---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 19، العدد 2، ص 1 - 15، 2008 ----

دراسة كيموحيوية لبعض الأنزيمات في عدد من المذنبات الثنائية المنشأ

احمد عقيل خضير **قصي عبد القادر الجلبي** **محمد صلاح الدين الصالحي**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام: 2007/11/28 ، تاريخ القبول: 2008/2/25)

الملخص

أظهرت الدراسة الكيموحيوية وجود فروقات معنوية متباينة لفعالية الأنزيمات في أنواع المذنبات المختلفة قيد الدراسة. إذ وجدت أعلى فعالية (4.90 ± 0.26) نانو مول/دقيقة/ملغم بروتين لأنزيم الادينوسين دي امينيز في المذنبه احادية الممص، و (297.30 ± 7.99) مايكرومول /دقيقة/ملغم بروتين لأنزيم الكلوتاثيون -S- ترانسفيريز في المذنبة دقيقة الذيل، و(209.40 ± 6.05) مايكرومول /دقيقة/ملغم وزن طري لأنزيم الاستيل كولين استيريز في المذنبة مشطورة الذنب، و(94.67 ± 1.15) وحدة انزيمية لأنزيم اللاكتيت ديهايدروجنيز في المذنبة عارية الرأس، و(23.40 ± 1.08) وحدة انزيمية لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي، و(7.27 ± 0.25) وحدة انزيمية لأنزيم الكلوكوز-6- فوسفات ديهايدروجينيز في المذنبة ثنائية الممص. وهكذا يمكن الاعتماد على فعالية هذه الأنزيمات في التمييز بين الأنواع المختلفة من المذنبات. وعند إجراء تقنية الهجرة الكهربائية وجدت حزم بروتينية مختلفة لكل نوع من المذنبات. تراوحت الاوزان الجزيئية التقريبية للحزم البروتينية في المذنبات المختلفة (25000- 676000) دالتون.

Biochemical Study of Some Enzymes in a Number of Digeneans Cercariae

Ahmed A.Khudhair **Kusai A. Al-Chalabi** **Mohammed S. Al-Salihi**

Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

Biochemical studies showed the presence of various significant distinctions in the activity of enzymes in some types of cercariae under study. The highest activity was (4.90± 0.26) nmol/min/mg protein for adenosine deaminase in monostome cercaria, (297.30 ± 7.99) μmol/min/mg protein for glutathione –S- transferase in microcercous

cercaria, (209.40± 6.05) μmol/min/gm fresh weight for acetylcholinesterase in furcocercous cercariae, (94.67± 1.15) enzymatic unit for lactate dehydrogenase in gymnocephalous cercaria. Finally, (23.40± 1.08) enzymatic unit for alkaline phosphatase and (7.27± 0.25)enzymatic unit for glucose-6-phophate dehydrogenase in distome cercaria. Therefore the activity of these enzymes could be used in distinguishing the various types of cercariae.

Electrophoresis technique showed different patterns of bands. Approximate molecular weights for protein bands in various cercariae varied between (25000-676000) Dalton.

المقدمة

المذنبات cercariae هي الطور المائي من دورة حياة المثقبات، حرة، تعيش لفترة قصيرة وذات شكل شبيه بالدعموص tadpole، تسبب المثقبات العديد من الامراض ذات الاهمية الطبية والبيطرية، وتعد من مشاكل الصحة العامة (Ghobadi and Farahank, 2004)، اذ يمكن ان تنتقل عن طريق الطعام. كما وتسبب عدد من الامراض المشتركة بين الانسان والحيوان (Kock and Wolmarans, 2005a).

تفرز المذنبات التي تعد احدى اطوار اللاجنسية للديدان الثنائية المنشأ العديد من الأنزيمات المحللة للبروتين، والتي تسهل اختراق جلد المضيف وصنع ممرات داخل الانسجة خلال عملية الهجرة بين الاعضاء المختلفة (Moczon,1996). تعد الأنزيمات مواد بروتينية مساعدة تعمل على زيادة سرعة التفاعلات الكيميائية الحيوية داخل الخلية وتشترك جميع الأنزيمات في بعض الخواص التركيبية والوظيفية بغض النظر عن التفاعل الذي تحفزه. تحتوي الأنزيمات على مركز فعال يسمى الموقع المحفز active site يتم فيها تحول المواد المتفاعلة الى نواتجها (Mathews and Van Holde, 1990).

إن للأنزيمات دورا مهما في العديد من العمليات الحياتية للطفيليات (المثقبات)، والتي تتضمن عملية فقس البيوض والانتقال إلى الأطوار المتقدمة من دورة الحياة. كما تسهل الأنزيمات عملية اختراق المذنبات لجلد المضيف اذ تعمل على تحطيم الجزيئات الكبيرة في جلد المضيف التي تمثل عائقا امام غزو ومهاجمة المذنبات من خلال افرازها للانزيمات الهاضمة المحللة لهذه الجزيئات. كذلك تلعب الأنزيمات دورا في عملية تحلل الانسجة اثناء هجرة وانتقال المذنبات بين اجهزة المضيف (Whitfield et al., 2003). كما للانزيمات دورا في عملية هضم المواد الغذائية وتساعد الطفيليات على تجنب الاليات المناعية للمضيف (Yang et al., 2002). اذ تعمل قسم من هذه الأنزيمات على تحطيم (IgG). أظهرت بعض الدراسات ان الأنزيمات يمكن ان تشكل اهدافا targets جيدة لتطوير اللقاحات vaccines وايجاد الادوية المضادة للطفيليات antiparastic drugs (Rao et al., 2003). وللمتناظرات الانزيمية isoenzymes اهمية كبيرة في التشخيص والتمييز بين الديدان الطفيلية وكذلك نموها وتطورها (Park et al., 2000).

