التأثيرات المناعية لأنزيم بولي أمين اوكسيديز المنقى جزئياً من السائل المخي الشوكي ضد الخمج بداء الاكياس العدرية الثانوي في الفئران البيض I .معامل البلعمة وفرط الحساسية المتأخر♦

خولة احمـــد آل فليح — قسم الكيمياء
أسماء عبد العزيز علي — قسم علوم الحياة
وثبة إدريس علي — قسم الكيمياء
كلية التربية / جامعة الموصل

ABSTRACT

The study included immune response to infection with secondary hydatid disease in BALB/c mice activated by partially purified cerebrospinal fluid-polyamine oxidase (CSF-PAO) with spermine and infected with protoscoleces of *Echinococcus granulosus*. The pathological changes occurred in mice activated by different concentrations of PAO(200-1600 µg/10gm body weight) with constant concentration (200µg/10gm body weight) of substrate spermine , and by the same concentration of spermine alone, were followed in comparison with positive control group along one month, depending on certain criteria included changes in the non-specific and specific immune response represented by phagocytosis and delayed–type hypersensitivity, respectively .

The results revealed an increase in the non-specific (innate) and specific (cellular) immune response, represented by an increase in the rate of phagocytic index and foot pad thickness, respectively, in activated mice with PAO-Spm system, in comparison with +ve control group. Whereas an increase in the non-specific (innate), but no change in specific (cellular) immune responses occurred with mice activated with Spm alone.

It may , therefore, be concluded here that PAO isolated from CSF with Spm could be considered as an effective immunumodulator against infection with secondary hydatid disease.

الخلاصة

تضمنت الدراسة دراسة استجابة الجهاز المناعي للإصابة بالأكياس العدرية الثانويـــة في الفئران البيض BALB/c المفعلة بانزيم PAO المستخلص مـــن CSF مـــع الـــسبرمين (Spm) والمخمجة بالرؤيـــسات الاوليـــة لـــدودة المـــشوكات الحبيبيـــة *Echinococcus*

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

granulosus .تمت متابعة التغيرات المرضية الحاصلة في الفئران البيض المفعلة باستخدام تراكيز مختلفة (200-1600 مكغم/10 غم وزن الجسم) من انزيم PAO مع تركيز ثابت(200مكغم/10 غم وزن الجسم) من مادة الاساس السبرمين، وكذلك باستخدام التركيز نفسه من مادة الاساس السبرمين لوحده، بالمقارنة مع مجاميع السيطرة الموجبة طوال فترة شهر واحد، بالاعتماد على معايير معينة تضمنت التغيرات الحاصلة في الاستجابة المناعية غير النوعية والنوعية المتمثلة بالتغيرات الحاصلة في معدل معامل البلعمة وفرط الحساسية المتأخر، على التوالي.

أظهرت النتائج حدوث زيادة في الاستجابة المناعية غير النوعية (الطبيعية) والنوعية (الخلوية) متمثلة بالزيادة في معدلات معامل البلعمة وسمك وسادة القدم، على التوالي، في الفئران المفعلة بنظام Spm-PAO بالمقارنة مع فئران السيطرة الموجبة. اما الفئران المفعلة بـSpm لوحده ،فقد حدثت زيادة في الاستجابة المناعية غير النوعية ولم تحدث زيادة في الاستجابة المناعية النوعية. اتضح من هذه الدراسة ان انزيم PAO المستخلص من CSF الاطفال مع السبرمين يعمل معدلا مناعيا مؤثرا ضد الاصابة بداء الاكياس العدرية الثانوية.

