

Investigation on Ornithine Decarboxylase Activity and Level of Putrescine, Spermidine and Spermine in Hydatid Cyst

Bahrami S^{1*}, Najafzadeh H², Shahriari A³, Ahmadi S¹, Razi Jalali MH¹

1. Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3. Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding author. Tel: +986133738636 Fax: +98613336080 E-mail: s.bahrami@scu.ac.ir

Received: Nov 11, 2015

Accepted: Sep 26, 2016

ABSTRACT

Background & objectives: Polyamines such as putrescine, spermidine, and spermine are ubiquitous in all eukaryotic cells and play an essential role in cell division and differentiation. One way of polyamine biosynthesis is done by ornithine decarboxylase (ODC) which catalyzes the transformation of ornithine to putrescine. The aim of the present study was to evaluate the level of putrescine, spermidine and spermine in protoscolices, hydatid fluid and germinal layer and also to evaluate ODC activity.

Methods: In the present study putrescine, spermidine and spermine levels were investigated in germinal layers, hydatid fluids and protoscolices. To evaluate the activity of ODC, protoscolices were incubated with ornithine and changes in polyamines level were assayed. The samples were homogenized and liquid chromatography (HPLC) was used for polyamines measurement.

Results: Based on the results, putrescine was the lowest polyamine and since its level was not increased in protoscolices incubated with ornithine, ODC activity was not detected. Spermidine was the highest polyamine and the results showed that germinal layer contained the highest level of polyamines.

Conclusion: Overall, the results showed that ODC activity was not detected in hydatid cyst and level of polyamines in germinal layers which contained rapidly proliferating cells was higher than other parts.

Keywords: Hydatid cyst; Polyamines; Ornithine Decarboxylase.

بررسی فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز و مقادیر پوترسین، اسپرمدین و اسپرمین در کیست هیداتیک

سمیه بهرامی^{۱*}، حسین نجف‌زاده وزیری^۲، علی شهریاری^۳، سارا احمدی^۱، محمد حسین راضی جلالی^۱

۱. بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران ۲. بخش فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران ۳. بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۶۱۳۳۷۲۸۶۳۶ فاکس: ۰۶۱۳۳۳۶۰۸۰ پست الکترونیک: s.bahrami@scu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: پلی‌آمین‌هایی نظیر پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در تمامی سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند و نقش مهمی را در تقسیم سلولی و تمایز ایفا می‌کنند. یکی از راه‌های بیوسنتز پلی‌آمین‌ها از طریق آنزیم کلیدی اورنیتین دکربوکسیلاز که تبدیل اورنیتین به پوترسین را کاتالیز می‌کند تنظیم می‌شود. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی سطح پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در پروتواسکولکس‌ها، مایع کیست هیداتیک و لایه ژرمینال و همچنین ارزیابی فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز بوده است.

روش کار: در مطالعه حاضر سطح پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در لایه ژرمینال، مایع کیست هیداتیک و پروتواسکولکس‌ها اندازه‌گیری گردید. همچنین برای ارزیابی فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز، پروتواسکولکس‌ها با اورنیتین مجاور شدند و پس از آن مجدداً تغییرات میزان پلی‌آمین‌ها اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری پلی‌آمین‌ها نمونه‌ها هموژنایز شدند و از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج بدست آمده پوترسین کمترین پلی‌آمین موجود بوده و از آنجا که سطح آن در پروتواسکولکس‌های مجاور شده با اورنیتین افزایش نیافت، فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز تشخیص داده نشد. اسپرمیدین بیشترین پلی‌آمین موجود در کیست بدست آمد و لایه ژرمینال نیز بیشترین میزان پلی‌آمین‌ها را داشت.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز در کیست هیداتیک فعالیتی نداشته و لایه ژرمینال دلیل داشتن سلول‌های با تکثیر بالا بیشترین میزان پلی‌آمین را به خود اختصاص می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: کیست هیداتیک، پلی‌آمین‌ها، اورنیتین دکربوکسیلاز

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۵

مقدمه

اِکینوکوکوس گرانولوزوس^۱ از انگل‌های مهم روده باریک سگ بوده و مرحله‌ی نوزادی آن تحت عنوان کیست هیداتیک نام دارد. کیست هیداتیک یکی از بیماری‌های مشترک انسان و علف خوران می‌باشد و علاوه بر ایجاد بیماری شدید و مرگ احتمالی در انسان، با ایجاد هزینه‌های درمانی و همچنین کاهش

^۱ *Echinococcus granulosus*

فرآورده‌های دامی، موجب خسارات اقتصادی نیز می‌شود [۲، ۱]. امروزه این بیماری در سراسر جهان حتی کشورهای توسعه یافته دیده می‌شود. تماس مستقیم با سگ آلوده، خوردن سبزیجات یا علوفه آلوده به تخم انگل از راه‌های انتقال آلودگی می‌باشد. اشکال لاروی انگل در میزبانان واسطه به صورت کیست‌های بزرگی در اندام‌های داخلی مخصوصاً کبد و ریه ظاهر می‌شوند [۳]. تشخیص به موقع و درمان کیست هیداتیک در کشورهای در حال توسعه به

بررسی فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز در کیست هیداتیک طراحی گردید.