لذا اجريت هذه الدراسة لتكون اللبنة الاولية لدراسات مستقبلية يمكن ان تسهم في وضع صورة جيدة عن مدى انتشار المذنبات ومن ثم وضع برامج موثقة للسيطرة والعلاج للحد من انتشار الامراض الطفيلية ذات الاهمية الطبية والبيطرية.

المواد وطرائق العمل

1. جمع العينات:

جمعت خمسة أنواع من القواقع وهي (*Melanopsis praemorsa, Melanopsis nodosa, Theodoxus jordani, Physa acuta, Lymnaea auricularia*) من مواقع مختلفة على ضفاف نهر دجلة في محافظة نينوى ومن مياه العيون في بعض المناطق الشمالية للمدة من نيسان الى تشرين الثاني (2004-2005). صنفت القواقع التي تم الحصول عليها بالاعتماد على المظهر الخارجي (Strum et al., 2005). ومن ثم فحصت القواقع في المختبر للتأكد من إصابتها بالمذنبات أو خلوها بطريقتين:

أ- طريقة الإفراز (الطرح) المتبعة من قبل (Ghobadi and Farahank, 2004).

ب- طريقة السحق (الكسر) المتبعة من قبل (Remy and Arouna, 2005).

2. جمع وتشخيص المذنبات:

جمعت خمسة أنواع من المذنبات التي أصابت القواقع المذكورة في الفقرة أعلاه وتم فحصها مجهريا وصنفت بالاعتماد على (Roberts and Janovy, 2005). وبعدها عزلت الأنواع المختلفة من المذنبات كلا على حدة في أنابيب تحتوي على (2)سم^3 من المحلول الفسلجي لأجل استخدامها في الدراسة الحالية.

3. الدراسة الكيموحيوية:

غسلت المذنبات التي تم عزلها من القواقع بمحلول دارئ الفوسفات الملحي phosphate buffer saline (PBS) ذات الدالة الحامضية pH(7.3) وبتركيز (0.1m) مولار (Liebau et al., 1997) ثم علقت المذنبات المترسبة بـ (3) سم^3 من محلول (PBS) وبوزن محدد لكل نوع، الجدول (1).

سحقت المذنبات باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية، بتسليط (12000) ذبذبة/ثانية لمدة (30) ثانية وبأستخدام حمام ثلجي. كررت العملية أربع مرات مع فترة توقف (5) دقائق بعد كل مرة لغرض الحفاظ على درجة حرارة واطئة للمحلول. ثم فصل الرائق عن الراسب بأستخدام النبذ المركزي الفوقي المبرد بسرعة (10000g) لمدة (10) دقائق وبدرجة (4)م^o (الخان، 2001). استخدم المستخلص الناتج مصدرا لتقدير فعالية الأنزيمات التالية:

1. تقدير فعالية انزيم الادينوسين دي امينيز: قدرت فعالية انزيم الادينوسين دي امينيز (DAA) حسب الطريقة المذكورة عن Suga وآخرون (1991).
2. تقدير فعالية انزيم الكلوتاثيون -S- ترانسفيريز: تم تقدير مستوى فعالية انزيم (GST) حسب الطريقة المذكورة من قبل Khynriam و Prasad (2003).
3. تقدير فعالية انزيم الاستيل كولين استيريز: قدرت فعالية انزيم الاستيل كولين استيريز (AchE) حسب الطريقة المذكورة من قبل البكوع (2002).

الجدول 1: أوزان انواع المذنبات بالملغرام / 3سم^3 من المحلول المنظم وحسب نوع الفحص الكيموحيوي.

الفحوصات الكيموحيوية / انواع المذنبات	انزيم ADA	انزيم GST	انزيم AChE	انزيم LDH	انزيم AlP	انزيم G6-PDH	الاحماض النووية	الهجرة الكهربائية
Furcocercous cercariae	34.7	34.7	34.7	16.2	16.2	16.2	23.3	53.3
Microcercous cercariae	31.4	31.4	31.4	65.2	65.2	65.2	40.2	61.5
Gymmnocephalous cercariae	28.1	28.1	28.1	26.5	26.5	26.5	31.4	52.9
Monostome cercariae	26.1	26.1	26.1	36.2	36.2	36.2	18.5	59.3
Distome cercariae	75.1	75.1	75.1	78.9	78.9	78.9	26.1	49.8

ADA: Adenosine Deaminase GST: Glutathione –S-Transferase AIP: Alkaline Phosphatse

AChE: Acetylcholinesterase LDH: Lactate Dehydrogenase

G6-PDH: Glucose -6- phosphate Dehydrogenase

4. تقديرفعالية انزيم اللاكتيت ديهايروجنيز: تم تقدير فعالية انزيم اللاكتيت ديهايدروجينيز (LDH) بأستخدام عدة التحليل الجاهزة Randox الانكليزية اعتمادا على الطريقة المتبعة من قبل Tietz (1994).
5. تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي: تم تقدير مستوى فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (AIP) بإستخدام عدة التحليل الجاهزة BioMerieux الفرنسية اعتمادا على الطريقة المتبعة من قبل Kind و King (1954).
6. تقدير فعالية انزيم الكلوكوز-6-فوسفيت ديهايدروجينيز : تم تقدير مستوى فعالية انزيم الكلوكوز-6-فوسفيت ديهايدروجينيز (G6-PDH) بإستخدام عدة التحليل الجاهزة (Boehringer Mannhein GmbH Diagnostica) اعتمادا على الطريقة المتبعة من قبل Lohr و Waller (1974).