المقدمة

إن أنزيمات بولي أمين اوكسيديز Polyamine Oxidases (PAO) تحفز أكسدة وحذف مجاميع الأمين من مركبات متعددة الأمين Polyamine (PA) مثل سبرمين Spermine(Spm) وسبرمدين Spermidine(Spd) ومشتقاتهما بألفة عالية، ولها دور هام في تنظيم مستويات مركبات PA داخل وخارج الخلايا [2,1]. وجدت إنزيمات PAO في معظم الأنسجة وسجلت أعلى فعالية له في عضيات المايتوكوندريا، السايتوبلازم البيروكسي سومات[3]. تمتلك البلاعم الكبيرة macrophages المنشطة فعالية متزايدة لهذا الأنزيم ، وهو مسؤول عن الاحداث التي تؤدي إلى قتل الطفيليات[4]، اذ وجد أن المنشقة المانسينية *Schistosoma mansoni*والدودة الخيطية *Dirofilaria immitis* كانت عالية الحساسية لنظام PA-PA0 خارج الجسم في الزجاج إذ حصل تحطيم ليرقات الديدان الخيطية بعد حضنها مع Spm او Spd بوجود المصل الحاوي على PAO او PAO المنقى جزئيا [5].

يعد داء المشوكات Echinococcosis أو داء الأكياس العدرية hydatid disease من الامراض الطفيلية القديمة والشائعة في جميع أنحاء العالم ،وهو من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان [7,6].يتسبب هذا الداء بوساطة الطور اليرقي Larval stage (الشريطة البعدية Metacestode) لأنواع شريطيات مختلفة تابعة لجنس *Echinococcus*، اثنان من أنواع هذه الطفيليات لها أهمية طبية و صحية عامة، وهي المشوكة الحبيبية

Echinococcus granulosus ، العامـل المـسبب لـداء المـشوكات الكيـسي Cystic Echinococcosis ،والمشوكة متعـددة الحجـرات *Echinococcus multilocularis* ، العامل المسبب لداء المشوكات السنخي Alveolar Echinococcosis [8].نظـرا للأهميـة الطبية والاقتصادية لداء الأكياس العدرية وانتشاره في كثير من دول العالم فقد أولى الباحثون والمختصون اهتماما كبيرا لموضوع معالجة هذا الداء الذي مازال واحدا من اخطر الأمراض الطفيلية القاتلة والصعبة العلاج[9].هنالك محاولات علاجية كثيرة ومتنوعة، منها الجراحيـة Surgical ، الكيميائية Chemical، الإشعاعية Radiological، اسـتخدام المستخلـصات النباتية Plant extracts، التعديل المناعي Immunological modulation وغيرها .وقـد اتجهت البحوث في العقود الأخيرة إلـى البحـث عـن مـواد تعمـل محفـزات مناعيـة Immunostimulatorsأو معدلات مناعية Immunomodulators سواء كانت تلك التـي تعمل بشكل نوعي Specific أو غير نوعي non-specific في تحسين الاستجابة المناعيـة للمضيف وتطويرها، للوقاية من الأمراض الطفيلية أو المساعدة في معالجتها.

اشارت الدراسات السابقة التي اجريت في مختبراتنا بان فعاليـة انـزيم PAO فـي الخلايا البيض لسائل الـ CSF اعلى، وبفرق معنوي كبير، عن نظيراتها لرائق الـ CSF ، وللحليب والمصل. ومن خلال البحوث التي حصلنا عليها من مصادر مختلفة، والاطلاع على ما نشر عن انزيم PAO ، تبين انه لم يسبق وان استخدم هذا البروتين بوصفه معدلا مناعيـا ضد الخمج بالاكياس العدرية، لذا فقد اختير في الدراسة الحالية لهذا الغرض كمحاولة اولـى للتعرف على تاثيره ضد الخمج بالاكياس العدرية.

المواد وطرائق العمل

عينات السائل المخي الشوكي

تم الحصول على15 عينة CSF وبواقع 0.5-1ملي لتر للعينة الواحـدة، مـن أطفـال أصحاء تراوحت أعمارهم بين سنة – خمس سنوات (5 ذكور و10 اناث). جمعت العينات من المختبرات العائدة لمستشفى ابن سينا التعليمي في الموصل، ونقلت النماذج في حاويات مبـردة إلى المختبر مباشرة لغرض أجراء الدراسات اللاحقة.

