكان الريف كانت أعلى من سكان المدينة، إذ بلغت 76.7 % مقارنة مع المصابين من مركز المدينة، الأمر الذي يمكن تفسيره بأن سكان المناطق الريفية في تماس مباشر مع الحيوانات المصابة، مما يجعلهم أكثر عرضة للإصابة بهذا المرض، وهذا يتفق مع ما توصلت إليه نتائج دراسة (14)، حيث وجدت أن العاملين في الحقول والذين هم في تماس مباشر مع الحيوانات، وكذلك الأطباء البيطريين، هم أكثر عرضة للإصابة بحمى مالطا. كما يلاحظ من الجدول أن نسبة إصابة الإناث كانت أعلى مما لدى الذكور، الأمر الذي يمكن تفسيره بأن أكثر العاملين في مجال رعاية الحيوانات في المناطق الريفية لمدينة سامراء هن من الإناث.

جدول رقم (2): الأعداد والنسب المئوية للمراجعين للعيادات الخارجية بحسب المنطقة الجغرافية

الموقع الجغرافي	العينات الموجبة		العينات السالبة		النتائج	
	العدد	النسبة%	العدد	النسبة%	العدد	النسبة%
المدينة	10	23.3	40	72.7	50	51
الريف	33	76.7	15	27.3	48	49
المجموع	43	43.9	55	56.1	98	100

داء البروسيللا أو الحمى المتموجة أو الحمى المالطية أو حمى البحر الأبيض المتوسط أسماء لمرض واحد ينتج عن العدوى بأنواع مختلفة من بكتيريا البروسيللا *Brucella*، وهي عدوى تصيب الإنسان نتيجة انتقال البكتيريا المسببة للمرض من الحيوان إليه (1). هناك ستة أنواع من هذه الجرثومة؛ ثلاثة أنواع منها فقط هي المسؤولة عن انتقال المرض للإنسان، وهي جرثومة بروسيللا الغنم *Brucella melitensis*، جرثومة بروسيللا البقر *Brucella abortus*، وجرثومة بروسيللا الخنازير *Brucella suis*. إن هذا المرض واسع الانتشار، ويعتبر مشكلة صحية في بلدان البحر الأبيض المتوسط، الشرق الأوسط، جنوب آسيا، وجنوب أميركا (2،3).