4. فصل المحتوى البروتيني للمذنبات بطريقة الهجرة الكهربائية: تم فصل المحتوى البروتيني لمستخلص المذنبات بطريقة الهجرة الكهربائية باستخدام هلام متعدد الاكريل أمايد مع (SDS) حسب طريقة Laemmli (1970).

5. التحليل الاحصائي: تم تحليل النتائج احصائيا باستخدام اختبار دنكن المتعدد المدى Duncan's multiple range test (الراوي وخلف الله، 1980).

النتائج والمناقشة

أ- الدراسة الكيموحيوية:

1- فعالية انزيم الادينوسين دي أمينيز (ADA):

يوضح الجدول (2) عدم وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P>0.01$) في مستوى الفعالية النوعية لأنزيم الادينوسين دي اميينز بين أنواع المذنبات، إذ كان أعلى مستوى للفعالية النوعية (4.90 ± 0.26) نانومول /دقيقة /ملغم بروتين في المذنبة من نوع احادي الممص، واقل مستوى للفعالية النوعية وجدت في المذنبة عارية الرأس (2.60 ± 0.10) نانومول/دقيقة/ملغم بروتين والتي اختلفت معنويا عن بقية الأنواع من المذنبات، وفي المذنبات مشطورة الذنب، دقيقة الذيل وثنائية الممص فكانت الفعالية (4.63 ± 0.06)، (4.37 ± 0.52) و(4.83 ± 0.29) نانومول/دقيقة/ملغم بروتين، على التوالي. أشارت النتائج الى فعالية واضحة للانزيم وذلك لأن المذنبات هي طور وسطي في حالة نمو وتطور للتحول الى طور أخر، وهناك عدد من الادلة التي تدعم دور هذا الانزيم في عملية التنظيم والنمو والتمايز الخلوي (Franco and Jossep, 1999). كما وضح عدد من الباحثين ان فعالية أنزيم الادينوسين دي اميينيز تتعرض الى تغييرات وفقا لحالة الخلية ودرجة فعاليتها وهل هي في حالة انقسام ام لا، اذ وجدت زيادة واضحة في فعالية الانزيم في الخلايا الحية المنقسمة (Trotta and Balis, 1977).

2- فعالية انزيم الكلوتاثيون -S-ترانسفيريز (GST):

يوضح الجدول (2) وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P<0.01$) في مستوى الفعالية النوعية لأنزيم الكلوتاثيون-S-ترانسفيريز بين المذنبات قيد الدراسة، اذ كانت أعلى فعالية نوعية (297.30 ± 7.99) مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين في المذنبة دقيقة الذيل ثم أعقبتها (226.47 ± 1.07) مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين في المذنبة ثنائية الممص، وأنخفضت الفعالية فأصبحت (106.93 ± 3.80)، (69.93 ± 3.93) و(49.80 ± 1.56) مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين في كل من المذنبات أحادية الممص، عارية الرأس ومشطورة الذنب، على التوالي. يمكن ان يعزى سبب زيادة فعالية الانزيم في المذنبتين دقيقة الذيل وثنائية الممص الى تكيف بعض الطفيليات لعدد من الستراتيجيات للتماس وتجنب البيئة العدائية hostile environment لها ومن هذه الستراتيجيات زيادة فعالية هذا الانزيم الذي له دور مهم في حيوية وبقاء الطفيليات (Rao et al., 2000)، إذا أن هذين النوعين من المذنبات يكونان بطيئي الحركة ويزحفان على أي سطح مغمور بالمياه أو في القاع لذا يكونان في تماس مباشر مع البيئة.كما يعد أنزيم الكلوتاثيون-S- ترانسفيريز من المركبات البروتينية ذات الوظائف المتعددة قادرة على ازالة السمية الناتجة عن المواد الايضية الداخلية والمواد الغريبة الداخلة الى الجسم، اذ يعمل على تحويل المركبات الكارهة للماء الى مركبات محبة للماء (ذائبة في الماء). تسهل طرحها من الجسم الى الخارج (Chen et al., 2000). ومن التحليل الاحصائي لوحظ وجود فروقات معنوية عالية لفعالية الانزيم في المذنبات المختلفة وان هذه الفروقات الكبيرة يمكن الاعتماد عليها بوصفها مؤشرا في التشخيص والتمييز بين المذنبات قيد الدراسة. فمثلا ان فعالية أنزيم الكلوتاثيون-S-ترانسفيريز في المذنبة دقيقة الذيل تمثل ستة أضعاف فعالية الانزيم في المذنبة عارية الرأس.

