

تأثير بعض الادوية على فعالية 5'-نيوكليوتايديز لدى النساء المصابات بطفيلي المقوسة الكوندية والكشف عن
الجين الخاص بالطفيلي لدى تلك النساء

الباحثة. اسراء اسماعيل ياسين الطائي الباحثة. مواهب قدوري صالح الدوري

كلية التربية للبنات/ جامعة تكريت

College of education for women\ Tikrit University

Effect of some drugs on the effectiveness of 5-nucleotidase in women with gondipal
archaeophilus and detection of parasite gene in these women

Researcher. Israa Ismail Yassin Al-Tai

altaiiasr@gmail.com

Researcher. Mawahib Kadouri Saleh Al - Douri

bright82light88@gmail.com

College of Education for Girls\ University of Tikrit

Abstract

Biochemistry is closely related to molecular biology. Molecular biology can be counted as a branch of biochemistry, which is a tool for investigation and study of molecular biology. Due to the importance of enzymes, we have evaluated the effectiveness of 5-nucleotide enzyme in T- The study included 22 samples of pregnant women treated with parasites and treatments by (Spiramycin and Sulfonamid) + Folic Acid compared to 20 healthy pregnant women, as well as compared with 22 samples of women who were not treated. Marhn between (45-18) years.

The results showed a significant increase in the effectiveness of 5'-NT in pregnant women treated with parasite when treated with Spiramycin at 143.5 ± 13.9 units / L at a probability level of 0.01 vs healthy. Pregnant women treated by Sulfonamid and Folic Acid found a significant increase In the 5'-NT activity at a rate of (170.3 ± 12.4) unit / l at a probability level of 0.01 vs healthy. The results showed a significant increase in the effectiveness of 5'-NT in women undergoing treatment at 160.1 ± 18.4 (unit / l) at a probability level of 0.01 compared to women who were not treated.

The study included the use of Nested-PCR technique to detect the GRA7 gene of the gondola curved parasite. The gene was observed by 71% in the blood of women treated with Spiramycin while 77% in the blood of the women treated by Sulphonamid and Sulfonamid, GRA7 gene in women who did not undergo treatment showed the gene (81%).

Keywords: 5'-NT, T.gondii, GRA7

المخلص

للكيمياء الحياتية ارتباطاً وثيقاً بعلم الاحياء الجزيئي إذ يمكن عد البيولوجيا الجزيئية بمثابة فرع من الكيمياء الحياتية والتي تعد اداة للتحقيق والدراسة التي تخص البيولوجيا الجزيئية , و نظرا لأهمية الانزيمات فقد ارتأينا تقدير فعالية انزيم 5'-نيوكليوتايديز لدى المصابات ب T.gondii ومعرفة تأثير بعض العلاجات المستخدمة على فعاليته, اذ تضمنت الدراسة جمع 22 عينة من النساء الحوامل المصابات بالطفيلي والمعالجات بواسطة (Spiramycin) و (Folic Acid+Sulphonamid) مقارنة مع 20 عينة من الحوامل الاصحاء بالإضافة الى مقارنتها مع 22 عينة من النساء المصابات اللاتي لم يخضعن للعلاج تراوحت أعمارهن بين (18-45) سنة. اظهرت النتائج وجود ارتفاعاً معنوياً عالياً في فعالية 5'-NT لدى النساء الحوامل المصابات بالطفيلي عند معالجتها بواسطة Spiramycin بمعدل (143.5 ± 13.9) وحدة/لتر عند مستوى احتمالية 0.01 مقارنة بالأصحاء.اما النساء الحوامل المعالجات بواسطة Sulphonamid و Folic Acid فقد وجد ارتفاعاً معنوياً عالياً في فعالية 5'-NT بمعدل (170.3 ± 12.4) وحدة/لتر عند