يمكن تشخيص الحمى المالطية بطرق مختبرية، مثل زرع الدم، والاختبارات المصلية، إذ يعطي الزرع إثباتاً قاطعاً لداء البروسيللات، إلا أن زرع الميكروب يستغرق وقتاً، حيث إن النمو الجرثومي بطيء نسبياً، ويحتاج إلى خبرة مخبرية، وعينات مجموعة بشكل ملائم. وعلى الرغم من أن الزرع هو الاختبار المعياري لداء البروسيللات وقياس معدل إيجابية الزرع الذي يكون مرتفعاً في الحالات الحادة، إلا أن مستوى العزل يتناقص بشكل ملحوظ في الإصابات المزمنة، علاوة على أن الزرع ينتبط عندما تستخدم المضادات الحيوية. ولهذا فإن التشخيص يعتمد عادة على الطرق المصلية غير المباشرة (4، 5). أما الاختبارات المصلية، فيستخدم العديد منها لغرض تشخيص داء البروسيللا، وأهمها اختبار التالزن Agglutination Tests، مثل اختبار Rose Bengal Test (RBT)، والمادة الكاشفة في هذا الاختبار هي بكتيريا *Brucella abortus* المصبوغة بصيغة الروز بنغال Ph 3.6، وبسبب سهولة الاختبار، غالباً ما يستخدم للكشف عن أضداد البروسيللا في مصول الأشخاص الذين يشتبه بإصابتهم بالبروسيللا، مما يجعله اختباراً شائعاً في المختبرات ذات الإمكانيات المحدودة. وبسبب ظهور نتائج سلبية كاذبة لهذا الاختبار بسبب ظاهرة البروزون Prozone أو البوستزون Postzone، من الضروري تأكيد نتائج هذا الاختبار باختبارات أخرى (5-7)، مثل طريقة التالزن بالأنابيب القياسية (STAT) (8). إن وجود الأجسام المضادة لا يعني بالضرورة الإصابة بالبروسيللا، لاحتمال حدوث تصالب مع جراثيم أخرى سلبية الغرام، مما يعطي نتيجة إيجابية كاذبة (9). كما أن معظم الاختبارات المصلية المعتادة التي تعتمد عليها تشخيص داء البروسيللا لا تفرق بين الإصابة الحديثة والمزمنة، لأنها لا تفرق بين الجسم المضاد IgG و IgM. فباستخدام المركب 2-mercaptopethanol، فإنه يحطم رابطة ثنائي الكبريتيد وينهي بلمرة IgM، وبذلك يبطل مفعوله، وبالتالي فإن أي تالزن يظهر يشير إلى وجود IgG كونه لا يتأثر بالمركب 2-ME، مما يعني أن الإصابة مزمنة (10). ويستخدم ME-2 بالمشاركة مع STAT للتمييز بين الأضداد الراسية النوعية IgG و IgM. يعد اختبار ME-2 تعديلاً لاختبار STAT، ويعد كشف الأضداد النوعية IgM هاماً لتشخيص المرضى المصابين بداء البروسيللات الحاد، ولتمييز المصابين بداء البروسيللات، المزمن تكون أضداد IgM النوعية موجودة في العدوى الباكورة، وتبقى عادة قابلة للكشف لعدة أسابيع إلى أشهر. وفي بعض الحالات يمكن أن تستمر أضداد IgM سنة بعد العدوى. تتطور أضداد IgG النوعية بشكل متأخر في العدوى، وتوجد في المصل أشهراً أو حتى سنين بعد شفاء المريض (11).

وبهذا، فقد هدفت الدراسة الحالية إلى الكشف عن احتمالية وجود أشخاص يحملون أضداد البروسيللا، والتحري عن أفضل الطرق للكشف عن وجود تلك الأضداد.

## المواد وطرق العمل

جمعت عينات المصل من المرضى عن طريق سحب الدم من الوريد من كل مريض، وحفظت كل عينة من المصل في أنابيب إندروف Eppendrofs tube لغرض إجراء الاختبارات المصلية. جمعت (98) عينة من مصول أشخاص يعتقد بإصابتهم بداء البروسيللا من المرضى المراجعين للعيادات الخارجية في مدينة سامراء، و(40) عينة من أشخاص أصحاء ومن كلا الجنسين وبأعمار مختلفة. تم سحب 6 مل من الدم في أنابيب زجاجية

الاستجابة المناعية ليكتيريا *Yersinia enterocolitica*، بالإضافة إلى الاستجابات المصلية الأخرى (25).

#### الشكر والتقدير

تشكر الباحثة كلية العلوم التطبيقية في جامعة سامراء لتقديمها الدعم والمساندة لإتمام هذه الدراسة.