3- فعالية أنزيم الاستيل كولين أستيريز (AchE):

اتضح من الجدول (2) وجود فرق معنوية عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) في مستوى فعالية أنزيم الأستيل كولين أستيريز بين أنواع المذنبات.اذ وجدت أعلى فعالية في المذنبة مشطورة الذنب (209.40 ± 6.05) ثم (90.23 ± 2.89) مايكرومول/دقيقة/غم وزن طري في المذنبة احادية الممص وأنخفضت الفعالية في بقية المذنبات الى (50.05 ± 2.87)، (19.79 ± 1.65) و(12.47 ± 0.8) مايكرومول/دقيقة/غم وزن طري في كل من المذنبات عارية الرأس، دقيقة الذيل وثنائية الممص على التوالي. يوجد الانزيم بشكل واسع في الانسجة الحيوانية وهو دليل على نشاط وحيوية الكائنات الحية (Principato et al., 1979)، ولهذا الانزيم دور مهم في الالية الحركية للطفيليات (Bueding, 1952). ويمكن ان يعزى زيادة الفعالية في المذنبتين مشطورة الذنب واحادية الممص عن الأنواع الاخرى من المذنبات الى الاختلاف في شكل وهيئة الانزيم أو الاختلاف في ترتيب الانزيم في اغشية الخلايا فضلا عن الاختلاف في العدد الفعلي للمواقع الفعالة active sites في الانزيم (Gear and Fripp, 1974). ومن الدراسة الحالية لوحظ ان هذين النوعين ذو حركة سريعة ونشطة وهذا يتفق مع فعالية الانزيم العالية في المذنبتين مشطورة الذنب وأحادية الممص مقارنة مع الفعالية الواطئة جدا في المذنبة ثنائية الممص ودقيقة الذيل.

الجدول 2: فعالية الانزيمات في الانواع المختلفة من المذنبات (المعدل +ا الانحراف المعياري).

الفحوصات الكيموحيوية / انواع المذنبات	الفعالية النوعية لـ ADA نانومول/دقيقة/ملغم بروتين	الفعالية النوعية لـ GST مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين	فعالية AChE مايكرومول/دقيقة/غم وزن طري	فعالية LDH وحدة انزيمية	فعالية AlP وحدة انزيمية	فعالية G6-PDH وحدة انزيمية
	المعدل ± الانحراف المعياري	المعدل ± الانحراف المعياري	المعدل ± الانحراف المعياري	المعدل ± الانحراف المعياري	المعدل ± الانحراف المعياري	المعدل ± الانحراف المعياري
Furcocercous cercariae	0.06 ± 4.63 a	1.56 ± 49.80 e	6.05 ± 209.40 a	0.58 ± 60.67 c	0.52 ± 7.70 e	0.50 ± 4.00 c
Micorcercous cercariae	0.52 ± 4.37 a	7.99 ± 297.30 a	1.65 ± 19.79 d	0.44 ± 33.67 e	0.46 ± 16.20 b	0.29 ± 5.33 b
Gymnocephalous cercariae	0.10 ± 2.60 b	3.93 ± 69.93 d	2.87 ± 50.05 c	1.15 ± 94.67 a	0.78 ± 12.16 c	0.50 ± 6.50 a
Monostome cercariae	0.26 ± 4.90 a	3.80 ± 106.93 c	2.89 ± 90.23 b	2.65 ± 82.00 b	1.71 ± 10.20 d	0.50 ± 4.50 c
Distome cercariae	0.29 ± 4.83 a	1.07 ± 226.47 b	0.80± 12.47 e	1.53 ± 42.67 d	1.08 ± 23.40 a	0.25 ± 7.27 a

• المعدل ± انحراف المعياري لثلاثة مكررات

المعدلات المتبوعة باحرف مختلفة عموديا تدل على وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P < 0.01$) .

4. فعالية انزيم اللاكتيت ديهايدروجنيز (LDH):

يتضح من الجدول (2) وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P<0.01$) في مستوى فعالية أنزيم اللاكتيت ديهايدروجنيز في أنواع المذنبات المختلفة. اذ كان بأعلى مستوى (94.67 ± 1.15) و (82.00 ± 2.65) وحدة انزيمية في المذنبتين عارية الرأس واحادية الممص، على التوالي. تلتهما (60.67 ± 0.58) وحدة انزيمية في المذنبة مشطورة الذنب، في حين كانت الفعالية (42.67 ± 1.53) وحدة انزيمية في المذنبة ثنائية الممص، وأقل فعالية ظهرت (33.67 ± 0.44) وحدة انزيمية في المذنبة دقيقة الذيل. وجدت Mero وآخرون (1989) زيادة في فعالية الانزيم في دودة حلزون الكبد العملاقة *F.gigantica* وحلزون الكبد *F.Hepatica* ان زيادة فعالية الانزيم في المذنبات من نوع عارية الرأس واحادية الممص ومشطورة الذنب، ربما يعزى ذلك الى حركتها السريعة مقارنة بالنوعين الاخرين اللذين يكونان بطيئي الحركة، لذا فعندما يكون هناك نشاط عضلي كبير فأن كمية الاوكسجين في العضلات تكون قليلة جدا، ففي هذه الحالة تزداد فعالية انزيم اللاكتيت ديهايدروجنيز العضلي للقيام بدوره الوظيفي وهو اختزال حامض اللبنيك (Orten and Newhouse, 1982). وقد لوحظ ان انزيم اللاكتيت ديهايدروجنيز الموجودة في جسم وذيل المذنبات ولا سيما مذنبات المنشقة المانسينية *S.mansoni* يكون من النوع العضلي (Kruger et al., 1978).

5. فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (AIP):

يوضح الجدول (2) وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P<0.01$) في مستوى فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في أنواع المذنبات، اذ كانت بأعلى مستوى فعالية في المذنبة ثنائية الممص (23.40 ± 1.08) وحدة انزيمية اعقبتها المذنبة دقيقة الذيل (16.20 ± 0.46) وحدة انزيمية ثم المذنبة من نوع عارية الرأس (12.16 ± 0.78) وحدة انزيمية و(10.20 ± 1.71) وحدة انزيمية في المذنبة احادية الممص وبأقل مستوى فعالية (7.70 ± 0.52) وحدة انزيمية ظهرت في المذنبة مشطورة الذنب، وقد اشار Mero واخرون (1989) الى ان فعالية الانزيم كانت عالية في حلزون الكبد العملاقة *F.gigantica* مقارنة بحلزون الكبد *F.Hepatica*، كما تم الكشف عنه نسيجيا بأستخدام تقنات الكيمياء النسجية في عدد من المثقبات (Sharma, 1979). ان الفعالية العالية لهذا الانزيم تعكس دوره المهم في النقل الفعال وأمتصاص الجزيئات الغذائية من خلال الغشاء الخلوي (Haque and Siddiqi, 1982). كما يشارك في عملية بناء البروتينات وكذلك في تكاثر وتمايز الخلايا، فضلا عن ذلك يعد مؤشرا حساسا على حيوية ونمو الاجنة (Humiczewska, 2002).

6. فعالية انزيم الكلوكوز-6-فوسفات ديهايدروجنيز (G6-PDH):

تبين من الجدول (2) عدم وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P>0.01$) بين المذنبتين ثنائية الممص وعارية الرأس في مستوى فعالية انزيم (G6-PDH) اذ كانت (7.27 ± 0.25) و(6.50 ± 0.50) وحدة انزيمية، على التوالي. وكذلك بين المذنبة احادية الممص (4.50 ± 0.50) ومشطورة الذنب (4.00 ± 0.50) وحدة انزيمية، بينما وجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P<0.01$) بين المذنبة دقيقة الذيل والانواع الاخرى من المذنبات اذ كان مستوى الفعالية (5.33 ± 0.29) وحدة انزيمية. يعد انزيم (G6-PDH) الانزيم الاول في مسار فوسفات السكر الخماسي (Mohamed et al., 2005)، وهو المسار المسؤول عن تكوين سكر الرايبوز الضروري لصنع النيوكليوتيدات وهي اللبنات البنائية لصنع الاحماض النووية. وكذلك فأن هذا المسار ضروري جدا لصنع NADPH الضروري لصنع الاحماض الدهنية في السايتوبلازم (Nelson and Cox, 2005).

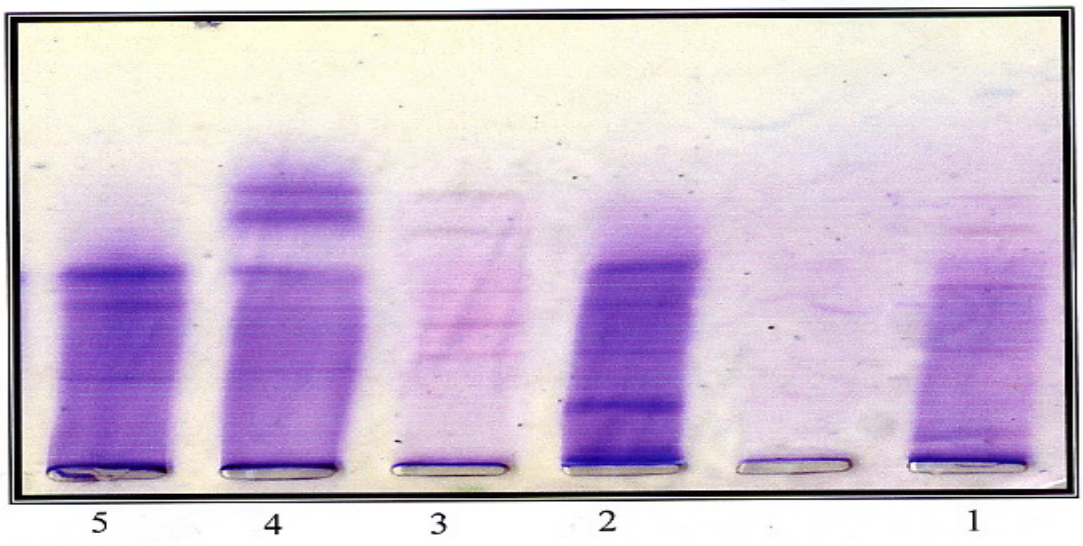
يلاحظ من دراسة فعالية الأنزيمات وجود فروقات معنوية متباينة لفعالية الأنزيمات المدروسة في الأنواع المختلفة من المذنبات وهذه يمكن الاعتماد عليها في التمييز والتشخيص التأكيدي لهذه المذنبات. وهناك حاجة ماسة لتنقية ودراسة خواص هذه الأنزيمات والتي ربما تكون ذات فائدة كبيرة في التمييز بين هذه المذنبات.