روش کار

جمع آوری کیست‌های هیداتیک

تعدادی کبد گوسفندی دارای کیست هیداتیک از کشتارگاه اهواز جمع آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید. با تکان دادن لایه زیای کیست هیداتیک پروتواسکولکس‌های چسبیده به آن جدا می‌گردید. از هر کبد آلوده یک میلی‌لیتر پروتواسکولکس (حدود یک میلیون پروتواسکولکس)، یک میلی‌لیتر مایع و یک گرم لایه ژرمینال جمع‌آوری گردید و برای هر مورد حداقل ۱۰ نمونه‌ی مجزا در نظر گرفته شد. برای انجام این مطالعه زنده‌مانی پروتواسکولکس‌ها با استفاده از رنگ ائوزین ۱/۰ درصد بررسی می‌گردید. همچنین جهت بررسی زنده‌مانی پروتواسکولکس‌ها حرکت آن‌ها و زنش سلول شعله آن‌ها در نظر گرفته می‌شد. پس از آن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه هموژنایزر، هموژنایز گردیدند. محصول ناشی از هموژنایز تا زمان اندازه‌گیری آمین‌های مورد نظر در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز پروتواسکولکس‌ها با میزان مشخصی از اورنیتین مجاور گردیدند. با توجه به نقش آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز در تبدیل اورنیتین به پوترسین، با اندازه‌گیری پوترسین به‌طور غیر مستقیم تا حدودی می‌توان به فعالیت و یا عدم فعالیت آنزیم مذکور پی‌برد [۱۰]. برای این منظور یک میلیون پروتواسکولکس در یک میلی‌لیتر PBS استریل با pH حدود ۷/۴ در پلیت ریخته شد و پس از آن اورنیتین با غلظت ۵ میکرومولار در اختیار پروتواسکولکس‌ها قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت

عنوان یک معضل مطرح است. درمان کیست هیداتیک شامل درمان داروئی، جراحی و یا ترکیبی از هر دو است. درمان داروئی مستلزم استفاده درازمدت از داروهای ضد انگل است. جراحی درمان اصلی و تنها راه از بین بردن کامل کیست‌ها است، اما ممکن است عوارض جانبی و خطراتی مثل مرگ یا عود کیست پس از عمل را در پی داشته باشد [۴]. به دلیل خطرات استفاده از داروهای شیمیایی و بروز مقاومت نسبت به این داروها در بسیاری از انگل‌ها از جمله کیست هیداتیک گرایش به مطالعه درمورد درمان‌های جدید رو به افزایش است. اخیراً برای درمان و کنترل برخی از بیماری‌های انگلی، پلی‌آمین‌ها و مسیرهای سنتزشان مورد توجه قرار گرفته‌است. پلی‌آمین‌ها ترکیبات پلی‌کاتیونی کوچک با وزن مولکولی کم هستند که در تمام موجودات زنده وجود دارند. آن‌ها در رشد، بقا و تمایز سلول نقش اساسی دارند. بنابراین شناسایی آن‌ها و مسیرهای سنتزشان می‌تواند در شناخت بیولوژی سلول مهم بوده و نهایتاً بعنوان هدف مناسبی برای کنترل رشد سلول مطرح باشند. اصلی‌ترین پلی‌آمین‌ها در سلول شامل پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین می‌باشند و آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) به‌عنوان آنزیم اولیه از طریق تبدیل اورنیتین به پوترسین در سنتز پلی‌آمین‌ها نقش دارد [۵]. مطالعات مختلفی نشان داده است که آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز می‌تواند بعنوان یک هدف مناسب برای شیمی درمانی قرار گیرد [۶]. با علم به مطالب گفته شده مطالعات مختلفی در خصوص شناسایی پلی‌آمین‌ها و مسیرهای سنتزشان در تک‌پاخته‌هایی نظیر *تریپانوزوما*، *لشمانیا*، پلاسمودیوم و برخی نماتودها صورت گرفته‌است [۹-۷]، اما در جستجوهای بعمل آمده مطالعه‌ای در خصوص شناسایی پلی‌آمین‌ها در کیست هیداتیک تک‌حفره‌ای انجام نگرفته است. در نتیجه این مطالعه با هدف بررسی برخی از پلی‌آمین‌ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) و همچنین