تقدير كمية البروتين في الـ CSF

استخدمت طريقة لاوري المعدلة [11,10] في تقدير كميةالبروتين.

قياس فعالية أنزيم PAO في الـ CSF

قيست فعالية أنزيم PAO باستخدام طريقة فليح المحورة [12] و Dahel [13] . استخدمت الظروف المثالية التي يعمل عليها أنزيم PAO للـ CSF [14].تمت التنقية الجزئية للأنزيم [15]، كما أجريت طريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني [16] .

الحيوانات المختبرية

استخدمت الفئران البيض سلالة BALB/c في الدراسة الحالية.عزلت الذكور في أقفاص وبواقع 5-6 / قفص إذ استخدمت في التجارب المختلفة بعمر 3-4 أسابيع مع مراعاة الحفاظ عليها في الظروف الملائمة لنموها.

الأكياس العدرية

استخدمت طريقة Smyth [17] للحصول على الرؤيسات الأولية،وقدرت حيوية الرؤيسات الأولية [18].حقنت الفئران عبر التجويف ألخلبي بمايقارب 2000 رؤيس أولي حي[19].

تصميم التجربة

حقن 25 فارا عبر الخلب بتركيز 200 مايكروغرام /10 غرام من وزن الجسم بمادة الأساس سبرمين مضافا اليها تراكيز مختلفة (1600,1200,800,400,200 مايكروغرام /10 غرام من وزن الجسم) من أنزيم PAO المستحصل من القمة الأولى من عملية التنقية باستخدام التبادل ألايوني، ثم خمجت الفئران بما يقرب من 2000 رؤيس اولي حي /فار بعد 24 ساعة من التفعيل . حقنت 5 فئران عبر الخلب بتركيز 200 مايكروغرام /10 غرام من وزن الجسم بمادة الأساس سبرمين)،ثم خمجت الفئران بما يقرب من 2000 رؤيس اولي حي /فار بعد 24 ساعة من التفعيل .خمجت 5 فئران بالعدد نفسه من الرؤيسات الأولية الحية فقط كمجموعة سيطرة موجبة (+ ve Control).شرحت الفئران جميعها بعد شهر من إحداث الخمج .تم تحديد التركيز الأمثل للأنزيم من هذه التجربة .

المعايير المختارة للدراسة

الاستجابة المناعية الطبيعية (معامل البلعمة)

درس معامل البلعمة باستخدام صبغة (NBT) Nitro Blue Tetrazolium وفق المعادلة التالية[20] :

$$\text{معامل البلعمة} = \left(\frac{\text{عدد البلاعم المختزلة}}{\text{عدد البلاعم الكلي}}\right) \times 100$$

الاستجابة المناعية الخلوية (اختبار فرط الحساسية المتأخر)

تحضير المستضد

اتبعت طريقة Dottorini *et al* . [21] في تحضير مستـضد الرؤيـسات الأوليـة. وطريقة Ali-Khan [22] لقياس فرط الحساسية المتأخر.

التحليل الاحصائي

تم تحليل نتائج معامل البلعمة باستخدام اختبار t.كما تم استخدام تحليل التباين واختبار F في تحليل نتائج اختبار فرط الحساسية المتاخر،واختبرت احـصائيا باسـتخدام اختبـار دنـت Dunnett [23].