ب- فصل المحتوى البروتيني للمذنبات بطريقة الهجرة الكهربائية:

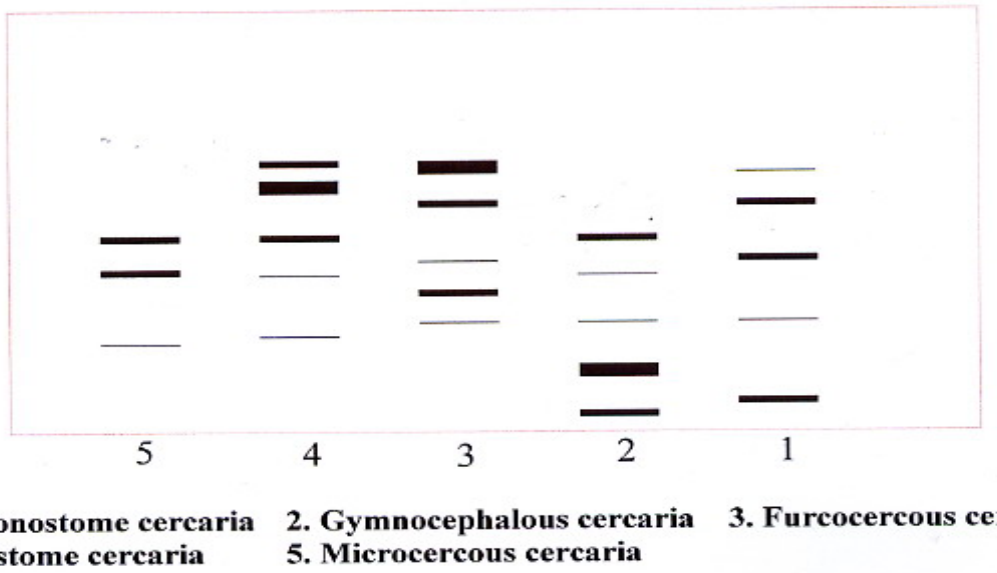
استخدمت تقنية الهجرة الكهربائية كمحاولة للتمييز بين أنواع المذنبات قيد الدراسة على اساس محتوى المذنبات من البروتينات. واستخدم عدد من المركبات القياسية معلومة الوزن الجزيئي التقريبي تراوحت بين (14388-669000) دالتون لرسم المنحني القياسي لغرض تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية SDS-PAGE، (الشكل 1). بعد تسقيط المسافة النسبية المقطوعة من قبل الحزم البروتينية على المنحني القياسي وتم احتساب الوزن الجزيئي التقريبي لكل حزمة، وبهذا تم الكشف عن خمسة حزم بروتينية في اغلب أنواع المذنبات بإستثناء المذنبة من نوع دقيقة الذيل فقد اظهرت ثلاث حزم بروتينية توضح الصورة (1) الحزم البروتينية والشكل (1) والجدول (3) رسم تخطيطي للحزم البروتينية في أنواع المذنبات، والمسافة النسبية والوزن الجزيئي التقريبي لهذه الحزم البروتينية ولكل نوع من المذنبات.

تبين من الصورة والشكل والجدول أعلاه ان لكل نوع من المذنبات حزم بروتينية خاصة بها، ففي المذنبة من نوع احادية الممص هناك حزم بروتينية بالوزن الجزيئي التقريبي (575000) دالتون. ولم تلاحظ في بقية أنواع المذنبات، وتبين وجود حزمتين بروتينيتين بوزن جزيئي تقريبي (398000,676000) دالتون في المذنبة من نوع عارية الرأس. كما وجدت حزم بروتينية خاصة لكل نوع من المذنبات الاخرى، ففي المذنبة مشطورة الذنب كانت الحزمة بوزن جزيئي تقريبي (132000) دالتون، اما في المذنبة ثنائية الممص وجدت ثلاث حزم بروتينية مختلفة بوزن جزيئي تقريبي (25000,35000,224000) دالتون، وظهرت حزمة بروتينية واحدة بوزن جزيئي تقريبي (251000)

دالتون في المذنبة دقيقة الذيل ولم تلاحظ في بقية أنواع المذنبات. كما وجدت هناك بعض الحزم البروتينية المشتركة بين الأنواع المختلفة من المذنبات، فالمذنبة من نوع احادية الممـص اشـتركت بـأربع حـزم بروتينية مع المذنبة مشطورة الذنب، واشتركت المذنبة من نوع ثنائية الممص مع المذنبـة دقيقـة الـذيل بحزمتين بروتينيتين.



الصورة 1: الحزم البروتينية المفصولة بتقنية الهجرة الكهربائية SDS – PAGE.



الشكل 1: مخطط الحزم البروتينية المفصولة بتقنية الهجرة الكهربائية SDS – PAGE.

الجدول 3: الوزن الجزيئي التقريبي للحزم البروتينية التي تم الكشف عنها في أنواع المذنبات المختلفة.

المذنبات	الحزم البروتينية	المسافة النسبية	لوغارتم الوزن الجزيئي	الوزن الجزيئي دالتون
Monostome cercariae	1	0.06	5.76	575000
	2	0.25	5.27	186000
	3	0.38	4.94	87000
	4	0.51	4.62	42000
	5	0.58	4.45	28000
Gymnocephalous cercariae	1	0.03	5.83	676000
	2	0.12	5.60	398000
	3	0.25	5.27	186000
	4	0.35	5.02	105000
	5	0.43	4.82	66000
Furcocercous cercariae	1	0.25	5.27	186000
	2	0.31	5.12	132000
	3	0.38	4.94	87000
	4	0.51	4.62	42000
	5	0.58	4.45	28000
Distome cercariae	1	0.22	5.35	224000
	2	0.35	5.02	105000
	3	0.43	4.82	66000
	4	0.54	4.55	35000
	5	0.60	4.40	25000
Micorcercous cercariae	1	0.20	5.40	251000
	2	0.35	5.02	105000
	3	0.43	4.82	66000

كما واشتركت المذنبة عارية الرأس بحزمة بروتينية واحدة مع المجموعة الاولى (المذنبتين احادية الممص ومشطورة الذنب) وبحزمتين بروتينيتين مع المجموعة الثانية (المذنبتين ثنائية الممـص ودقيقـة الذيل). ويمكن الاستدلال عن وجود تقارب أو بعد جيني بين الأنواع المتشابهة والمختلفة بالحزم البروتينية عن بعضها البعض.