مستوى احتمالية 0.01 مقارنة بالأصحاء. كما اظهرت النتائج وجود ارتفاعاً معنوياً في فعالية 5'-NT لدى النساء اللاتي يخضعن للعلاج بمعدل (160.1 ± 18.4) وحدة/لتر عند مستوى احتمالية 0.01 مقارنة بالنساء اللاتي لم يخضعن للعلاج. تضمنت الدراسة استخدام تقنية Nested-PCR للكشف عن الجين GRA7 الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية، إذ لوحظ ظهور الجين بنسبة (71%) في دم النساء المعالجات بواسطة Spiramycin في حين ظهر الجين بنسبة (77%) في دم النساء المعالجات بواسطة Sulphonamid و Sulphonamid, وعند الكشف عن الجين GRA7 لدى النساء اللاتي لم يخضعن للعلاج فقد ظهر الجين بنسبة (81%).

الكلمات المفتاحية: 5'-NT, T.gondii, GRA7

المقدمة

5'-نيوكليوتايديز 5'-nucleotidases (EC 3.1.3.5) 5'-Nucleotidase التسمية النظامية: 5'- رايبو نيوكليوتايديز فوسفو هايدروليز 5'-Ribonucleotidase phosphohydrolase يحفز التحلل المائي لرابطة الاستر الفوسفوري من 5'- ريبونوكليوتيد إلى ريبونوكليوسيد وفوسفات المقابلة (1).

توجد سبعة أنواع من 5'-nucleotidases في الأمصال البشرية ستة منها داخل الخلايا (cN-IA cN-IB, cN11, cN111, cdN, mdN) وواحدة خارج الخلايا (eN). تم العثور على الإنزيمات (eN1 و eN11 و eN111) في البكتيريا والحيوانات والنباتات والإنسان وأنها تظهر اختلافات كبيرة في مدى التحلل المائي للمادة الاساس (2). المهمة الرئيسية للـ 5'-NT هي التحلل المائي لأدينوسين أحادي الفوسفات (AMP) إلى الأدينوسين، لذلك فهو جزء من السلسلة لإنهاء عمل النيوكليوتيدات مثل ATP كعلامة جزيئية خارج الخلية (3). يعد 5'-نيوكليوتايديز من الإنزيمات الأوسع انتشاراً في العديد من أنسجة الجسم كما يوجد في الحيوانات والنباتات وكذلك الأحياء المجهرية وبعض الأنواع من الطفيليات والبدائيات (4).

يعد داء المقوسة الكوندية toxoplasmosis واحداً من أهم الأمراض الطفيلية المشتركة بين الإنسان والحيوان zoonotic disease والذي سببه طفيلي المقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii* الذي يعد من الطفيليات الابتدائية protozoa وهو كائن أحادي الخلية يتطفل داخل الخلايا الجسمية للمضيف (5). وتعد جميع الأنواع التابعة لعائلة السنوريات Felidae والقطط المنزلية والبرية المضائف النهائية للطفيلي، اما الإنسان والحيوانات الأخرى فتُعد المضائف الوسيطة للطفيلي (6).

تحدث الإصابة في الإنسان بطرق عدة من ضمنها تناول اللحوم النيئة او الغير مطبوخة جيداً والتي تحتوي على الأكياس النسيجية tissue cysts، عن طريق الأكياس البيضية Oocyst المطروحة مع براز القطط المصابة نتيجةً للتماس المباشر مع القطط، او التعامل مع التربة الملوثة ببراز القطط المصابة فيصاب الإنسان وأغلب أنواع الحيوانات والطيور، أو عن طريق شرب الحليب غير المبستر. يمكن ان تحدث الإصابة نتيجة انتقال الطفيلي من الأم الحامل المصابة الى جنينها عبر المشيمة transplacenta، تعتمد شدة الإصابة في الجنين على وقت إصابة الأم الحامل، وكذلك يمكن أن تنتقل عن طريق عمليات نقل الدم وزراعة الأعضاء (7).