کالیبراسیون دستگاه HPLC و رسم منحنی‌های کالیبراسیون

بر اساس پروتوکل‌های موجود، دمای مختلف برای گرم‌خانه و همچنین درصد مختلف فاز متحرک و سرعت فاز متحرک بر روی دستگاه HPLC موجود در آزمایشگاه بررسی شد و پس از چندین روز تزریق نمونه‌های استاندارد و بررسی منحنی خروجی دستگاه، بهترین دمای گرم‌خانه دستگاه ۴۰ درجه سانتی‌گراد و بهترین جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تعیین گردید. همچنین طول موج مناسب آشکارساز UV برای آشکارسازی آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین ۲۵۴ نانومتر در نظر گرفته شد. با استفاده از فاز معکوس با سیستم ایزوکراتیک، فاز متحرک شامل استونیتریل (۴۲٪) و آب خالص (۵۸٪) بوده و زمان قرائت، ۱۵ دقیقه تعیین شد. برای تعیین مقادیر پلی‌آمین‌های مورد نظر (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) رقت‌های مختلفی از استاندارد تهیه شد و از این رقت‌ها به میزان ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق گردید. این تزریق در چندین نوبت و روزهای مختلف تکرار گردید. بر اساس سطح زیر منحنی^۳ و غلظت‌های بالای هر کدام از آمین‌ها منحنی استاندارد آن‌ها و معادله خطشان تعیین شد که با استفاده از این معادله خط، مقادیر آمین‌ها در نمونه‌های مورد نظر بدست آمد. برای تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC نمونه‌ها از فریزر خارج شده و سپس محلول از میکروفیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد و بعد ۲۰ میکرولیتر از این محلول با سرنگ هامپلتون به دستگاه تزریق شد. در ضمن راندمان^۴ دستگاه برای آمین‌های بیوژنیک ۸۵-۷۵ درصد تعیین شد [۹].

یک ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از انکوباسیون پروتواسکولکس‌ها هموژنایز شده و نهایتاً در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش بعدی نگه‌داری شدند. قابل ذکر است که غلظت مناسب اورنیتین و همچنین مدت زمان انکوباسیون در چند آزمایش ابتدایی مشخص گردید. برای این مرحله نیز حداقل ۱۰ نمونه در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری آمین‌ها

برای اندازه‌گیری آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در پروتواسکولکس‌ها، مایع کیست هیداتیک، لایه ژرمنال و پروتواسکولکس‌های مجاور شده با اورنیتین از روش^۱ HPLC بر اساس منبع داوود^۲ و همکاران استفاده گردید [۱۱]. برای این منظور استخراج و مشتق‌سازی از نمونه‌ها صورت گرفت. بدین ترتیب که یک میلی‌لیتر از محلول هموژنیزه شده از هر کدام از قسمت‌های ذکر شده کیست با ۸۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۶ درصد مخلوط گردید. پس از گذشت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها سانتریفوژ شدند و مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری گردید. حجم مایع جمع‌آوری شده با تری‌کلرواستیک اسید ۶ درصد به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از آن یک میلی‌لیتر سود ۲ نرمال و ۱۰ میکرولیتر بنزیل کلراید به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از انکوباسیون دو میلی‌لیتر نمک اشباع به محلول‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد سه میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر به نمونه‌ها اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها با دور ۳۰۰۰ بر دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت لایه ی آلی بالایی به لوله آزمایش دیگری منتقل شد و در آن با دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تا خشک شدن نمونه‌ها قرار داده شد و در نهایت نمونه‌ها تا زمان تزریق به دستگاه HPLC در فریزر قرار داده شدند.