ربما يعزى وجود الحزم البروتينية الخاصة بالمذنبة مشطورة الذنب بكونها بروتينات (أنزيمـات) خاصة بعملية الاختراق وذلك لان هذا النوع من المذنبات لا يتطور الى المذنبة البعيدة اذ تخترق المضيف الملائم مباشرة وبالهجرة بين الانسجة والأعضاء. كما أن الحزم الاخرى الخاصة ببقية المـذنبات. ربمـا تكون بروتينات لها دور في عملية التكيس لتكوين المذنبة البعدية (Whitfield et al., 2003) واسـتخدمت هذه التقنية في الكشف عن عدد من الحزم البروتينية عن اجراء دراسة مقارنة لمحتوى البروتين الكلي في الديدان البالغة لانواع *Pamgonimus* sp. اذ لم يلاحظ فرق معنوي بين الحـزم البروتينيـة المفصـولة (Yoshimura, 1969a). كما استخدمت التقنية عينها فـي التعـرف علـى أنـواع *Pamgonimus* sp. الموجودة في جزيرة Sado اليابانية اذ وجد تطابق في نماذج الهجرة الكهربائي بين أنواع جزيـرة Sado والنوع *Pamgonimus ohirai* (Yoshimura, 1969b)، وفي التمييز بين سـلالات المنشـقة اليابانيـة *S.japonicum* على اساس نماذج الحزم البروتينيـة (Ruff et al., 1973). وان مثـل هـذه الدراسـات استخدمت للتمييز بين أنواع الطفيليات المختلفة وهي من المحاولات الناجحة للتمييز والتفريق بين الكائنات المختلفة اذ اظهرت النتائج كما هو موضح في الجدول (3) ان الحـزم البروتينيـة ذات اوزان جزيئيـة مختلفة ومن الممكن الاعتماد عليها في التمييز بين أنواع المذنبات المختلفة قيد الدراسة.

المصادر العربية

البكوع، بنان خالد عبدالرحمن فتاح، 2000. التغييرات السلوكية والعصبية والكيموحياتية المحدثة بالتداخل بين الكادميوم وبعض المبيدات الحشرية في الفئران. أطروحة دكتوراه، كليـة الطـب البيطـري، جامعة الموصل.

الخان، حسين اسماعيل ارتين نزار، 2001. تأثير المستخلصـات المائيـة لنبـاتي الشـفلح *Capparis spinosa* والحنظل *Citrullus colocynthis* على نمو وايض امامية السوط لطفيليـات اللشـمانيا الجادية *Leishmania major promastigotes* خارج الجسم الحي. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبدالعزيز محمد، 1980. تصميم وتحليل التجـارب الزراعيـة، دار الكتب للطباعة والنشر، مطبعة جامعة الموصل.

المصادر الاجنبية

Bueding, E., 1952. Acetylcholinesterase activity of Schistosoma mansoni. British Journal of Pharmacology, Vol. 7, pp.563-566.

Chen, T.L., Wu, C.H., Chen, T.G., Tai, Y.T., Chang, H.C. and Lin, C.J., 2000. Effect of propofol on functional activities of hepatic and extrahepatic conjugation enzyme systems. British Journal of Anaesthesia, Vol. 84, No. 6, pp.771-776.

Franco, R. and Jossep, J., 1999. Adenosine deaminase inhibitors as therapeutic agents. Drugs of Today, Vol. 25, No. 3, pp.155-170.

Gear; N.R. and Fripp, P.J., 1974. Comparison of the characteristics of acetylcholinesterase present in four species of Schistosoma. Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 47B, pp.743-752.

Ghobadi, H. and Farahank, A., 2004. A faunistic survey on the cercariae of Bellamya (Viviparus) bengalensis snail and their zoonotic importance. Iranian Journal of Public. Health, Vol. 33, No. 2, pp.38-42.

Haque, M. and Siddiqi, A.H., 1982. Histochemical and electrophoretic studies on phosphatases of some Indian trematodes. Journal of Helminthology, Vol. 56, pp.111-116.

Humiczewska, M., 2002. Some specific and non-specific phosphatases of the sporocyst of Fasciola hepatica.II. Enzyme associated with the membrane transport. Folia Parasitologica, Vol. 49, pp.221-226.

Khynriam, D. and Prasad, S.B., 2003. Changes in endogenous tissue glutathione level in relation to murine ascites tumor growth and the anticancer activity of cisplatin. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Vol. 36, No. 1, pp.53-63.

Kind, P.R.N. and King, E.J., 1954. Estimation of plasma phosphate by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. Journal of Clinical Pathology, Vol. 7, pp.322-326.