النتائج والمناقشة

تأثير نظام Spm-PAO في الخمج التجريبي بالرؤيسات الأولية في الفئران البيض

معدلات معامل البلعمة باستخدام جرعات PAO مختلفة التركيز

يتبين من الجدول (1) التغيرات الحاصلة في معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة بجرعة واحدة من إنزيم PAO وبتراكيز تتراوح من (200-1600 مكغم/10 غم وزن الجسم) مع تركيز ثابت من Spm (200 مكغم/10 غم وزن الجسم)، وباستخدام التركيز نفسه من الـ Spm لوحده، قبل 24 ساعة من الخمج لمدة شهر واحد مقارنة بفئران الـسيطرة المؤجبـة. أظهرت معدلات معامل البلعمة ارتفاعا في الفئران المفعلة بنظام Spm-PAO بلغ أقـصاه 66.34% عند التركيز 1200مكغم/10غم وزن الجسم، وبفرق معنوي عال ($P < 0.001$) في حين أظهرت مجموعة الفئران المفعلة بالـ Spm لوحده ارتفاعا معنويا في معـدل معامـل البلعمة ($P< 0.05$) بلغ 35% ، مقارنة بمعدل مجموعةالـسيطرة الموجبـة البـالغ 27.72 %.وقد يعزى السبب في ذلك إلى ان النواتج السامة (اكرولين، امونيا، بيروكسيد الهيدروجين وغيرها) المتكونة بفعل آلية معينة لأنزيم PAO، تعمل جزءا تكميليا للفعل التنظيمي للخلايـا البلعمية[24]. في الوقت نفسه، اشار الباحثون بانه يمكن ان تلعب هذه النواتج الـسامة دورا مهما كمنظم مناعي في بعض أمراض المناعة الذاتية Autoimmune diseases [25] كمـا تمتلك خواص مميزة تعمل ضد كائنات دقيقة Antimicrobial ، ضد فيروسات Antiviral [26]، قاتلة لفطريات [27]، ضد طفيليات Antiparasitic [29,28] . كما يمكن ان تـنظم تضاعف replication خلايا أنواع مختلفة من الاورام [30-33] .جاءت هذه النتائج موافقة لما توصل إليه الباحثون[34-36] باستخدام معدلات مناعية مختلفة ضد داء الأكياس العدريـة الثانوي في الفئران البيض.

ان الارتفاع في معامل البلعمة في الفئران المفعلة بالـ Spm لوحده ، قد يعزى الى ان

الـ Spm يمكن ان يعمل مادة محفزة للمناعة الطبيعية Innate immunity، حيث اشارت الدراسات الى ان الـ Spm يستخدم في بعض انواع الثدييات كمادة محفزة وذلك من خلال ارتباطه بانزيم اللايسوزايم Lysozyme اذ يؤدي الى تكوين شكل اكثر استقرارية واكثر فعالية للانزيم مما يؤدي الى تحلل الجدران الخلوية[37]. كما يمكن ان يتاكسد الـ Spm المضاف داخل المضيف لينتج بيروكسيد الهيدروجين الذي يعمل على قتل الطفيلي. واشارت الدراسات الى ان احد وظائف كريات الدم البيض العامة امتلاكها تفاعلات خاصة تحرر فيها بيروكسيد الهيدروجين، علما بانه قد اكتشف حديثا بان جميع الاجسام المضادة تمتلك ضمنيا فعالية انزيمية لتوليد بيروكسيد الهيدروجين (وتوليد الاوزون تحت ظروف ملائمة) وذلك للتمكن من القضاء على البكتيريا، وبفعل مستقل عن الية تخصصية الجسم المضاد للمستضد[38]. وقد تكون قابلية الـ Spm على التاصر الايوني مع مركبات سالبة الشحنة مثل الفسفوليبيدات في الاغشية الخلوية، او ارتباطه مع الاحماض النووية، هي السبب في القضاء على الطفيلي .

أظهرت مجموعة السيطرة الموجبة في الدراسة الحالية انخفاضا في معامل البلعمة، ويعزى ذلك الى دور الطفيل في تحفيز إنتاج اللمفوكينات التي تثبط عملية قتل الرؤيسات الأولية [39]. اكدت هذه النتائج ما جاء في دراسات اخرى سابقة حول العوامل المشتقة من *Taenia multiceps* [41,40] او المشتقة من المشوكات متعددة الحجرات [42] المعدلة للفعالية المناعية للخلايا البلعمية الكبيرة المساعدة.