#### المصادر

1. Al-Attas R.; Al-Khalifa M.; Al-Qurashi A.; Badawy M. and Al-Gualy N. (2002). Evaluation of PC R.: culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Ann. Saudi. Med. 20: 224-228.
2. Young E. (1995). An overview of human brucellosis. Clin. Infect. Dis. 2 (1):283-293.
3. Refai M. (2002). Incidence and control of brucellosis in the near East region. Vet. Microbiol. 90: 91-110.
4. Romero C.; Gamazo C.; Pardo M. and Lopez K. (1995). Specific detection of Brucella DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33:615-617.
5. Franco MP.; Mulder M.; Gilman RH. and Smits HL. (2007). Human brucellosis. Lancet. Infect. Dis. 7:775-786.
6. Corbel MJ.; Alton G G.; Banai M.; Diaz R.; Dranovskaia BA. et. al. (2006). Brucellosis in human and animals. Geneva: WHO Press.
7. Muma JB.; Lund A.; Nielsen K.; Matope G.; Munyeme M. et. al. (2008). Effectiveness of rose bengal test and fluorescence polarization assay in the diagnosis of Brucella spp. infections in free range cattle reared in endemic areas in Zambia. Trop. Anim. Health Prod. 41: 723-725.
8. Al-Dahouk S.; Tomaso H.; Nockler K.; Neubauer H. and Frangoulidis D. (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. Clin. Lab. 49:577-589.
9. Lulu R.; Araj G.; Khateeb M. and Mustafa M. (1988). Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases. Q. J. Med. 66:39- 42.
10. Deutsch HF. and Morton JI. (1957). Dissociation of human serum macroglobulins. Science. 125:600-601.
11. Zeytinoglu A.; Turhan A.; Altuglu I.; Bilgic A.; Theresia H. and Smits HL. (2006). Comparison of Brucella Immunoglobulin M and G flow assays with serum agglutination and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of brucellosis. Clin. Chem. Lab. Med. 44(2): 180-184.
12. Morgan WJB.; Mackinnon DT.; Gill KPW.; Gower SGM. and Norris PIW. (1978). Brucellosis diagnosis: standard laboratory techniques report. Series No. 1. Weybridge, England.
13. Alton GG.; Jones LM.; Angus RD. and Vetger JM. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA.
14. Tilak R.; Tilak V.; Bhat KG. and Hemashetter BM. (2007). Evaluation of different serological techniques in laboratory diagnosis of brucellosis. Indian J. Prev. Soc. Med. 38(3-4): 135-141.

جدول رقم (3): نسب الإصابات بين سكان الريف والمدينة

الجنس	الإصابات					
	المجموع		مدينة		ريف	
	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد
ذكور	37.2	16	40	4	36.4	12
إناث	62.8	27	60	6	63.6	21
المجموع	100	43	23.3	10	76.7	33

أظهرت النتائج في جدول رقم (4) أن (33) عينة من مجموع (43) قد أعطت نتيجة موجبة باستخدام طريقة الـ RBT. ويستخدم هذا الاختبار غالباً للكشف السريع عن أضداد البروسيلا في مصل الأشخاص الذين يشتبه بإصابتهم بالبروسيلا، إذ يعتمد على التلازم مابين الأضداد في مصل المريض وبين الخلية الجرثومية المصبغة والمقتولة (15)، حيث بينت النتائج أن حساسية اختبار الـ RBT 77.8% ، بينما كانت نسبة الحساسية للاختبار نفسه في دراسة (16) 57.5% ، وكانت 93.9 و 100% على التوالي في كل من دراسة (17، 18). إن ظهور نتيجة سلبية كاذبة في العينات بهذا الاختبار False negative ربما يعود إلى حدوث ظاهرة البروزون Prozone أو بوستزون Postzone ، كما أن حساسية الـ RBT تعتمد على تركيز المستضد وعلى تحضير المستضد التجاري المستخدم في مختلف المختبرات، بالإضافة إلى انخفاض نسبة حساسية هذا الاختبار في الدراسة الحالية، والذي ربما يرجع إلى أن الإصابة حديثة جداً، ولم يكتمل تكون الأجسام المضادة. إلا أن سهولة هذا الاختبار يجعله يستخدم كخطوة أولى للكشف عن الأجسام المضادة لـ جراثيم البروسيلا (19). وعلى الرغم من أن اختبار الـ RBT يعتبر من أسرع وأسهل الاختبارات المصلية التقليدية، إلا أنه يعطي نتائج سلبية كاذبة في بعض الأحيان، لذلك من الضروري إجراء اختبار آخر.

