------ مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد8، خاص بعلوم الحياة، ص 17-31، 2005-----

فسلجة التأثير التثبيطي لبعض متناظرات البيورين على أيض الطور أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا الجادية *Leishmania major*

حسين فاضل حسن *قسم علوم الحياة* *كلية التربية* *جامعة تكريت*

أسماء عبد العزيز علي *قسم علوم الحياة* *كلية التربية* *جامعة الموصل*

نعمة علي أحمد *قسم علوم الحياة* *كلية التربية* *جامعة تكريت*

(تاريخ الاستلام 2004/4/28 ، تاريخ القبول 2004/8/21)

الملخص

تناولت الدراسة الحالية اختبار فعاليـة متنـاظرات البيـورين (البـايرازولو (3,4-d) بيريميـدين والبايرازولو (4,3-d) بيريميدين والدي ازابيورين) كمواد مثبطة لنمو ونشاط الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية *Leishmania major* promastigotes.

بينت النتائج أن المعاملة بالمركبات APP و HPP و FoA و FoB أدت إلى تثبيط صنع الحـامض النووي الرايبوزي والحامض النووي الـدي أوكـسي رايبـوزي وكـذلك فعاليـة إنزيمـات الأدينـين فوسفورايبوسيل ترانسفريز والأدينوسين كاينيز في الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية. وقد افتـرض أن هذه المركبات قد تعاني من عمليات حياتية لتتحول إلى أشكالها ثلاثية الفوسفيت لتنـدمج فـي الحـامض النووي الرايبوزي لتعيق بذلك صنع هذه الجزيئة الحيوية وتؤدي في النهاية إلى إيقـاف انقـسام وتكـاثر الطفيلي.

Inhibitor Effect Physiology of Some Purine Analogs on Metabolism of *Leishmania major* Promastigotes

Husain F. Hasan *Department of Biology* *College of Education* *Tikreet University*

Asmaa A. Ali *Department of Biology* *College of Education* *Mosul University*

Ne'ma A. Ahmad *Department of Biology* *College of Education* *Tikreet University*

ABSTRACT

The capacity of purine analogues (pyrazolo (3,4-d) pyrimidine, pyrazolo (4,3-d) pyrimidine and deazapurine) to inhibit *Leishmania major* promastigotes metabolism was evaluated.

The observations reported here indicate that APP, HPP, FoA and FoB inhibited the synthesis of RNA, DNA and the activities of adenine phosphoribosyltransferase and adenosine kinase in promastigotes of *L. major*. It has been postulated that *Leishmania* promastigotes have a unique ability to convert these analogs sequentially to their nucleoside triphosphates leading to their incorporation into RNA and cytotoxicity to the organism.

المقدمة

يشمل جنس اللشمانيا الطفيليات السوطية الدموية Haemoflagellates التي تتميز بوجـود الجـسم الحركي عند قاعدة السوط وتسبب أمراضا مهمة في الإنسان تعرف كلية بداء اللشمانيات Leishmaniasis في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية (Herwaldt, 1999) إذ تسبب الكالاأزار (داء اللشمانيا الحشوي) (visceral leishmaniasis) Kala azar والبثـرة الـشرقية (داء اللـشمانيا الجلـدي) (cutaneous leishmaniasis) Oriental sore وتآكل الأغشية المخاطية في الفم والأنـف (داء اللـشمانيا الجلدي المخاطي) (mucocutaneous leishmaniasis) Espundia.

يمكن مكافحة هذه الأمراض بمعالجة الأشخاص بالأدوية المضادة للشمانيا، كما تتضمن الخطـوات الوقائية مكافحة الناقلات vectors وخازنات العدوى reservoir hosts بالإضافة إلى ذلك فـإن التحـصين الفعال immunization يمكن أن يبرهن نجاحه في المستقبل (Hide et al., 1997).

أما بالنسبة للعلاج الكيميائي فيعد الأنتيمون خماسي التكافؤ pentavalent antimony مثل بنتوسـتام pentostam (sodium stibogluconate) العلاج الأفضل للمصابين بداء اللشمانيا الاحـشائي والجلـدي ويعطى بجرعة يومية مقدارها 20 ملغم/كغم مـن وزن الجـسم لمـدة لا تقـل عـن عـشرين يومـا (Berman, 1992; Davidson, 1998). أما ميكانيكية عمل هذا الدواء فيعتقد بأنها نتيجة لتثبيطه إنـزيم الفوسفوفركتوكاينيز حيث يساعد هذا الإنزيم على تحديد تركيز الكلوكوز في عمليـة التمثيـل اللاهـوائي للكلوكوز والتي تحدث في اللشمانيا بمعدلات عاليـة (Glew et al., 1988; Ronsenblatt, 1999). كمـا استخدم المركب الأنتيموني خماسي التكافؤ glucontime في علاج أنواع عديـدة مـن داء اللـشمانيات (Herwaldt, 1999) وبالنـسبة للمرضـى غيـر المـستجيبين لعـلاج خماسـي التكـافؤ (Amphotericin B) B يستخدم البنتاميدين Pentamidiene أو الأمفوتريسين (Mebrahtu et al., 1989) خطا ثانيا للعلاج فيعطى البنتاميدين بجرعة مقدارها 4 ملغم/كغم من وزن الجسم ثلاث مرات أسـبوعيا لمدة 25 أسبوعا أو أكثر تبعا لمدى استجابة الحالة ، أما الأمفوتريسين B فيعطى يوميا بجرعة مقـدارها 0.5–1 ملغم/كغم من وزن الجسم لمدة 8 أسابيع (Blana et al., 1998; Lira et al., 1999).