الجدول(1): التغيرات الحاصلة في معدلات معامل البلعمة (%)في الفئران المفعلـــة باســـتخدام تراكيز مختلفة من انزيم PAO مع تركيز ثابت من مادة الاساس Spm ، وباستخدام التركيز نفسه من Spm لوحده، وبجرعة واحدة قبل 24 ساعة من الخمج مقارنة بفئـــران الـــسيطرة المخمجة لمدة شهر واحد .

معامل البلعمة%	التراكيز (مكغم)	
	Spm	PAO
5.41±37.61*	200	200
4.18± 32.0	200	400
7.97±61.92****	200	800
3.26±66.34****	200	1200
6.16±47.14***	200	1600
3.80±35.0*	200	-
0.98±27.72	C+	

C+ فئران السيطرة المخمجة غير المفعلة .

* الفروق معنوية عند ($P < 0.05$) ** الفروق معنوية عند ($P < 0.01$)

*** الفروق معنوية عند ($P < 0.005$) **** الفروق معنوية عند ($P < 0.001$)

تشير الأرقام في الجدول إلى المعدل (لخمس مكررات) ± الانحراف القياسي.

اختبار فرط الحساسية المتاخر باستخدام جرعات PAO مختلفة التركيز

يتبين من الجدول (2) التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم في الفئران المفعلـــة بجرعة واحدة من انزيم PAO وبتراكيز تتراوح من (200-1600 مكغم/10غم وزن الجـــسم) مع تركيز ثابت من Spm (200 مكغم/10غم وزن الجسم)، وباستخدام التركيز نفسه من الـــــ Spm لوحده، قبل24 ساعة من الخمج لمدة شهر واحد مقارنة بفئران السيطرة المخمجة. اذ بلغ اعلى معدل سمك 1.574 ملم بعد 3 ساعات من حقن المستضد عند التركيز 1200 مكغم/10غم وزن الجسم ، وكان الفرق معنويا عاليا($P < 0.001$).وبالنسبة للفئـــران المفعلـــة بالـــــ Spm لوحده، فقد بلغ اعلى معدل سمك 0.570 ملم بعد 3 ساعات من حقن المستضد، وكـــان الفـــرق غير معنوي، مقارنة بمعدل مجموعة السيطرة الموجبة البالغ 0.510 ملم.ربما تعزى هذه النتائج إلى قدرة نظام Spm-PAO على حث المناعة الخلوية المتمثلة بالانتفاخ في وسادة القدم، والذي استمر بعد 48 ساعة من حقن المستضد. جاءت النتائج مشابهه لمـــا توصـــل اليـــه البـــاحثون السابقون [43,34] باستخدام السكر المتعدد الدهني والسكر المتعدد المستخلصين مـــن بكتيريـــا

Pseudomonas. aeruginosa بوصفهما معدلين مناعيين وكذلك (36) باستخدامهما السكر المتعدد البوليولان ضد داء الأكياس العدرية الثانوي. كانت النتائج مشابهه أيضا لما توصل اليه الباحثون[45,44,35] الذين استخدموا السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتيريا *E. Coli* بوصفه معدلا مناعيا فعالا في تحفيز المناعة الخلوية المتمثلة في اختبار فرط الحساسية المتاخر ضد داء الأكياس العدرية وداء الجيارديا، على التوالي.

كما جاءت هذه النتائج مشابهه لما ذكره Ryu&Kim [46] اللذان وجدا ان المستضد المتكون من معقد البروتين– السكر المتعدد ألدهني المستخلص من بكتيريا *Pasteurella multocida* (P-2383) حث انتفاخا كان ملحوظا بعد 18 ساعة من الحقن، واشارا بان الانتفاخ يعود الى ارتشاح الخلايا العدلة، البلاعم الكبيرة وحيدة النواة والخلايا اللمفاوية.يتضح من الجدول (2) ان الـ Spm لوحده ليس له تاثير على حث المناعة الخلوية (النوعية) في حين كان له تاثير على المناعة الطبيعية المتمثلة بمعامل البلعمة.