^۳ Area

^۴ Recovery

^۱ High- Performance Liquid Chromatography

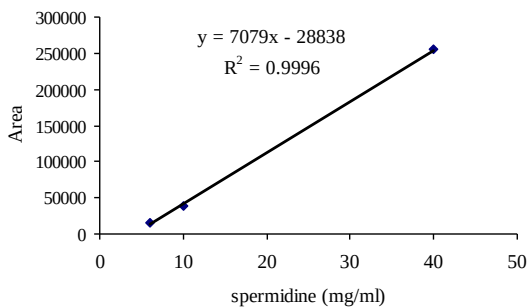
^۲ Dawood

مطالعه آماری

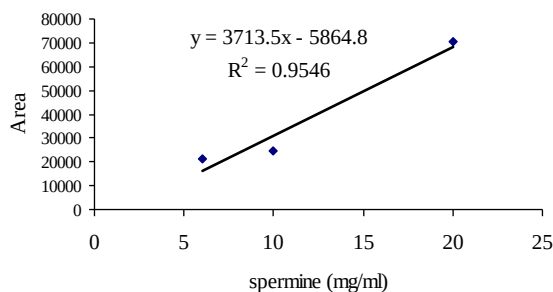
نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد. داده‌ها با استفاده از SPSS-16 و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از $p < 0.05$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر، سه آمین بیوژنیک پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در پروتواسکولکس‌ها، مایع کیست هیداتیک، لایه ژرمینال و پروتواسکولکس‌های مجاور شده با اورنیتین به روش HPLC اندازه‌گیری شدند. پس از کالیبراسیون دستگاه HPLC و تزریق غلظت‌های مختلفی از مقادیر استاندارد پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین، بر اساس نرم افزار، منحنی استاندارد و معادله‌های خط به دست آمد که به ترتیب در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

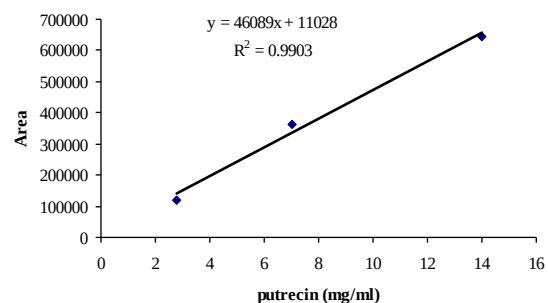


نمودار ۲. منحنی استاندارد و معادله خط مربوط به اسپرمیدین

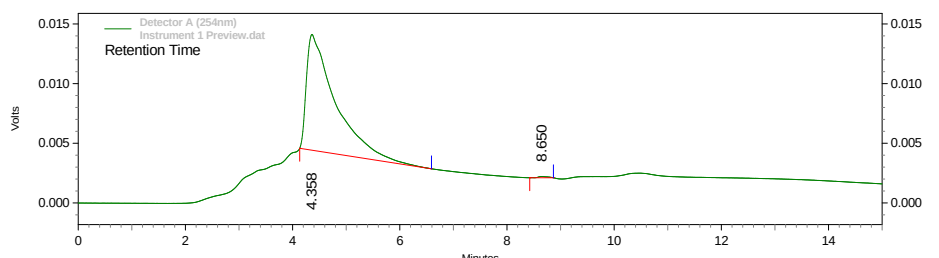


نمودار ۳. منحنی استاندارد و معادله خط مربوط به اسپرمین

همچنین تصویرهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب کروماتوگراف‌های مربوط به پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین را نشان می‌دهند. همچنین برای مثال کروماتوگراف مربوط به یک نمونه مایع کیست هیداتیک در تصویر ۴ نشان داده شده است.



نمودار ۱. منحنی استاندارد و معادله خط مربوط به پوترسین



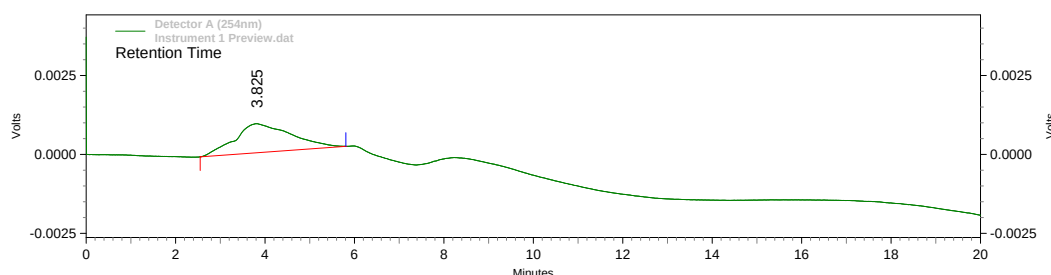
تصویر ۱. کروماتوگراف مربوط به پوترسین

منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی از پوترسین به دستگاه تزریق شد تا بر اساس سطح زیر منحنی و

تصویر ۱ کروماتوگراف مربوط به پوترسین را نشان می‌دهد. برای کالیبراسیون دستگاه HPLC و رسم

غلظت‌های تزریق شده معادله منحنی استاندارد تعیین شود. کروماتوگراف فوق یکی از منحنی‌های