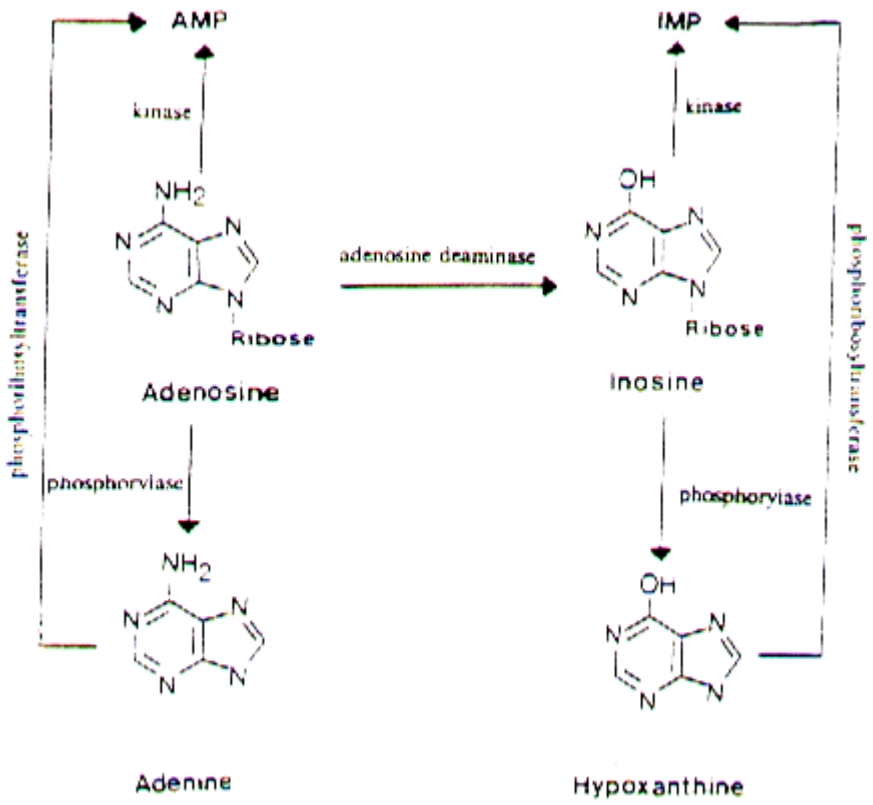
لقد وجد أن البنتاميدين يعمل على تثبيط تكوين polyamine synthesis مما يؤدي إلى موت الطفيلي (Goldsmith, 1999). أما الأمفوتريسين B فقد وجد بأنه يتفاعل مباشرة مع ستيرولات sterols الغشاء

البلازمي وينـتج مركبـات معقـدة تـؤثر فـي نفاذيـة الغـشاء ممـا يـؤدي إلـى تحلـل الخليـة (Berman and Dietz, 1999).

كمـا جـرى اسـتخدام متنـاظرات البيـورين (البايرازولوبيريميـدين) purine analogues (pyrazolopyrimidine) لعـلاج مـرض اللـشمانيا (Hassan, 1993) وتتـضمن مركبـات البايرازولوبيريميدين مجموعة من المركبات المشابهة تركيبيا للقواعد البيورينية أو نيوكليوسيداتها وتختلف في ترتيب ذرات النتروجين، الهيدروجين والكاربون عند الموقع 7، 8، 9 في الحلقـة غيـر المتجانـسة للقاعدة النتروجينية أو عند الموقع 2، 3 للسكر.

من هذه المتناظرات التي استخدمت كأدوية مضادة للجراثيم والأورام (Jacob, 1987; Holory et al., 1988) والأوالي والديدان الطفيلية مركب الكورديسبين Cordycepin أو 3-deoxyadenosine الذي تستبدل فيه مجموعة الهيدروكسيل بذرة الهيدروجين عنـد الموقـع 3 للـسكر، ومركـب التيوبرسـيدين Tubercidin الذي تستبدل فيه ذرة النتروجين بذرة الكاربون عند الموقع 7، ومركبي الفـور ماسـين أ Formycin A أو الفورماسين ب Formycin B اللذان تستبدل فيهما ذرة الكاربون عند الموقـع 8 وذرة النتروجين عند الموقع 9 بذرة النتروجين وذرة الكاربون، على التوالي، وكـذلك مركـب الألوبيورينـول Allopurinol الذي تتحول فيه ذرة النتروجين من الموقع 7 إلـى الموقـع 8 (الـشكل 1) ومركـب 8 ازاأدينين 8-azaadenine الذي تضاف فيه ذرة النتـروجين فـي الموقـع 8 (Hassan and Coombs, 1986). لقد أشارت العديد من الدراسات في الأوالي الطفيلية إلى أن الفعل الـسمي للبايرازولوبيريميـدين ناتج عن استخدام هذه المتناظرات من قبل مسار الإنقاذ وتحويلها إلى المتناظرات التركيبيـة للإينوسـين أحادي الفوسفيت التي تتحول فيما بعد إلى المتناظرات التركيبية للأدينوسين أحادي الفوسفيت ثم تندمج في الحامض النووي الرايبوسومي وتتداخل مع الحامض النووي الرايبوزي المراسل mRNA الذي يشفر لبناء البروتين وهكذا تقع الفوضى في العمليات الحياتية لبناء هذه الجزيئات الحيويـة (Nelson et al., 1979; Avila et al., 1986; Hassan, 1993).

ويهدف البحث الحالي الى دراسة تاثير مشتقات البيورين المثبطة للنمـو علـى كميـة البـروتين والأحماض النووية بنوعيها DNA و RNA في اللشمانيا المعاملـة والكـشف عـن فعاليـة إنزيمـات الأدينوسين دي أمينيز والأدينوسين كاينيز والأدينين فوسفورايبوسيل ترانسفريز في اللشمانيا المعاملة مـن اجل استنتاج المسارات الأيضية التي تسلكها مشتقات البيورين في اللشمانيا الجلدية.



الشكل 1: بعض مشتقات البايرازولوبيريميدين.

المواد وطرائق العمل

الكائنات المستخدمة:

تم الحصول على الطور أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania major* من كلية بين النهرين الطبية في بغداد والتي كانت قد أخذت من عزلات محلية وتم تشخيـصها بطريقـة المتنـاظرات الإنزيمية Isoenzymeenzyme analogues (Al-Jeboori and Evans, 1980).

استنبات طفيليات اللشمانيا في الوسط الزرعي ثنائي الطور:

استخدم الوسط الزرعي ثنائي الطور Tobie s medium (Tobie et al., 1950) للحـصول علـى تنمية جيدة للطور أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا في وقت قصير. يتكون هذا الوسط الزرعي من طورين، الطور الصلب solid phase والطور السائل liquid phase (Chang and Hendricks, 1985).

جمع اللشمانيا من الوسط الزرعي:

تم فصل الطور أمامي السوط ثنائي الطور باستخدام جهاز المنبذة المبرد نوع Ultracentrifuge 18 وبسرعة (2000 g) ولمدة 10 دقائق، بعد ذلك تم غسل قرص الطفيليات مرتين في محلـول Tris–MES بتركيز 50 ملليمـولار Mm الحـاوي علـى الـسكروز بتركيـز 0.25 مـولار M ودالـة أس هيدروجيني (pH 7.2) للتخلص من بقايا الوسط الزرعي.