طرائق العمل

جمعت خلال الدراسة 22 عينة من النساء الحوامل المصابات بالطفيلي والمعالجات بواسطة (Spiramycin) و (Folic Acid+Sulphonamid) مقارنة مع 20 عينة من الحوامل الاصحاء بالإضافة الى مقارنتها مع 22 عينة من النساء المصابات اللاتي لم يخضعن للعلاج تراوحت أعمارهن بين (18-45) سنة.

تقدير فعالية انزيم 5'-NT في مصل الدم

1- استعملت طريقة Fisk & Subbarow في تقدير فعالية انزيم 5'-NT , مبدأ عمل هذه الطريقة يستند الى تقدير عدد مايكرومولات الفوسفات اللاعضوي الناتجة من اختزال المادة الاساس 5'-AMP في وسط التفاعل باستخدام كاشف Fisk & Subbarow⁽⁸⁾.

تمت عملية استخلاص الـ DNA Genomic من عينات دم محفوظة في انابيب EDTA⁽⁹⁾.

للكشف عن الجين GRA7 تم باستخدام تقنية Nested-PCR واعتماد بادئات مصممة يوضحها الجدول (1), واتبعت طريقة

إدوارد⁽¹⁰⁾ للكشف عن الجين GRA7, الذي ينتج الحزم المخصصة له وباستخدام برنامج يوضحه الجدول (2):

جدول (1): أسماء وتسلسل وطول الناتج للجينات المحضرة

الجين	البادئ	تسلسل القواعد 3' → 5'	حجم الجين المستهدف bp
GRA7	FE	CAAGCACCCGTTGACAGTCT	322-bp
	RE	ACGATGCACCCATAACCAACAG	
	F1	CACCAGCATGGATAAGGCATC	222-bp
	R1	GCGAGCTTCTTCAGCAAGTCT	

جدول (2): المكونات والبرامج المستخدمة في تفاعل Nested-PCR

Gene	Primer	Amplification conditions	D.W	F	R	DNA(μl)	Total Volume(μl)
GRA7	GRA7/FE GRA7/RE	For 2 min 94 °C 94 °C for 40 Sec 59°C for 40 Sec 63°C for 40 Sec	17μl	1μl	1μl	1μl	20 μl
	GRA7/F1 GRA7/R1	63°C for 3 min (30 Cycle)	16μl	1μl	1μl	2μl	

تم اعتماد التحليل الإحصائي لنتائج البحث على حساب اختبار الطالب (t) من الجانبين Student's T test - 2tails

لتحديد الاختلافات المعنوية بين متوسطات القيم باستخدام طريقة (ANOVA).

النتائج والمناقشة:

تشير النتائج في الجدول (3) الى وجود ارتفاع في نشاط انزيم 5'-NT في المجموعة الأولى من النساء الحوامل المصابات

بطفيلي المقوسة الغوندية عند معالجتها بواسطة Spiramycin وبمعدل (143.5 ± 13.9) وحدة/لتر وبمستوى احتمالية P=0.01.

الجدول (3): المعدل ± الانحراف المعياري في دم النساء الحوامل المصابات والمعالجة بواسطة Spiramycin مقارنة بالأصحاء