Kock, K.N. and Wolmarans, C.T., 2005b. Distribution and habitats of Bulinus africanus species group, snail intermediate hosts of Schistosoma haematobium and S. mattheei in south Africa. Water SA., Vol. 31, No. 1, pp.117-125.

Kruger, W.M., Gazzinelli, G., Figueiredo, E.A. and Pellegrino, J., 1978. Oxygen uptake and lactate production by Schistosoma mansoni cercaria, cercarial body and tail, and Schistosomule. Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 60B, No. 1, pp.41- 46.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Vol. 227, pp.680-685.

Liebau, E., Eckelt, V.H., Wildenburg, G., Spittle, P.T., Brophy, P.M., Walter, R.D. and Duhrsen, K.H., 1997. Structural and functional analysis of a glutathione-S-transferase from Ascaris suum. Biochemical Journal, Vol. 324, pp.659-666.

Lohr, G.W. and Waller, H.D., 1974. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Methods of enzymatic analysis, 2nd English ed., Verlag Chemie Weinheim and Academic Press. Inc., New York and London.

Mathews, C.K. and Van Holde, K.E., 1990. In Biochemistry. The Benjamin Commings Publishing Company. Inc. California, U.S.A.

Mero, W.M., Al-Zako, S.S. and Zakaria, S.J., 1989. Comparative studies on some enzyme activity in Fasciola hepatica, Fasciola gigantica and bovine liver. Journal of Education and Science, Vol. 8, pp.67-74.

Moczon, T., 1996. A serine proteinase in the penetration glands of the cercariae of Plagiorchis elegans (Trematoda, Plagiorchiidae). Parasitol. Res., Vol. 82, pp.72-76.

Mohamed, A.M., Metwally, N.M. and Mahmoud, S.S., 2005. Sativa seeds against Schistosoma mansoni different stages. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100, No. 2, pp.205-211.

Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. Lehninger. Principle of Biochemistry, 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York.

Orten, J.M. and Newhouse, O.W., 1982. Human Biochemistry 10th ed., The CV Mosby Company, St.Louis.

Park, G.M., Yong, T.S., Im, K. and Lee, K., 2000. Isozyme electrophoresis patterns of the liver fluke, Clonorchis sinensis from Kimhae, Korea and Shenyang, China. The Korean Journal of Parasitology, Vol. 38, No. 1, pp.45-48.

Principato, G.B., Ambrosini, M.V. and Giovannini, N., 1979. Kinetic studies on the acetylcholinesterase from Allolobophora caliginosa. Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 26C, pp.173-180.

Rao, K.V., He, Y.X. and Kalyanasundaram, R., 2003. Expression of 28-kilodalton glutathione-S-transferase antigen of Schistosoma_mansoni on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potential. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol. 10, No. 4, pp.536-541.

Rao, U.R., Salinas, G., Mehta, K. and Klei, T.R., 2000. Identification and localization of glutathione-S-transferase as a potential target enzyme in Brugia sp. Parasitol. Res., Vol. 86, pp.908-915.

Remy, M. and Arouna, N., 2005. Studies on the morphology and compatibility between Schistosoma haematobium and the Bulinus sp.complex (gastropoda:planorbidae) in Cameroon. African Journal of Biotechnology, Vol. 4, No. 9, pp.1036-1044.

Roberts, L.S. and Janovy, J., 2005. Foundation of Parasitology. 7th ed. Published by McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Ruff, M.D., Davis, G.M. and Werner, J.K., 1973. Schistosoma japonicum: disc electrophoretic protein patterns of Japanese, Philippine and Formosan strain. Experimental Parasitology, Vol. 33, No. 3, pp.437-446.

Sharma, P.N., 1979. Histochemical localization of glycogen, lipids, proteins and phosphatases in the parenchyma and other tissues of some digenetic trematodes. Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 17, pp.479-483.

Strum, C.F., Pearce, T. and Valdes, A., 2005. The mollusks: a guide to their study, collection, and preservation. American Malacological Society, Vol. 21, pp.130-138.

Suga, M., Ando, M., Nishikaw, H. and Araki, S., 1991. Adenosine deaminase activity and froe IL.2 receptor levels in serum from patients with mycoplasma pneumonia. Japanese Journal of Medicine, Vol. 30, pp.108-112.

Tietz, N.W., 1994. Text Book of Clinical Chemistry. 2nd ed., Saunders Company, Philadelphia.

Trotta, P.P. and Balis, M.E., 1977. Structural and kinetics alternative in adenosine deaminase associated with differentiation of rat intestinal cells. Cancer Res.37, pp.2297-2305.

Whitfield, P.J., Bartlett, A., Brown, M.B. and Marriott, C., 2003. Invasion by schistosoma cercariae: studies with human skin explants. TRENDS in Parasitology, Vol. 19, No. 8, pp.339-340.

Yang, H.J., Chung, Y.B., Kang, S.Y., Kong, Y. and Cho, S.Y., 2002. Excretory bladder: the source of cysteine proteases in Paragonimus westermani metacercariae . The Korean Journal of Parasitology, Vol. 40, No. 2, pp.89-92.

Yoshimura, K., 1969a. Paragonimus westermani, P.ohirai and P.miyazkii: electrophoretic comparison of whole body proteins. Experimental Parasitology, Vol. 25, pp.118-130.

Yoshimura, K.,1969b. Paragonimus: electrophoretic fractionation of whole body proteins as an aid in specific identification of a species from Sado Island, Japan. Experimental Parasitology, Vol. 25, pp.107-117.