تحضير مستخلص الخلايا:

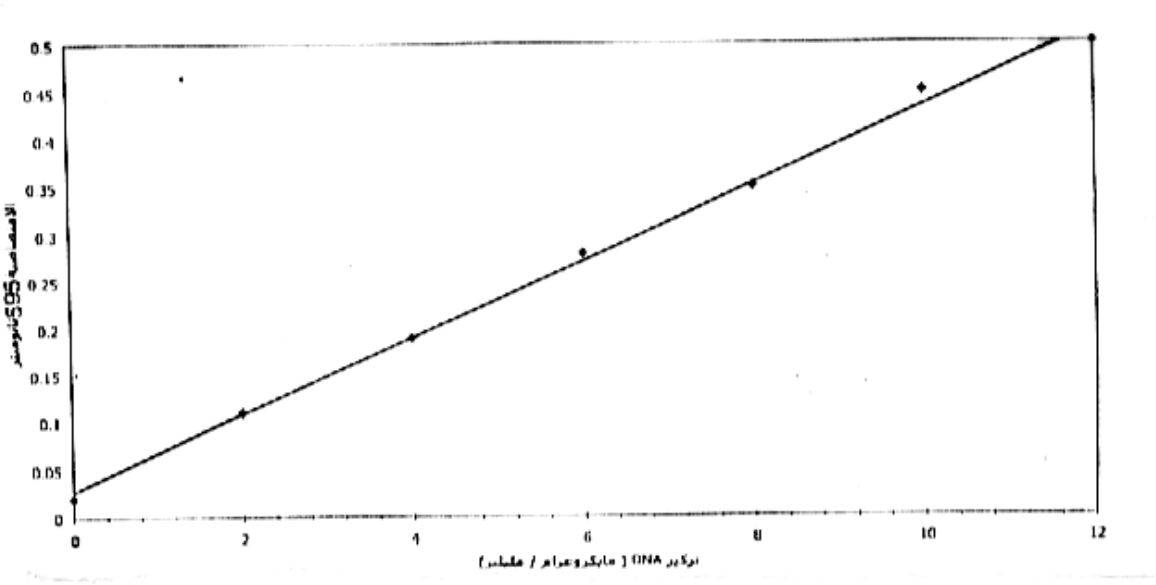
بعد جمع وغسل اللشمانيا تم تكسيرها في محلول TSD الحاوي على ترس HCL بتركيز 50 ملليمولار والسكروز بتركيز 0.25 مولار والدايثايوثريتول Dithiothritol بتركيز 0.1 مولار وبدالة أس هيدروجيني (pH 7.2) بواقع 10^7 خلية/ملليلتر بتعريضها إلى الموجات فوق الصوتية ثلاث مرات متتالية لمدة 30 ثانية تتخللها فترات انتظار لمدة 20 ثانية باستخدام جهاز (Soniper 150) لتحويلها إلى كتلة متجانسة (مستخلص خام) (crude homogenate or crude extract)، بعد ها أخذ المستخلص الخام وفصل الراسب عن الراشح بواسطة جهاز المنبذة وبسرعة 10000 x g لمدة ساعة واحدة وبدرجة حرارة 4 مئوية. وقد استخدم الراشح مصدرا للكشف عن فعالية الإنزيمات وحسب تصاميم التجارب.

تحضير مستخلص الطفيليات المعاملة مع مشتقات نظائر البيورينات:

بعد معاملة الطور أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا بمشتقات البايرازولوبيريميدين وتحديد التركيز القاتل (50%) من الخلايا، تم تحضير الطفيليات المعاملة وذلك عن طريق تنميتها على وسط تربي في دوارق زجاجية سعة 500سم^3 وبواقع 100سم^3 الصاب و40 سم^3 من الوسط السائل لكل دورق، أضيف لكل دورق التركيز المثبط لـ 50% من النمو من مشتقات البايرازولوبيريميدين ومن ثم لقحت الدوارق بـ 0.5 سم^3 من مزرعة الطور أمامي السوط الحاوية على $5x10^7$ خلية/سم^3. تم جمع الطور أمامي السوط بعد 4-5 أيام من المعاملة ثم أكملت عملية تحضير مستخلص الخلايا بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة السابقة.

تحديد كمية الأحماض النووية في مستخلص الخلايا:

تم تحضير المستخلص الحاوي على الأحماض النووية من خلايا اللشمانيا المعاملة بمشتقات البايرازولوبيريمييديين باستخدام طريقة (Burton, 1967)، وحددت تراكيز DNA بموجب طريقة (Giles and Mayer, 1965) وذلك بتقدير كمية السكر الدي أوكسي رايبوزي من DNA باستخدام الكاشف الأمين ثنائي الفينيل Diphenyl amine بالاعتماد على المنحنى القياسي (الشكل 2) المحضر من تراكيز من الـ DNA المستخلص من الغدة الصعترية للعجول calf thymus حيث تم مزج 1 ملليلتر من المحلول المراد قياس محتواه من DNA مع 2 ملليلتر من كاشف الأمين ثنائي الفنيل ثم غلي المزيج لمدة 12 دقيقة، بعد ذلك قيست الكثافة الضوئية على الطول الموجي 595 نانوميتر وحضر كفء الكواشف من إضافة الكاشف إلى 1 ملليلتر من الماء المقطر.



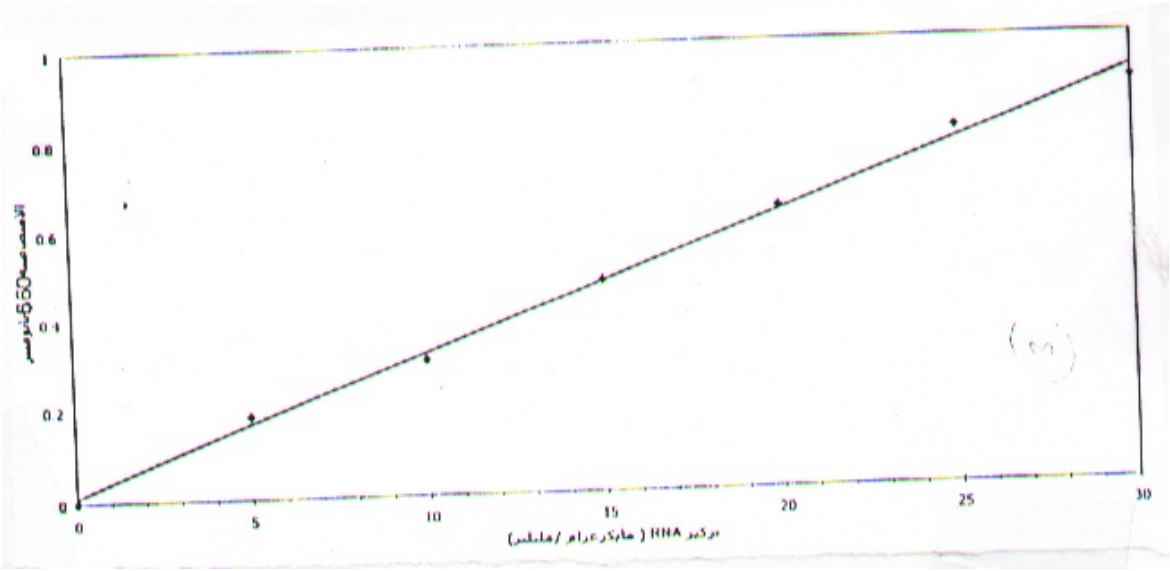
الشكل 2:المنحنى القياسي للحامض النووي الدي اوكسي رايبوزي (DNA)