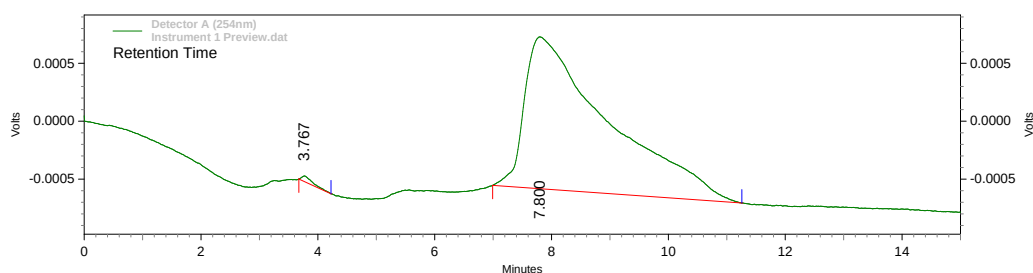
غلظت‌های تزریق شده می‌باشد که زمان احتباس برای پوترسین حدود ۴/۴ دقیقه تعیین شد.



تصویر ۲. کروماتوگراف مربوط به اسپرمیدین

تصویر ۲ کروماتوگراف مربوط به اسپرمیدین را نشان می‌دهد. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی از اسپرمیدین به دستگاه تزریق شد تا بر اساس سطح زیر منحنی و غلظت‌های تزریق شده

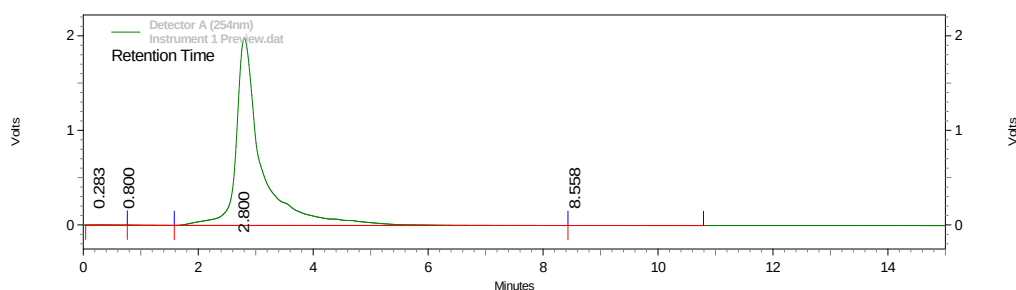
معادله منحنی استاندارد تعیین شود. کروماتوگراف فوق یکی از منحنی‌های غلظت‌های تزریق شده می‌باشد که زمان احتباس برای اسپرمیدین حدود ۳/۸ دقیقه تعیین شد.



تصویر ۳. کروماتوگراف مربوط به اسپرمین

تصویر ۳ کروماتوگراف مربوط به اسپرمین را نشان می‌دهد. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی از اسپرمین به دستگاه تزریق شد تا بر اساس سطح زیر منحنی و غلظت‌های تزریق شده معادله

منحنی استاندارد تعیین شود. کروماتوگراف فوق یکی از منحنی‌های غلظت‌های تزریق شده می‌باشد که زمان احتباس برای اسپرمین حدود ۷/۸ دقیقه تعیین شد.



تصویر ۴. کروماتوگراف مربوط به یک نمونه مایع کیست هیداتیک

تصویر ۴ کروماتوگراف مربوط به یک نمونه مایع کیست هیداتیک را نشان می‌دهد. بعد از کالبراسیون

دستگاه HPLC نمونه‌های استخراج و مشتق‌سازی شده از فیلتر سرنگی عبور داده شدند و به دستگاه

تزریق شدند تا منحنی مربوط به هریک از آمین های کالایبره شده مشخص شود و در صورت شناسایی شدن، مقدار آنها بر اساس سطح زیر منحنی و معادله منحنی استاندارد محاسبه شوند. کروماتوگراف فوق یکی از منحنی های نمونه مایع کیست هیداتیک تزریق شده می باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه میزان پوترسین در نمونه های مختلف کم تر از سایر آمین های بیوژنیک بود. در مورد میزان پوترسین در پروتواسکولکس های تیمار شده با اورنیتین میزان پوترسین غیر قابل تشخیص بود. با توجه به آن که میزان پوترسین در پروتواسکولکس های مواجه شده با اورنیتین افزایش معنی داری نداشته است میزان فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز نیز قابل

اندازه گیری نبود. اما مقادیر اسپرمیدین و اسپرمین در نمونه های مختلف قابل بررسی بود. جدول ۱ میزان آمین های بیوژن اسپرمیدین و اسپرمین را در گروه های مختلف نشان می دهد. میانگین میزان اسپرمیدین در لایه ژرمینال به شکل معنی داری بیش از میزان اسپرمیدین در پروتواسکولکس ها بود ($p=0/01$), در حالی که در سایر گروه ها اختلاف میزان اسپرمیدین معنی دار نبود.