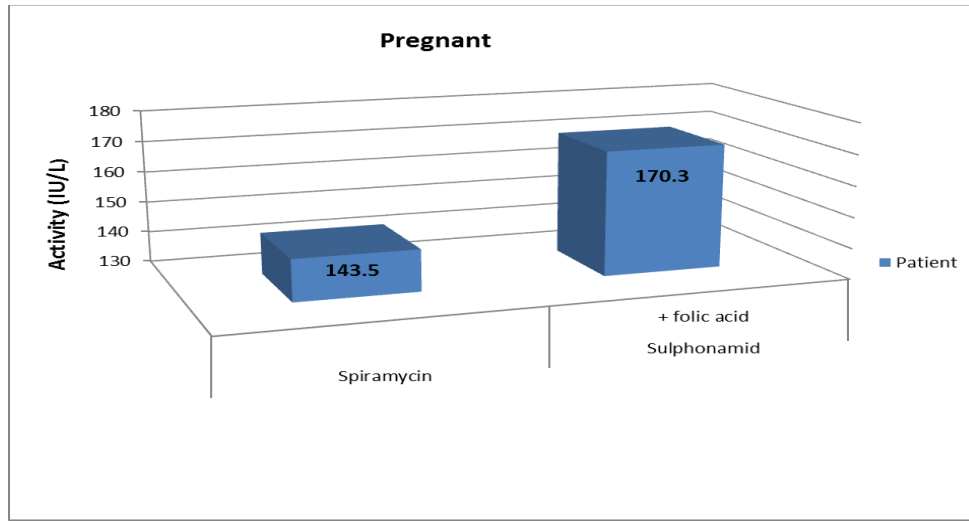
State	Activity 5'-NT IU/L (Mean ± SD)	P value
Patient use Spiramycin	143.5 ± 13.9	0.01
Control	69.3 ± 10.3	

ان الارتفاع الحاصل لفعالية 5'-NT لدى المصابات المعالجات بـ Spiramycin، قد نتيجة انه Spiramycin من المواد المحفزة لفعالية الانزيم 5'-NT (*)، اما لدى النساء الحوامل المصابات والمعالجة بواسطة Sulphonamide و Folic acid فقد وجد زيادة في الفعالية الانزيمية بمعدل (170.3 ± 12.4) وحدة/لتر وعند مستوى احتمالية p=0.01، كما موضحة في الجدول (4).

الجدول (3): المعدل ± الانحراف المعياري في دم النساء الحوامل المصابات والمعالجة بواسطة Folic acid & Sulphonamide مقارنة بالاصحاء

State	NO	Activity 5'-NT IU/L (Mean ± SD)	P value
Patient use Sulphonamide & Folic acid	12	170.3 ± 12.4	0.01
Control	12	73.6 ± 9.3	

يبين الشكل (1) وجود فروق معنوية عند اجراء مقارنة بين النساء اللواتي يخضعن لعلاج Spiramycin وتلك اللواتي يستخدمن Folic acid & Sulphonamide كعلاج.



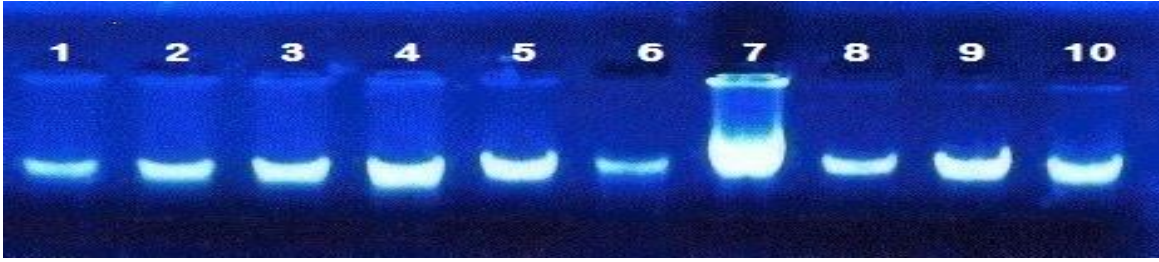
الشكل (1): مقارنة فعالية انزيم 5'-NT في النساء الحوامل المصابات بطفيلي المقوسة الغوندية والمعالجات بواسطة Sulphonamide+folic acid و Spiramycin.

ان النتائج الموضحة في الشل اعلاه تبين وجود فرق في تأثير هذه العلاجات على فعالية انزيم 5'-NT إذ وجد ارتفاعاً في فعالية 5'-NT عند مستوى احتمالية (p=0.01) عند استخدام العلاج Sulphonamide+folic acid. بينما أظهرت بعض الدراسات ان مثبطات Nucleotidase و Melanocidins(A,B) لها نشاط مثبط قوي ضد 5'-Nucleotidases في غشاء كبد الفئران وسم الثعابين، حيث اشارت النتائج الى ان مثبطات 5'-Neucleotidase تمنع نمو الورم عن طريق تعديل نظام المناعة(11).