تحديد تركيز الحامض النووي RNA:

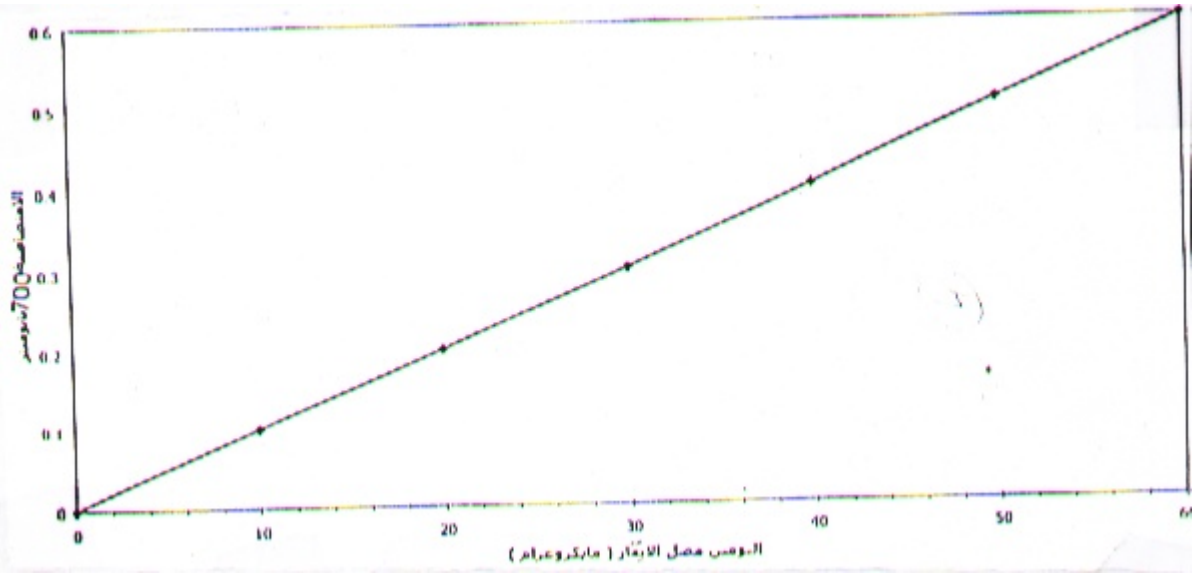
تم تحديد تراكيز الـ RNA بموجب طريقة (Plumer, 1978) باستخدام كاشف الأورسينول وهـذا الاختبار هو تفاعل عام للسكريات الخماسية إذ يعتمد على تكوين الفورفورال furfural الذي ينـتج مـن تسخين السكريات الخماسية مع حامض الهيدروكلوريك المركز ثـم يتفاعـل الفورفـورال مـع كاشـف أورسينول بوجود كلوريد الحديديك كعامل مساعد ليعطي الضوء الأخضر. وقد حددت كمية الـ RNA اعتمادا على المنحنى القياسي المحضر من RNA القياسي (الشكل 3) بتراكيز تراوحـت بـين (0–50) مايكروغرام/ملليلتر بحيث تم مزج 2 ملليلتر من المحلول المراد قياس محتواه من RNA مع 3 ملليلتر من كاشف أورسينول مع الغلي لمدة 20 دقيقة ثم برد المحلول وقيست الكثافة الضوئية على الطول المـوجي 660 نانوميتر وحضر كفء الكواشف لإضافة الكاشف إلى 2 ملليلتر من الماء المقطر.

قياس تركيز البروتين:

استخدمت طريقة (Lowery *et al*., 1951) لتحديد المحتوى البروتيني لخلايا طفيليـات اللـشمانيا المعاملة وغيرالمعاملة بمشتقات البايرازولوبيريميدين باستخدام الكاشف فولن Folin ciocalteu reagent. وقد استخرج المحتوى البروتيني من المنحنى القياسي باستعمال ألبومين المصل البقـري Bovine serum albumin كمادة بروتينية قياسية وبتراكيز مختلفة (الشكل 4).



الشكل 3: المنحنى القياسي للحامض النووي الرايبوزي (RNA)



الشكل 4:المنحنى القياسي للبروتين

الكشف عن فعالية إنزيمات الأدينوسين دي أمينييز والأدينوسين كـاينيز والأدينـين فوسفورايبوسـيل ترانسفريز:

في جميع التجارب التي صممت للكشف عن فعالية إنزيمات الأدينوسـين دي أمينييـز adenosine deaminase والأدينوسين كاينيز adenosine kinase والأدينين فوسفورايبوسـيل ترانـسفريز adenine phosphoribosyl transferase تم حضن وسط التفاعل وبحجم 1 ملليلتر في حمام مائي بدرجة حـرارة 37 م لمدة 3 دقائق وقد بدأ التفاعل الإنزيمي بمجرد إضافة الإنـزيم. وقـد قـدر معـدل التغيـر فـي

الامتصاصية الناتجة عن تحويل المادة الأساس إلى المادة الناتجة باستخدام المطياف الضوئي Ultraviolet spectrophotometer على أطوال موجية مناسبة وتم التعبير عن فعالية الإنزيم بأنها عـدد نـانومولات المادة الناتجة من تحويل عدد معلوم من نانومولات المادة الأساس/وحدة الزمن (دقيقة)/ملغم بروتين. وقد اتبعت طريقة (Hassan and Coombs, 1985) مع بعض التحويرات للكشف عن الإنزيمـات المـذكورة (الجدول 1).