کمترین میزان اسپرمین، در مایع کیست هیداتیک وجود داشت و این میزان به لحاظ آماری به شکل معنی داری کمتر از اسپرمین موجود در لایه ی ژرمینال بود ($p=0/012$). در لایه ی ژرمینال بیشترین میزان اسپرمیدین و اسپرمین وجود داشت.

جدول ۱. میزان آمین های بیوژنیک پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار در هر میلی لیتر نمونه هموژنایز شده

آمین بیوژنیک	پروتواسکولکس	پروتواسکولکس تیمار شده	مایع کیست هیداتیک	لایه ی ژرمینال
پوترسین (mg/ml)	$5/12 \pm 1/56^a$	ND	ND	$13/12 \pm 4/62^a$
اسپرمیدین (mg/ml)	$23/12 \pm 6/82^a$	$22/3 \pm 18/72^{a,b}$	$73/49 \pm 24/7^{a,b}$	$156/78 \pm 36/56^b$
اسپرمین (mg/ml)	$40/21 \pm 19/4^{a,b}$	$44/47 \pm 21/10^{a,b}$	$9/0.2 \pm 2^b$	$69/37 \pm 20/9^a$

حروف غیر متشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار آن است. (ND) Not detectable: غیر قابل تشخیص

بحث

اخیراً برای درمان و کنترل برخی از بیماری های انگلی پلی آمین ها و مسیرهای سنتزشان مورد توجه قرار گرفته است. مشخص شده است که پلی آمین ها در غلظت های پایین برای قابلیت زنده مانی سلول لازم هستند و اینکه سطوح آنها در طی رشد، تمایز و تکثیر سلولی افزایش می یابد. پلی آمین های رایج شامل پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین هستند که در همه سلول ها تقریباً یافت می شوند [۱۲]. مطالعات نشان داده است که در آلودگی با *تریپانوزوما بروسه ای* بروسه ای بروسه ای و *یاتریپانوزوما بروسه ای* کامینیس استفاده از دی فلورو متیل اورنیتین با جلوگیری از فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز و ممانعت از تولید آمین های بیوژنیک باعث از بین

رفتن انگل و آلودگی می گردد [۱۳]. بنابراین توجه به مسیرهای سنتز آمین های بیوژنیک می تواند از نگاه درمان حائز اهمیت باشد. از طرف دیگر به طور کلی با توجه به نتایج مطالعات مختلف به نظر می رسد که میزان و نوع آمین های بیوژنیک در کرم ها متغیر است. برای مثال گوردون^۱ و همکاران با توجه به نتایج مطالعه شان به این نتیجه رسیدند که در کرم ها بر خلاف پستانداران میزان پوترسین اندک بوده و در عوض از میزان اسپرمیدین و اسپرمین قابل توجهی برخوردار می باشند [۱۴].

¹ Gordon

هامانا^۱ و همکاران نیز نشان دادند که اسپرمیدین و اسپرمین بیشترین پلی آمین در هیمنولپیس *نانا* و هیمنولپیس *دیمینوتا* می باشند [۱۵] درحالی که میاجی^۲ و همکاران گزارش کرده اند که در لاروهای *تنیا هید/تیژنا*، *تنیا تنی فورمیس*، *تنیا کراسیسیپس* و *کینوکوکوس مولتی/لوکولاریس* مقدار قابل توجهی از پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین وجود دارد [۱۶]. بنابراین شناسایی آمین های بیوژنیک و مسیرهای سنتز آن ها در انگل ها می تواند در خور توجه باشد. در جستجوهای به عمل آمده مشخص گردید که تاکنون میزان و نوع آمین های بیوژنیک در کیست هیداتیک تک حفره ای بررسی نشده است. در نتیجه این مطالعه با هدف بررسی آمین های بیوژنیک که مهمترین آن ها پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین می باشد و همچنین ارزیابی فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز در کیست هیداتیک طراحی گردید.