الجدول (2): التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم (ملم) في الفئران المفعلة باستخدام تراكيز مختلفة من انزيم PAO مع تركيز ثابت من مادة الاساس Spm، وباستخدام التركيز نفسه من Spm لوحده، وبجرعة واحدة قبل 24 ساعة من الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة لمدة شهر واحد .

التراكيز (مكغم)		معدل سمك وسادة القدم (ملم) بعد مرور الفترة الزمنية المحددة		
PAO	Spm	3 ساعات	24 ساعة	48 ساعة
200	200	0.08±0.920****	0.07±1.02****	0.16±0.98****
400	200	0.03±0.806***	0.05±0.622***	0.03±0.448***
800	200	0.15±0.842	0.04±0.530	0.02±0.314
1200	200	0.35±1.574****	0.17±1.080****	0.04±0.810****
1600	200	0.11±0.484	0.03±0.416	0.02±0.308
–	200	0.08±0.570	0.09±0.506	0.13±0.480
C+		0.09±0.51	0.03±0.420	0.02±0.320

C+ فئران السيطرة المخمجة غير المفعلة .

* الفروق معنوية عند ($P < 0.05$)

** الفروق معنوية عند ($P < 0.01$)

*** الفروق معنوية عند ($P < 0.005$)

**** الفروق معنوية عند ($P < 0.001$)

تشير الأرقام في الجدول إلى المعدل (لخمس مكررات) ± الانحراف القياسي.

المصادر

1. Abraham A.K., Olsnes S. and Pihl A. FEBS. Lett. 101:93 (1979)
2. Binda C., Coda A., Angelini R., Federico R., Ascenzi P. and Mattevi A. Acta.crystallogr.D.Biol.Crystallogr,54(2):1429-1431 (1998).
3. Holtta E. Biochemistry, 16:91(1977).
4. Morgan D.M.L., Christensen J.R. and Allison A.C. Biochem. Soc. Trans., 9:563-564 (1981).
5. Ferrante A., Ljungstrom I., Rzepczyk C.M. and Morgan, D.M.L. Infect. Immun. 53(3):606-610 (1986a).
6. Eckert J. and Deplazes P.x. Clin. Microbiol.Rev., 17(1):107-135 (2004).
7. Oku Y., Malgor R., Benavidez Z.U., Carmona C and Kamiya H. Int. Congress Series., 1267:98-104. (2004).
8. Vuitton D.A. Clin. Rev. Aller. Immumol., 26(2):93-104 (2004).
9. Blanton R.E. Options in Infect. Dis., 3:327-332 (2001).
10. Scharcterle G.R. and Pollack R.L. Anal. Biochem., 51:654-655. (1973).
11. Lowrey O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. J. Biol. Chem., 193: 265-275. (1951).
12. Flayeh K.A. Clin. Chem.,34: 401-403 (1988).
13. Dahel K.A.D. M.Sc. Thesis, Univ. Mosul.(in Arabic). (1995).
14. AL-Katib S.M.Y. Ph.D. Thesis, Coll. Edu. Univ. Mosul.(in Arabic) (2000).
15. Hames B.D. and Hooper N.M.(2000). "Instant notes on biochemistry". 2nd ed. Bios. Scientific Publishers Limited.
16. Clark J.M. and Switzer R.L.(1976). "Experimental Biochemistry". 2nd ed., W.H. Freeman and Company San Francisco.
17. Smyth J.D. Proc. 13th ed., Int. Cong. Hydit, Madrid, PP.84-95 (1985).
18. Smyth J.D. and Barett N.G. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:649-652 (1980).
19. Wangoo A., Ganguly N.K. and Mahajan R.C. Indian. J.Med.Res.89:40-42. (1989).
20, Park P.H., Filkring S.M. and Smith Wick E.M. Lancet 2:532-534 (1968).
21. Dottorini S., Sparovli M., Bellucci C. and Magnini M. Ann. Trop. Med. Parasitol., 74:43-49 (1985).
22. Ali-khan Z. Exp. Parasitol, 46:157-165. (1978).
23. Bruning J.L. and Kintz B.L. "Computational handbook of statistics". 2nd ed., Scott Foresman Company, Gleriew (1977).
24. Seiler N., Moulinoux J.P., Havouis R. and Toujas L. Biochem. Cell Biol. 73(5-6):275-281 (1995).
25. Flescher E., Bowlin T.L., Ballester A., Houk R. and Talal N. J. Clin. Invest. 83:1356-1362 (1989).