الجدول 1: يبين مكونات وسط التفاعل للكشف عن إنزيمات الأدينوسين دي أمينيز والأدينوسـين كـاينيز والأدينين فوسفورايبوسيل ترانسفريز باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

الإنزيم	الرقم التصنيفي	المادة الأساس *	التركيـز النهائي	الناتج	•nm(mM^{-1} cm^{-1})
أدينوسيين دي أمينيز	EC 3.5.4.4	أدينوسيين	0.05	إينوسين	265 (- 6.7)
أينوسين كاينيز	EC 2.7.1.2	أدينوسين**	0.1	AMP	340 (- 18.66)
أدينين فوسفورايبوسيل ترانسفريز	EC 2.4.2.7	أدينين***	0.1	AMP	255 (3.3)

* المحلول المنظم المستخدم هو Tris – HCl بتركيز 50 ملليمولر و pH مقدارها 7.2 .

** مكونات أخرى لوسط التفاعل : 25 ملليمولر KCl ، 0.2 ملليمولر فوسفوإينول بايروفيت، 0.2 ملليمولر NADH ، 1 ملليمولر ATP ، 0.125 وحدة pyruvate kinase ، 0.1 وحدة lactate dehydrogenase .

*** مكونات أخرى لوسط التفاعل : 5 ملليمولر $MgSO_4$ ، 1ملليمولر فوسفورايبوسيل بايروفيت (PRRP) .

• الطول الموجي (معامل االانطفاء المولاري)(Molar extinction coefficient) wave length monitered.

النتائج

تأثير مشتقات البيورين على محتوى الطور أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا الجادية على البروتين الكلي:

اتبعت الطريقة الموصى بها من قبل (Lowrey *et al*., 1951) لتقدير كمية البـروتين الكلـي فـي الطور أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا الجادية قبل وبعد معاملته بمشتقات البيورين التي أدت إلـى موتـه وبالتركيز القاتل لـ 50% من الطفيليات. يوضح الجدول (2) التغيير في كمية البروتين الكلـي للطـور أمامي السوط للشمانيا الجادية بعد معاملته بمشتقات البيورين قيد الدراسة.

تأثير مشتقات البيورين على محتوى الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية من الأحماض النووية DNA وRNA:

قدرت كمية الـ DNA وRNA في الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية المعامـل بمـشتقات البيـورين وبالتركيز الذي سبب موت 50% منه وتم مقارنة محتواه من هذين الحامضين مع العينات غير المعاملة. ويوضح الجدول (3) تاثير متناظرات البيورين المختلفة على تركيز حامض DNA مقارنة بكميتـه فـي عينة السيطرة، اما الجدول (4) فيبين كميات RNA.

الجدول 2: يبين تأثير التركيز المثبط (IC_{50}) لمشتقات البيورين على كميـة البـروتين الكلـي (مايكروغرام/10^7 خلية) في الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية *L . major* عنـد الطور اللوغاريتمي 96 ساعة.

السيطرة*	كمية البروتين **	% الكمية	% التثبيط
	55±4	100	-
APP (2) ***	44±2	80	20
HPP (3)	46±5	84	16
3-BrAPP (4)	56±3	102	-
2,4-DCBAPP (8)	56±4	102	-
APPR (10)	54±6	98	2
FoA (15)	48±2	87	13
FoB (16)	50±2	91	9
Thioformycin B (17)	39±3	71	29
3-deazaadenosine (18)	45±3	82	18
7-deazainosine (19)	46±5	84	16
Thio-7-deazainosine (20)	40±3	73	27

* السيطرة تشمل الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية غير المعاملة بمشتقات البيورين .

** كمية البروتين تمثل المعدل ± الانحراف القياسي لمكررات ثلاث .

*** الأرقام بين الاقواس تشير إلى رقم المركب المستخدم قيد الدراسة .

- لايوجد تثبيط حيث المعاملة اكثر من السيطرة

الجدول 3: يبين تأثير التركيز المثبط (IC50) لمشتقات البيورين على كمية الحامض النـووي الدي أوكسي رايبوزي DNA (مايكروغرام/10^7 خلية) للطـور أمـامي الـسوط للشمانيا الجادية *L . major* عند الطور اللوغاريتمي 96 ساعة.

السيطرة*	كمية DNA **	% الكمية	% التثبيط
	3.6±0.1	100	-
APP (2) ***	0.99±0.05	28	72
HPP (3)	o.96±0.1	27	73
3-BrAPP (4)	2.9±0.1	21	19
2,4-DCBAPP (8)	3.1±0.07	86	14
APPR (10)	1.7±0.2	47	53
FoA (15)	2.2±0.05	61	39
FoB (16)	2.1±0.04	58	42
Thioformycin B (17)	3.3±0.2	92	8
3-deazaadenosine (18)	2.15±0.01	60	40
7-deazainosine (19)	2.14±0.06	59	41
Thio-7-deazainosine (20)	3.2±0.2	89	11

* السيطرة تشمل الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية غير المعاملة بمشتقات البيورين .

** كمية الـ DNA تمثل المعدل ± الانحراف القياسي لمكررات ثلاث .

*** الأرقام بين الاقواس تشير إلى رقم المركب المستخدم قيد الدراسة .

الجدول 4: يبين تأثير التركيز المثبط (IC_{50}) على كمية الحامض النووي الرايبـوزي RNA (مايكروغرام/10^7 خلية) للطور أمامي السوط للشمانيا الجادية *major* . *L*عنـد الطور اللوغاريتمي 96 ساعة.

% التثبيط	% الكمية	كمية RNA **	السيطرة*
-	100	13.8±1	
91	9	1.3±0.1	APP (2) ***
87	13	1.8±o.1	HPP (3)
6	94	13±1	3-BrAPP (4)
4	96	13.2±2	2,4-DCBAPP (8)
2	98	13.5±1	APPR (10)
81	19	2.6±1	FoA (15)
85	15	2.1±0.2	FoB (16)
1	99	13.6±2	Thioformycin B (17)
55	45	6.2±1	3-deazaadenosine (18)
58	42	5.8±1	7-deazainosine (19)
1	99	13.6±3	Thio-7-deazainosine (20)

* السيطرة تشمل الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية غير المعاملة بمشتقات البيورين .