در مطالعه حاضر میزان پوترسین در پروتواسکولکس های تیمار شده و تیمار نشده به ترتیب اندک و غیر قابل تشخیص بوده است. نقش آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز تبدیل اورنیتین به پوترسین می باشد [۱۰]. با توجه به عدم تغییر میزان پوترسین در پروتواسکولکس های مواجه شده با اورنیتین، بنابراین به نظر نمی رسد که آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز در تولید پوترسین در کیست هیداتیک نقشی داشته باشد. با توجه به اندک بودن میزان پوترسین در پروتواسکولکس های تیمار نشده و عدم افزایش آن در پروتواسکولکس های تیمار شده در این ارتباط سه احتمال در نظر گرفته می شود.

احتمال اول آن است که مسیر سنتز پوترسین از طریق آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز نبوده و درواقع مسیر آگماتین در تولید آن نقش داشته است. پوترسین که نام دیگر آن تترا متیلن دیامین^۳ است به

صورت بیولوژیک از دو مسیر متفاوت که البته هر دو با آرژنین آغاز می گردند تولید می شود. در یک مسیر آرژنین توسط آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز به آگماتین تبدیل شده و پس از آن آگماتین توسط آگماتین ایمینوهیدروکسیلاز به N- کرباموئیل پوترسین تبدیل می شود و نهایتاً آن- کرباموئیل پوترسین به پوترسین تغییر می یابد. در مسیر دیگر آرژنین به اورنیتین تبدیل شده و بعد اورنیتین توسط آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز به پوترسین تبدیل می شود [۱۷].

احتمال دیگر آن است که در تبدیل اورنیتین به پوترسین از آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز میزبان استفاده می شود و یا این که انگل پوترسین مورد نیازش را از میزبان اخذ می کند. چرا که اخذ پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین از محیط کشت در برخی فیلرهای نماتودها اثبات شده است [۱۸]. احتمال سوم نیز آن است که پوترسین در کیست هیداتیک فاقد اهمیت می باشد. در این صورت مسیر تولید اسپرمیدین و اسپرمین از طریق متیونین می باشد. متیونین پس از فسفریله شدن با آدنوزین ترکیب شده و اس آدنوزیل متیونین ایجاد می گردد. S- آدنوزیل متیونین توسط S- آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز، دکربوکسیله شده و در نهایت اسپرمیدین و اسپرمین تولید می گردد [۱۹]. بنابراین ممکن است با توجه به کم بودن میزان پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین از طریق مسیرهای یاد شده تولید گردد.

در ارتباط با مشخص نمودن آمین های بیوژنیک در کیست هیداتیک و یا گونه های انگل/کینوکوکوس تنها یک مطالعه در دسترس بود. در مطالعه میاجی و همکاران پس از آلوده نمودن موش ها به کیست هیداتیک آلوتولار ناشی از انگل/کینوکوکوس مولتی/لوکولاریس، موش ها تحت درمان با آلفا دی فلورومتیل اورنیتین قرار گرفتند. آلفا دی فلورومتیل اورنیتین به صورت برگشت ناپذیری در سلول های

¹ Hamana² Miyaji³ Tetramethylenediamine

در سلول‌ها و بافت‌های در حال تکثیر و تمایز میزان آمین‌های بیوژنیک افزایش می‌یابد [۲۱]. این مساله با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد چرا که لایه ژرمینال یک لایه زایا است که سلول‌های آن در حال تکثیر و تمایز می‌باشند. به‌همین دلیل میزان آمین‌های بیوژن در این لایه بالاتر بوده‌است.

نتیجه‌گیری

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین آمین بیوژن در قسمت‌های مختلف کیست هیداتیک اسپرمیدین بوده و لایه ژرمینال بیشترین میزان آمین‌های بیوژنیک را داشته‌است. همچنین به نظر نمی‌رسد که در کیست هیداتیک تک حفره‌ای آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز نقش مهمی را در تولید آمین‌های بیوژنیک داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان نامه دکتری عمومی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

یوکاریوتی آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز را مهار می‌کند. به موجب این ماده میزان پلی‌آمین‌ها کم شده و بدلیل نقش پلی‌آمین‌ها در تکثیر و تمایز سلولی، از رشد و گسترش سلول جلوگیری می‌شود. پس از درمان موش‌ها، تعداد کیست‌های آلوئولار، وزن و اندازه آن‌ها و همچنین میزان سه پلی‌آمین پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین اندازه‌گیری شد. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که اندازه، تعداد و میزان پلی‌آمین‌ها در گروه درمان شده با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. در این مطالعه تنها میزان پوترسین به میزان کمی در گروه تحت درمان کاهش یافته بود که این میزان تغییر نیز معنی‌دار نبود. آن‌ها در مجموع به این نتیجه رسیدند که انگل *کینوکوکوس مولتی‌لوکولاریس* فاقد آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز می‌باشد [۲۰]. مطالعه ذکر شده از این نظر با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشته است. در مطالعه حاضر میزان پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در لایه ژرمینال بیش از سایر قسمت‌ها بود و همچنین فراوان‌ترین آمین بیوژن در پروتواسکولکس‌ها، مایع کیست هیداتیک و لایه ژرمینال اسپرمیدین تشخیص داده شد. محتوای آمین‌های بیوژنیک در بافت‌های مختلف کاملاً با یکدیگر متفاوت می‌باشند. مطالعات نشان داده‌اند که