26. Bachrach U. "Metabolism of polyamines". In:Polyamine in Biology and Medicine. (Morris D.R. and Marton L.J., eds).157-168, Marcel Dekker, New York (1981).
27. Levitz S.M. Di Benedetto D.J. and Diamond R.D. Antonie van Leeuwenhoek., 58(2):107-114 (1990).
28. Rzepczyk C.M., Saul A.J. and Ferrante A. Infect. Immun., 43(1):238-244 (1984).
29. Ferrante A., Rzepczyk C.M. and Saul A.J. J. Immunol. 133(4)2157-2162. (1984).
30. Morgan D.M.L. Biochem. Soc.Trans., 13:322-326. (1985).
31.Davidson N.E., Hahm H.A., McCloskey D.E., Woster P.M. and Casero Jr.R.A. Endocrine-Related Cancer, 6:69-73. (1999).
32. Lawson K.R., Marek S., Linehan J.A., Woster P.M., Casero Jr.R.A., Payne C.M. and Gerner E.W. Clin. Cancer Res. 8:1241-1247 (2002). "
33. Devereux W., Wang Y., Stwart T.M., Hacker A., Smith R., Frydman B., Valasinas A.L., Reddy V.K., Maryon L.J., Ward T.D., Woster P.M. and Casero Jr.R.A. Cancer chemother. Pharmacol. 52:383-390 (2003).
34. Ali A.A. and Abdulla I.T. Riv. Parassitol., XXI (LXV)-1:17– 24 (2004c).
35. Al-Mutaywiti S.S.Y. M.Sc. Thesis, Univ. Mosul.(in Arabic) (2005).
36. Ali A.A. and Salih N.E. Riv. Parssitol., XVII (LXI)-2: 175-182 (2000).
37. Powroznik B., Gharbi M., Dandrifosse G. and Peulen O. Biochimie, 86:651-656. (2004).
38. Garrett R.H. and Grisham C.M. "Mechanisms of enzyme action". In: Biochemistry, 3rd ed., Thomson Learning Academic Resource Center, Brooks/Cole, a division of Thomson Learning, Inc., p:453 (2005).
39. Jenkins P, Dixon J.B., Rakha N.K. and Carter S.D. Parasitology, 100:309-315 (1990).
40. Rakha N.K., Dixon J. B., Skerritt G.C., Carter S. D., Jenkins P, and Clark M. Parasitology, 102:133-140 (1991a).
41.Rakha N.K., Dixon J. B., Jenkins P, Carter S. D., Skerritt G.C. and Clark S. Parasitology, 103:139-147 (1991b).
42.Rakha N.K., Dixon J. B., Carter S. D., Craig P. S., Jenkins P. and Folkard S. Immunology, 74:652-656 (1991c).
43. Ali A.A. and Abdulla I.T. Riv. Parassitol., XX (LXIV)-1:17–24 (2003).
44. Yousif S.Y. M.Sc. Thesis, Coll. Edu. Univ. Mosul.(in Arabic) (2005).
45. Ali ,A.A. and Yousif ,S.Y.(2007).(accepted for publication in , I . J. VET. SCI.) .
46. Ryu H. and Kim C. J. Vet. Sci. 1(2):87–95 (2000).