** كمية الـ RNA تمثل المعدل ± الانحراف القياسي لمكررات ثلاث .

*** الأرقام بين الاقواس تشير إلى رقم المركب المستخدم قيد الدراسة .

تاثير مشتقات البيورين على فعالية إنزيمات الأدينوسين دي أمينيز ADA والأدينوسـين كـاينيز AK والأدينيين فوسفورايبوسيل ترانسفريز APRT:

تم قياس نشاط إنزيمات الأدينوسين دي أمينيز والأدينوسين كاينيز والأدينين فوسفورايبوسيل ترانـسفريز في الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية قبل وبعد المعاملة بمشتقات البيورين التي أدت إلى مـوت 50% منه وبالتركيز IC_{50} . وكانت النتائج كما ملخص في الجدول (5).

المناقشة

يظهر من نتائج هذه الدراسة ان المركبين APP و HPP أظهرا انخفاضا بنسبة 20% و16%، على التوالي، بالمقارنة مع العينة غير المعاملة، وقد أظهر المركب APPR انخفاضا طفيفا (2%) فـي حـين أظهر المركبان 3-BrAPP و 2,4-DCBAPP زيادة قليلة في كمية البروتين (2%) (جدول 2). ويوضـح الجدول نفسه أن الفورمايسين A والفورمايسين B أظهرا انخفاضا قليلا في كمية البـروتين بنـسبة 13% و9%، على التوالي، في حين أدت معاملة الطور أمامي الـسوط بالثايوفورمايـسين B إل تثبـيط كميـة البروتين وبنسبة 29% بالمقارنة مع العينة غير المعاملة. كما يلاحظ من الجدول نفسه انخفاضا في كميـة البـروتين بنـسبة 18% و 16% عنـد معاملـة الطـور أمـامي الـسوط بـالمركبين 3-deazaadenosine و 7-deazainosine، على التوالي، بينما وصلت نسبة التثبيط في البروتين الكلـي إلى 27% في الطفيليات المعاملة بالمركب Thio-7-deazainosine.

تدل نتائج هذه الدراسة على وجود تباين في تأثير مناظرات البيورين المذكورة على كمية البروتين الكلية في الطفيليات المعاملة، إذ لوحظ أن كمية البروتين تقل بنسبة 2% و 29% في الطفيليات المعاملة بهذه المركبات مما يدل على أن التأثير القاتل لهذه المشتقات لا يعتمد بالأساس على البروتين الكلي وإنما على أهداف حيوية أخرى.

الجدول 5: يبين تثبيط نشاط إنزيمات الأدينوسين دي أمينيز ADA والأدينوسين كاينيز AK والأدينين فوسفورايبوسيل ترانسفريز APRT في الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية المعامل بمشتقات البيورين.

	انزيم ADA		انزيمAK		انزيمAPRT	
	فعالية الإنزيم*	% التثبيط	فعالية الإنزيم*	% التثبيط	فعالية الإنزيم*	% التثبيط
السيطرة•	15±2	-	42±3	-	18±2	-
APP (2) ••	14.4±3	4	38±2	10	2.2±0.1	88
HPP (3)	14.7±4	2	37±4	12	3.1±0.3	83
3-BrAPP (4)	15±1	NI	42±1	NI	8.1±1	55
2,4-DCBAPP (8)	15±2	NI	42±3	NI	7.2±2	60
APPR (10)	15±3	NI	14.6±1	65	18±3	NI
FoA (15)	2.7±0.1	82	3.9±0.1	91	13.4±1	26
FoB(16)	15±3	NI	5.8±1	86	14.4±1	20
Thioformycin (17)	15±1	NI	14.2±2	66	18±1	NI
3-deazaadenosine (18)	6.8±0.2	55	13±1	69	18±2	NI
7-deazaadenosine (19)	13.2±1	12	13.5±1	68	18±1	NI
Thio-7-deazainosine(20)	13.5±0.8	10	16±2	62	18±2	NI

• السيطرة تشمل الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية غير المعاملة بمشتقات البيورين .

•• الأرقام بين الاقواس تشير إلى رقم المركب المستخدم قيد الدراسة .

* فعالية الإنزيم تعني عدد نانومولات المادة الناتجة / دقيقة / ملغم بروتين وتمثل المعدل ± الانحراف القياسي لمكررات ثلاث .

NI لايوجد تثبيط

يوضح الجدول (3) أن معاملة الطفيلي بالمركبين APP و HPP أدت إلى انخفاض كبير (72% و 73%)، على التوالي، في كمية DNA في حين أدت معاملة الطفيلي بالمركب APPR إلى حصول تثبيط ملحوظ (53%) في كمية الحامض النووي، وكان لمعاملة الطفيلي بالمركبين 3-BrAPP و 2,4-DCBAPP تأثير مثبط قليل (19% و14%)، على التوالي، لمحتوى DNA مقارنة بعينة السيطرة. ويوضح الجدول نفسه أن معاملة الطور أمامي السوط بالفورمايسين A والفورمايسين B و 3-deazaadenosine و 7-deazainosine أدت إلى انخفاض قليل في كمية DNA وبدرجة متقاربة نسبيا (39% و 42% و 40% و 41%) على التوالي، في حين أظهر الفورمايسين B و Thio-7-deazainosine انخفاضا طفيفا (8% و11%) على التوالي، مقارنة بعينة السيطرة غير المعاملة.

كما يوضح الجدول (4) فقد أظهر المركبان APP و HPP انخفاضا شـديدا (91% و87%) علـى التوالي، في كمية RNA، في حين أظهرت المركبات APPR و 3-BrAPP و 2,4,-DCBAPP انخفاضـا طفيفا (2%-6%) مقارنة بالعينة غير المعاملة. وأظهر الفورمايسين A والفورمايسين B انخفاضا كبيـرا (81% و85%) على التوالي، في محتوى RNA في الطور أمـامي الـسوط، بينمـا أظهـر المركبـان 3-deazaadenosine و 7-deazainosine انخفاضا ملحوظا (55%، 58%) على التوالي، ولـم يظهـر الثايوفورمايسين B و Thio-7-deazainosine أي تأثير يذكر (1%) عند المقارنة بعينة السيطرة.

يفترض في العديد من الأنظمة البايولوجية أن قدرة المركبات المثبطة للحامض النووي DNA ناتجة عن كسر الأواصر التساهمية لمتعدد النيوكليوتيدات أو من خلال تثبيطهـا لإنـزيم DNA polymerase (Hassan et al ., 2001 ;2001 ;الجبوري، 2000 ; السعدي، Hassan and Coombs, 1988) ومـن المحتمل أن يعزى التأثير الملحوظ (39%-73%) لبعض مشتقات البيورين في كمية DNA في الطـور أمامي السوط للشمانيا الجادية في هذه الدراسة إلى أن هذه المركبات قد تعاني من عمليات حياتية لتتحـول إلى أشكالها ثلاثية الفوسفيت والتي تؤثر على إنزيم DNA polymerase فتعيق بذلك صـنع وتـضاعف DNA.