References

- 1- Altintas N. Past to Present: echinococcosis in turkey. Acta Trop. 2003 Feb; 85(2): 105-112.
- 2- Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. Emerg Infect Dis. 2006 Feb; 12(2): 296-303.
- 3- Wen H, New RRC, Craig PS. Diagnosis and treatment of human hydatidosis. Br J Clin Pharmacol. 1993 Jun; 35: 565-574.
- 4- Adas G, Arikan S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicidal agents on hydatid cysts (in vitro study). World J Gastroenterol. 2009 Jan; 15(1): 112-116.
- 5- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. Biochem J. 2003 Nov; 376: 1-14.
- 6- Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. Cancer Res. 1988 Feb; 48(4): 759-774.

- 7- Reigada C, Sayé M, Valera Vera E, Balcazar D, Fraccaroli L, Carrillo C, et al. Trypanosoma cruzi polyamine transporter: its role on parasite growth and survival under stress conditions. *J Membrane Biol.* 2016 Aug; 249(4): 475-481.
- 8- Roberts SC, Jiang Y, Gasteier J, Frydman B, Marton LJ, Heby O, et al. Leishmania donovani polyamine biosynthetic enzyme overproducers as tools to investigate the mode of action of cytotoxic polyamine analogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Feb; 51(2):438-45.
- 9- Dholakia N, Dhandhukia P, Roy N. Screening of potential targets in Plasmodium falciparum using stage-specific metabolic network analysis. *Mol Divers.* 2015 Nov; 19(4):991-1002.
- 10- Badolo L, Berlaimont V, Helson-Cambier M, Hanocq M, Dubois J. Simple and rapid enzymatic assay of ornithine decarboxylase activity. *Talanta.* 1999 Jan; 48(1): 127-134.
- 11- Dawood AA, Karkalas J, Ray RN, Williams CS. The occurrence of non-volatile amine in chilled-stored Rainbow trout (salmo irideus). *Food Chem.* 1988 Oct; 27(1): 33-45.
- 12- Pandey S, Ranande SA, Nagar PK, Kumar N. Role of polyamine and ethylene as modulators of plant senescence. *J Biosci.* 2002 Sep; 25(3): 291-299.
- 13- Heby O, Roberts SC, Ullman B. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochem Soc Trans.* 2003 Apr; 31(2): 415-419.
- 14- Gordon R, Cornect M, Walters BM, Hall DE, Brosnan ME. Polyamine synthesis by the mermithid nematode Romanomermis culicivorax. *J Nematol.* 1989 Jan; 21(1): 81-6.
- 15- Hamana K, Sakamoto A, Nishina M, Niitsu M. Polyamine distribution profiles within the phyla Nematoda, plathyhelminths, annelida and cnidarian. *Ann Gunma Health Sci.* 2006 Dec; 27: 17-25.
- 16- Miyaji S, Katakura K, Matsufuji S, Murakami Y, Hayashi S, Takami H, et al. Polyamine metabolism in taeniid metacestodes. *Japan J Parasitol.* 1992 Dec; 41: 327-333.
- 17- Srivinugopal KS, Adiga PR. Enzymic conversion of agmatine to putrescine in Lathyrus sativus seedlings: Purification and properties of a multifunctional enzyme (putrescine synthase). *J Biol Chem.* 1981 Sep; 256: 9532-41.
- 18- Singh RP, Saxena JK, Ghatak S, Shukla OP, Wittich RM, Walter RD. Polyamine metabolism in Setaria cervi, the bovine filarial worm. *Parasitol Res.* 1989; 75(4): 311-5.
- 19- Tabor CW, Tabor H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Annu Rev Biochem.* 1976; 45: 285-306.
- 20- Miyaji S, Katakura K, Matsufuji S, Murakami Y, Hayashi S, Oku Y, et al. Failure of treatment with alpha-difluoromethylornithine against secondary multilocular echinococcosis in mice. *Parasitol Res.* 1993; 79(1): 75-76.
- 21- Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. *Aging.* 2011 Aug; 3(8): 716-732.