جدول رقم (4): نتائج الكشف عن أضداد البروسيلا باختبارات مختلفة

الاختبار	العينات الموجبة		العينات السالبة	
	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %
RBT	33	77.8	9	22.2
STAT	43	100	0	0
2-ME	15	40.7	28	59.3

الاختبار الثاني المستخدم في الدراسة الحالية هو STAT ، حيث كانت حساسيته (100%) وبمقارنة 1:160 بالمقارنة مع RBT (77.8%) . وقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن معيارية 1:160 تعد أفضل معيار لحساسية الاختبار (20)، بالرغم من أن بعض الدراسات الأخرى قد أشارت إلى أن المعيارية <1/160 أيضاً تقع ضمن تشخيص البروسيلا، وخاصة في المناطق التي يستوطن بها المرض (21). وقد جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع دراسة (1)، إذ وجد أن حساسية اختبار STAT كانت 100% ، بينما جاءت غير متوافقة مع نتائج دراسة (15)، والتي أعطت حساسية للاختبار نفسه نسبتها 62.5% . إن ارتفاع نسبة حساسية هذا الاختبار بهذه الطريقة ربما يعود إلى أن معظم المرضى يعانون من المرض لفترة تتعدى 3 أشهر، في حين أن انخفاض نسبة حساسية الاختبار في الدراسة الأخرى ربما يعود إلى أن المرضى إصابتهم حديثة (19).

كما تبين النتائج في نفس الجدول (رقم 4)، أن حساسية العينات الموجبة لاختبار 2- ميركابتوإيثانول كانت 40.7%، مما يعني وجود أضداد IgG متوافقة مع مرحلة مزمنة للمرض أو حالة انتكاسة، بينما يعد اكتشاف المستويات المرتفعة من الأضداد النوعية IgM مؤشراً جيداً للمرض أو للإصابة الحادة أو تحت الحادة (22، 23). ويعد اختبار 2- ميركابتوإيثانول مهماً للكشف عن نوع الأجسام المضادة في مصل المريض، حيث يمكن قياس معيارية الجسم المضاد IgG بمعاملة المصل باختبار 2- ميركابتوإيثانول لغرض تعطيل IgM ، بينما يبقى IgG (24). ووفقاً لتحديد تأثير IgM فإن 2- ميركابتوإيثانول- MAT يثبت

15. Smits H and Kadri M (2005). Brucellosis in India: a deceptive infectious disease. *Indian. J. Med. Res.* 122: 375-384.
16. Hussein MZ; Abou-Elnoeman SA.; Abou-El elanin A.; Al- Fikky A.; El-Agamy I. and Shaaban AAM. (2006). Evaluation of rose Bengal test, standard tube agglutination test and nested PCR for the diagnosis of human brucellosis. *Egypt. J. Med. Microbiol.* 15(2): 249- 256.
17. Mesa J.; Gonzalez J.; Reguera M.; Martin L.; Palmero S. and Colmenero J. (2005). Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin. Microbial. Infect.* 11: 221–225.
18. Altwegg M. and Bohl E. (1985). Evaluation of a rapid reliable and inexpensive screening test for serological diagnosis of human brucellosis. *Zentbl. Bakteriol.* 260:65-70.
19. Clavijo E.; Díaz R.; Anguita A.; Garcia A.; Pinedo A. and Smits H. (2003). Comparison of a dipstick assay for detection of brucella-specific immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 10: 612–615.
20. Serra J. and Vinas M. (2004). Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. *Intern. Microbiol.* 7:53–58.
21. Martin MS.; Guinea EL.; Carrero GP.; Visedo OR.; Garcia CS.; Calvo DOT. *et. al.*(1992 ). Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic tests. *Med. Clin. (Barc.)* 98: 481-485.
22. Moyer NP.; Evins GM.; Pigott NE.; Hudson JD.; Farshy CE.; Feeley JC. and Hausler WJ. (1987). Comparison of serologic screening tests for brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1969-1972.
23. Nielsen K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90: 447-459.
24. Klein GC. and Behan KA. (1981). Determination of brucella immunoglobulin G agglutinating antibody titer with dithiothreitol. *J. Clin. Microbiol.* 14:24-25.
25. Garin-Bastuji B.; Hummel N.; Gerbier G.; Cau S.; Pouillot R.; Da Costa M. and Fontaine JJ. (1999). Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Microbiol.* 66:223-233.

**N.B** The views expressed in this issue are of the authors and do not necessarily reflect the views of the Editorial Board or the policies of the International Centre.

**Copyright © 2016** by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or copied in any form or by any means without prior written permission from the Editor-in-Chief of the Journal.