إن حصول تثبيط شديد في كمية الحامض النووي الرايبوزي RNA فـي الطـور أمـامي الـسوط للشمانيا الجادية بفعل المركبات APP و HPP و FoA و FoB يمكن ان يتخذ دلـيلا علـى تحـول هـذه المشتقات إلى شكلها ثلاثي الفوسفيت لتندمج في النهاية في الحامض النووي الرايبـوزي وتتـداخل مـع الحامض النووي الرايبوزي الرسول الذي يشفر بناء البروتين ليعيق بذلك صنع هذه الجزيئات الحيويـة، وقد تم التوصل إلى نتيجة مماثلة في الأوالي الطفيلية (Wang, 1994) إذ افترض أن المركبـات APP و HPP و FoA و FoB قد تعاني من عمليات حياتية لتتحول إلى أشكالها أحادية الفوسـفيت (APPMP و HPPMP) بفعل إنزيم الأدينين فوسفورايبوسيل ترانسفريز و(FoAMP و FoBMP) بفعل إنزيم الأدينين كاينيبز، ثم لتتحول إلى أشكالها ثنائية الفوسفيت وأخيرا إلى أشكالها ثلاثيـة الفوسـفيت بفعـل إنزيمـي الأدينوسين أحادي الفوسفيت كاينيز والأدينوسين ثنائي الفوسفيت كاينيز، على التوالي، لتندمج بعد ذلك في الحامض النووي الرايبوزي. ولكن الأدلة الأكثر إقناعا يمكن الحصول عليها من دراسة هـذه العمليـات الحياتية بدقة وعلى المستوى الجزيئي وباستخدام التقنيات الحديثة ككروماتوغرافيا الـسائل ذي الـضغط العالي.

يلاحظ من الجدول (5) أن معاملة الطور أمـامي الـسوط بالمركبـات HPP و APP و Thio-7-deazainosine و 7- deazainosine أدت إلى حصول تثبيط بسيط (2% و 4% و10% و 12%) على التوالي، في فعالية إنزيم الأدينوسين دي أمينيز مقارنة بعينة السيطرة، بينما لم يحصل تثبيط في النـشاط الإنزيمي للأدينوسين دي أمينيـز عنـد المعاملـة بالمركبـات 3-BrAPP و 2,4-DCBApp و APPR والفورمايسين B والثايوفورمايسين. في حين وصلت نسبة التثبيط في الفعالية الإنزيميـة للأدينوسـين دي

أمينيز إلى 55% عند المعاملة بالمركب 3-deazaadenosine. من ناحية أخرى فقد أدت معاملة الطور أمامي السوط بالفورمايسين A إلى حصول تثبيط عال جدا (82%) في فعالية إنزيم الأدينوسين دي أمينيز.

أما بالنسبة لإنزيم الأدينوسين كاينيز فقد لوحظ أن معاملة الطور أمامي السوط بالفورمايسين A والفورمايسين B أدت إلى تثبيط كبير في نشاط الإنزيم (91% و86%) على التوالي، بينما تراوحت نسبة التثبيط بين (62%-69%) عند المعاملة بالمركبات Thio-7-deazainosine و APPR والثايوفورمايسين و 7-deazainosine و 3-deazaadenosine. وقد أدت معاملة الطفيلي بالمركبين APP و HPP إلى حصول تثبيط بنسبة 10% و12%، على التوالي (الجدول 5)، ولم يحصل أي تثبيط يذكر في الفعالية الإنزيمية للأدينوسين كاينيز عند المعاملة بالمركبين 3-BrAPP و 2,4-DCBAPP.

ويلاحظ من الجدول نفسه أن معاملة الطفيلي بالمركبين APP و HPP أدت إلى وصول نسبة التثبيط في نشاط إنزيم الأدينين فوسفورايبوسيل ترانسفريز إلى 88% و83%، على التوالي، بينما انخفضت فعالية الإنزيم إلى 55% و60%، على التوالي، عند المعاملة بالمركبين 3-BrAPP و 2,4-DCBAPP. ولم يلاحظ أي تأثير يذكر في نشاط الإنزيم عند المعاملة بالمركبات APPR والثايوفورمايسين و 3-deazaadenosine و 7-deazainosine و Thio-7-deazainosine. وأدت المعاملة بالفورمايسين A والفورمايسين B إلى حصول تثبيط قليل (26% و 20%) على التوالي، في فعالية إنزيم الأدينين فوسفورايبوسيل ترانسفريز مقارنة بعينة السيطرة.

يظهر من نتائج هذه الدراسة أن المركبين APP و HPP قد أديا إلى تثبيط عال للفعالية الإنزيمية لإنزيم APRTase بينما كان للفورمايسين A تأثير تثبيطي شديد لفعالية إنزيم الأدينوسين دي أمينيز والأدينوسين كاينيز، وكان للفورمايسين B تأثير تثبيطي لفعالية إنزيم الأدينوسين كاينيز، الأمر الذي يقود إلى الاستنتاج أن هذه المركبات ترتبط مع الإنزيم عند الموقع الفعال إما لتنافس المادة الأساس على الأداء الوظيفي للإنزيم أو ربما قد تعزز هذه المركبات أيضا من بناء المزيد من جزيئات النيوكلبوتيدات أحادية وثنائية وثلاثية الفوسفيت وبشكل فعال. وقد ماثل تأثير هذه المركبات ضد الطور أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا الجادية في الدراسة الحالية تأثيرها الخاص ضد اللشمانيا الأحشائية (Nelson et al., 1979; Berens et al., 1984; Hassan and Coombs, 1986; Allen et al., 1989; 1995) والتريبانوسوما (Hassan and Coombs, 1988) والبلاسموديوم (Queen et al., 1988).

ومما تجدر الإشارة إليه أن عدم امتلاك بعض مشتقات البيورين فعالية تثبيطية ضد الطور أمامي السوط للشمانيا الجادية ربما يعزى إلى عدم قابلية إنزيمات مسار الإنقاذ salvage pathway في الطفيلي على تحليل واستخدام هذه المناظرات لتكوين نواتج وسطية سمية لتثبيط نمو الخلايا أو ربما إلى عدم قدرة هذه المناظرات على تثبيط فعالية الإنزيمات.