التحري عن الجين GRA7 الخاص بطفيلي المقوسة الكوندية:

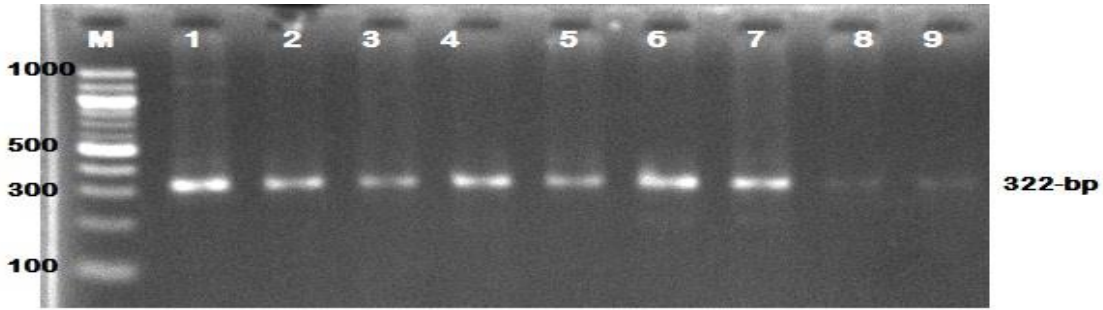
نجحت عملية استخلاص DNA المجيني وتم التأكد من ذلك من خلال ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز كما موضحة

في الشكل (2).



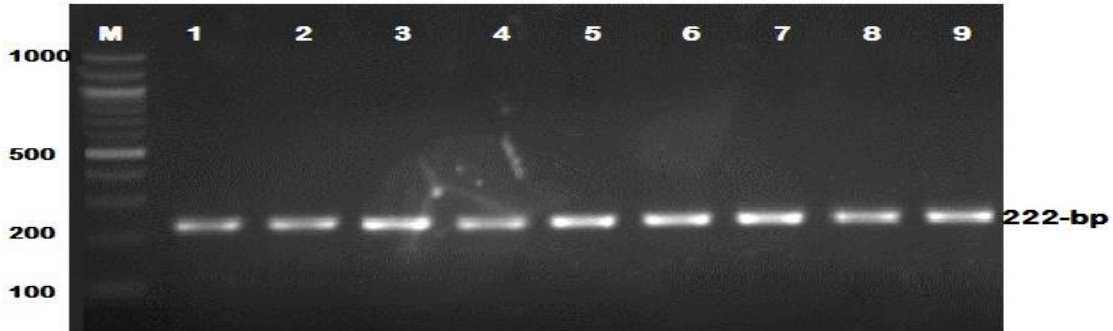
الشكل(2): ناتج الترحيل الكهربائي لعينات DNA, إذ تشير الأرقام من 1-10 الى نماذج من عينات DNA لنساء مصابات بطفيلي المقوسة الكوندية.

تم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل لتضخيم الجين (GRA7) الخاصة بطفيلي المقوسة الكوندية, نجح زوجي البادئ GRA7 بإظهار حزمتين وبحجم 322-bp و 222-bp كما موضحة في الاشكال (3-a) و(3-b).



الشكل (3-a): ناتج التضخيم لبادئ الجين GRA7

M: تشير إلى (100bp DNA Ladder), تشير الأرقام (1-9) إلى عينات النساء المصابات بطفيلي المقوسة الكوندية بظهور الحزمة 322-bp -bp.



الشكل (3-b): ناتج التضخيم لبادئ الجين GRA7

M: تشير إلى (100bp DNA Ladder), تشير الأرقام (1-9) إلى عينات النساء المصابات بطفيلي المقوسة الكوندية بظهور الحزمة 222-bp.