يتضح مما سبق أن الفعالية البايولوجية لبعض مناظرات البيورين ضد الطور أمامي السوط للشمانيا الجلدية في هذه الدراسة ربما ينتج عن تأثيرها على إنزيمات مسار الإنقاذ والحامض النووي الرايبـوزي مما يعطي دلالة على آلية عمل هذه المشتقات التي قد يكون لها علاقة ببناء الأحماض النووية. وقد تؤدي الدراسات الإضافية في هذا المجال سيما في الكيمياء الحياتية للأوالي الطفيلية إلى إيجـاد أمثلـة لآليـات أخرى.

المصادر العربية

الجبوري، عبد الخالق علوان محيميد، 2001. انتشار طفيليات التوكسوكارا في القطط والكلاب السائبة في تكريت مع دراسة تمهيدية للتأثير السمي لمستخلصات النباتات الطبية على حيوية وأيـض يرقـات أسكارس الكلاب. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت.

السعدي، عالية عبد المجيد عبد الله، 2000. دراسة تأثير بعض مشتقات البايرازولوبيريميديين على نمـو وأيض بعض أنواع الجراثيم موجبة وسالبة الكرام. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت.

المصادر الأجنبية

Al-Jeboori, T. and Evans, D., 1980. *Leishmania* spp. In Iraq. Electrophoretic isoenzyme pattern. Trans. R. Soc. Trop.Med. Hyg., Vol.74, pp.178-184.

Allen, T., Hensenchel, E., Coons, T., Cross, L., Conley, J. and Ullman, B., 1989. Purification and characterization of the adenine phosphoribosyltransferase and hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase activities from *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol., Vol.73, pp.133-143.

Avila, J., Poleger, M., Avila, A. and Robins, R., 1986. Action of Pyrazolopyrimidine derivatives on *Trypanosoma rangeli* culture forms. Comp. Biochem. Physiol., Vol.83, pp.291-294.

Berens, L., Marr, J., Nelson, D. and Lafon, S., 1984. Efficacy of pyrazolopyrimidine ribonucleoside against *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis., Vol.150, pp.602-608.

Berman, J., 1992. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis., Vol.24, pp.684-703.

Berman, J. and Dietz, R., 1999. Treatment of visceral leishmaniasis with Amphotericin B. Chemother., Vol.45, pp.54-66.

Blana, R., Regurea, R., Cubria, J. and Ordonez, D., 1998. The pharmacology of leishmaniasis. Gen. Pharm., Vol.30, pp.435-443.

Burton, K., 1967. Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods Enzy., XII, pp.163-166.

Chang, K. and Hendricks, L., 1985. Laboratory cultivation and maintenance of *Leishmania*. In: Leishmaniasis, Chang, K. and Bray, R. (eds.), pp.213-244. Elsevier Science Pub., Amsterdam, New York, Oxford.

Davidson, R., 1998. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. Drugs, Vol.56, pp.96-115.

Giles, K. and Mayer, A., 1965. An improved diphenylamine reagent for estimation of DNA concentration, Nature, Vol.20, pp.93.

Glew, R., Saha, A., Das, S. and Remaley, A., 1988. Biochemistry of the *Leishmania* species. Microbiol. Rev., Vol.52, pp.412-432.

Goldsmith, R.S., 1999. Infectious diseases: Protozoal and Helminthic. In: L.M. Tierne, M.A. Papadakis (eds.) Current medical diagnosis and treatment, 14th ed., pp.1353.

Hassan, H., 1993. Action of pyrazolopyrimidine derivatives on Iraqi *Leishmania* species. 1st Conf. College of Medicine, University of Tikreet, pp.31.

Hassan, H. and Coombs, G., 1985. Purine metabolizing enzymes of amastigotes and promastigotes. Exp. Parasitol., Vol.59, pp.139-150.

Hassan, H. and Coombs, G., 1986. Comparative study of the purine and pyrimidine metabolizing enzymes of range of Trypanosomatids. Comp. Biochem. Physiol., Vol.84B, pp.217-223.

Hassan, H. and Coombs, G., 1988. Purine and pyrimidine metabolism in parasitic protozoa. FEMS Microbiol., Vol.54, pp.47-54.

Hassan, H., Obeed, H. and Daoud, A., 2001. Effect of some medical plant extracts on metabolic processes of *Gallosobrachus masculutus*. J. Univ. Tikreet.

Herwaldt, B.L., 1999. Leishmaniasis. Lancet, Vol.354, pp.1191-1199.

Hide, G., Mottran, G., Coombs, G. and Holmes, H., 1997. Trypanosomiasis and leishmaniasis. Academic Press, New York.

Holory, S.V. Wynn, R.L. and Requa-Clark, B., 1988. Clinical pharmacology in dental practice, 4th ed., C.V. Mosby Com., Washington D. C, USA.

Jacob, L., 1987. Pharmacology. 2nd ed., John Willey and Sons, New York.

Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenny, R., Gam, A., Saraivia, E. and Sacks, D., 1999. The high incidience of treatment failures in Indian Kala-azar is due to the emergence of strains of *Leishmania donovani*. J. Infect. Dis., Vol.180, pp.564-567.

Lowrey, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., Vol.193, pp.265-275.

Mebrahtu, Y., Lawyer, P. and Githure, J., 1989. Visceral leishmaniasis unresponsive of pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. Amer. J. Trop. Med. Hyg., Vol.41, pp.289-294.

Nelson, D., Bugge, C., Elion, G., Berens, R. and Marr, J., 1979. Metabolism of pyrazolopyrimidine in *Leishmania braziliensis* and *L. donovani*. J. Biol. Chem., Vol.254, pp.3259-3264.

Plumer, D., 1978. An introduction to practical Biochemistry. 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., UK, Ltd. Madian Head, England, 357p.

Queen, S., Vander, D. and Reyes, P., 1988. Properties and substrate specificity of purine PRTase from human parasite, *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol., Vol.30, pp.123-134.

Ronsenblatt, J., 1999. Antiparasitic agents. Mayo Clin. Proc., Vol.74, pp.1161-1168.

Tobie, E.J., Brand, T.V. and Mehlman, B., 1950. Cultural and physiological observation on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. J. Parasitol., Vol.36, pp.48-54.

Wang, C., 1994. Parasitic enzymes as potential targets for antiparasitic chemotherapy. J. Med. Che., Vol.27, pp.1-9.