تتفق هذه النتائج مع ما جاء به الباحث (Eduarda)⁽¹⁰⁾ عند تضخيم الجين GRA7 بتقنية Nested-PCR لتشخيص وجود طفيلي المقوسة الكوندية, وكانت بنسبة ظهور GRA7 لدى النساء المصابات اللاتي لم يخضعن للعلاج 81,8% في حين كانت الإصابة للاتي استخدمن Spiramycin و Sulphonamide+folic acid كعلاج ظهر الجين بنسبة 71% و 77% على التوالي, وهذا دليل على حساسية وكفاءة هذا الجين في الكشف عن طفيلي المقوسة الكوندية. إذ تم اختياره كأفضل علامة تشخيصية لاسباب عديدة منها اتاحة أكبر عدد من متسلسلات GRA7, مما يوفر تمثيلا كبيرا للعديد من الحلقات, بما في ذلك تسلسل السلالات النسلية والسلالات غير النمطية من عدة بلدان, وكذلك GRA7 يحدث فقط في T. غوندي وفي الحمض النووي نوع Hamondi

hammondi، من دون أي تسلسل متجانسة أخرى معروفة في نتائج التضخيم⁽¹²⁾، يعد GRA7 بروتين بالغ الأهمية لتشكيل فجوة parasiteophoruse، المتورطة في حجز endolysosomes المضيف ويعبر عنه في جميع أشكال المعديّة (tachyzoite وbradyzoite ,merozoite and sporozoite)، ويلعب دورا هاما في إنشاء التهابات داخل الخلايا⁽¹³⁾.

المصادر:

1. Iraqi cancer Board. Results of Iraqi Cancer Registry 1989 – 1991. Baghdad, Ministry of Health of Iraq, 1993:18-20.
2. Ferlito A. Histological classification of larynx and hypopharynx cancers and their clinical implications. Acta otolaryngol 1976: 342: 1-37.
3. Michael Glesson: Malignant Alan G. Kerr. Salivary gland tumors. In: Scott – Brown's otolaryngology, sixth edition, vol.5. London, Butterworth and Heinemann, 1997: 5/11/9.
4. Zimmermann, H. (1992) "5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects", Biochem. J.;285(2), 345-365.
5. Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii* transmission diagnosis and prevention. Clin. Microbiol. Infect., 8(10): 634-640.
6. Markell, E. K; Voge, M., John, D. T. and Petri, W. A.(2006) Markell and Voges Medical parasitology 9thed. W. B. Saunders Elsevier company. U. S. A., 5: 140-148.
7. Sullivan Jr, W. J., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. FEMS Microbiol., Rev., 36(3) :717-733.
8. Fisk, C.H. and Subbarow, K. (1925) "The Colorimetric Determination of Phosphorous", *J. Biol. Chem.* 66, pp.375.
9. Ali, s.m; Mahnas, S. Mahmood, T.(2008) "rapid genomic DNA extraction (RGDE).Forensic science international": Genetic Supplement Series 1:63-65.
10. Eduarda S.M., Costaa,C. and etc. (2016) "An alternative nested-PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* strains based on GRA7 gene sequences"
11. Hiroshi O., keijiro U., Tetsu A.,Shun-ichi W. and Akira F. (1984) " A New 5'-Nucleotidase inhibitor, nucleotidin I.toxonomy ,fermentation ,isolation, and biological properties"the journal of antibiotics. VOL. XXXVIII NO. 2.
12. Walzer, K.A., Adomako-Ankomah, Y., Dam, R.A., Herrmann, D.C., Schares, G., Dubey, J.P., Boyle, J.P., 2013. *Hammondia hammondi*, an avirulent relative of *Toxoplasma gondii*, has functional orthologs of known *T. gondii* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 7446–7451, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.130432211>
13. Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., Joiner,K.A., 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. Cell 125, 261–274, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.056>.