دراسة كيميائية نسجية اولية عن البروتينات والدهون والحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين في الدودة قرنفلية الرؤيس *Khawia grypi*

سندس نذير الكلاك
فرع العلوم الطبية الاساسية – كلية التمريض

زهير إبراهيم فتوحي رحيمو
قسم علوم الحياة – كلية العلوم

جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2003/11/29
تاريخ القبول 2004/9/15

ABSTRACT

In this research, a histochemical study was undertaken on a caryophyllidian , *Khawia grypi,* recently described from *Barbus grypus* .The materials detected were: protein using mercuric bromophenol blue, lipids using Sudan black B , deoxyribonucleic acid using Feulgen reaction. It is recovered from the results that protein and lipids are present in large quantities in the tegument , muscle bundles, mesenchyma and excretory canals while DNA was present in these organism in reasonable quantities, however, it was more abundant in the mesenchyma.

The reproductive organs have reacted in different levels after applying the three techniques , protein and lipids were abundant or moderate in these organs, while in cirrus pouch lipid was scarce. The gonad high content of the protein indicates the high physiological activities of these organs such as gametogenesis, supply the nutrients and metabolites transport.

الخلاصة

تناول البحث دراسة كيميائية نسجية لدودة قرنفلية الرؤيس *Khawia grypi* الموصوفة الشبوط حديثا من اسماك *Barbus grypus* .المواد التي تم الكشف عنها هي البروتينات باستعمال تقنية البروموفينول الزئبقي والدهون باستعمال تقنية اسود سودان ب والحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين باستعمال تفاعل فولكن .اتضح من النتائج وفرة المواد البروتينية والدهنية في

البشرة والحزام العضلي الفاصل والنسيج الميزنكيمي والقنوات الابرازية ، اما الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين فقد كان في هذه الاعضاء بكميات معتدلة بينما في النسيج الميزنكيمي كان وفيرا. الاعضاء التناسلية تفاعلت وبدرجات متفاوتة مع هذه التقنيات الثلاث ، كانت المواد البروتينية والدهنية وفيرة فيها ومعتدلة ماعدا كان هناك شحة في الدهن في كيس الذؤابة. ان احتواء المناسل على كميات وفيرة من البروتين دلالة على النشاطات الوظيفية للاعضاء التناسلية في عمليات تكوين الامشاج عن طريق امداد المواد الغذائية ونقل المواد الايضية.

المقدمة

تحوي المراجع القديمة والحالية العديد من البحوث المتجهة لدراسة تركيب البروتين من الناحية الكيميائية والنسجية ، فقد اشار Muthukrishnan (1) الى ان بشرة الدودة الشريطية *Taenia hydatigena* تفتقر الى البروتينات واظهرت تفاعلا سالبا تجاه تقنية mercuric bromophenol blue(M.B.B.). في حين اوضحت دراسة Gupta and Kapoor (2) بأن بشرة دودة *Cotugnia digonopora* تحتوي على بروتينات.

ذكر Kuravskaya (3) دراسة مقارنة بين المحتوى الكلي للبروتين لكل من الطور البالغ واليرقي لدودة محجمية الرؤيس *Bothriocephalus acheilognathi* اذ أشار إلى ان تركيز البروتين في الطور اليرقي يكون اكثر فيه في الطور البالغ . بينت دراسة Lucas وجماعته (4) التي اجريت للطورين البالغ واليرقي للدودة المشوكة متعددة الحجرات *Echinococcus multilocularis* عن اختلاف في البروتين الكلي. وفي دراسة كيميائية نسجية للطور اليرقي للمذنبة المسطحة للدودة *Penetrocephalus* التي أجريت من قبل (5) اذ أشاروا الى وجود الدهون في البشرة والغشاء القاعدي والعضلات الطولية الخارجية البرنكيمية والغدد الامامية لليرقة. أشارت دراسة Verneau وجماعته (6) إلى أهمية الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين أو الـ DNA في الدراسات التصنيفية وانجز Scholz وجماعته (7) دراسة مقارنة لنوعين من الديدان متغيرة الرؤيس *P. pollanicolla, Proteocephalus exiguus* وهذا فضلا عن الصفات المظهرية والقياسات البايولوجية واستنتجوا انه بالامكان الاعتماد على نوع الـ DNA في تمييز الانواع او مرادفاتها. وأجرى Mariaux (8) دراسة مشابهة والتي فيها تمكن من رسم شجرة تطويرية للديدان الشريطية اعتمادا على مواصفات الـ DNA. استهدفت الدراسة الحالية تقصي البروتينات والدهون والحامض النووي منقوص الاوكسجين في دودة

قرنفلية الرؤيس *Khawia grypi* الموصوفة حديثا من اسماك الشبوط (9) والتي تفيد في اعطاء معلومات عن مجمل الوظائف التي تحدث في هذه الدودة ، وهذه الدراسة هي امتداد لدراسة استهدفت الكاربوهيدرات (10) ، وركزت هذه الدراسة على الكشف عن البروتينات والدهون والحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين ، هذه المواد التي لم يكشف عنها سابقا في هذه الدودة.

مواد وطرائق العمل

جمعت نماذج من ديدان قرنفلية الرؤيس *Khawia* grypi الموصوفة حديثا من اسماك الشبوط Barbus grypus (9) المصطادة من نهر دجلة المار في مدينة الموصل. ثبتت المثبتات الخاصة للكشف عن البروتينات والدهون والحامض النووي منقوص الاوكسجين حسب ما وردت في (11) وبعدها طمرت بشمع البرافين ثم قطعت بسمك (7 - 5) مايكرون ومن ثم صبغت بالصبغات المتخصصة و هي -:

1. أزرق البروموفينول الزئبقي Mercuric Bromophenol Blue method (M. B. B.)
2. أسود سودان ب . Sudan Black B. (S. B. B.)
3. تفاعل فولكن . FeSulgen reaction (F. R.)

النتائج

يتضح من الجدول (1) المواد الثلاث التي تم الكشف عنها في دودة قرنفلية الرؤيس *Khawia grypi* وهي البروتينات والدهون والحامض النووي منقوص الاوكسجين ، ويتضح فيه ايضا اختلاف شدة التفاعل في مختلف تراكيب الدودة مثل البشرة والحزام العضلي الفاصل (العضلات الطولية) والنسيج الميزنكيمي والقنوات الابرازية . أما في الجدول (2) فيتضح فيه مختلف المواد التي كشف عنها في هذه الدراسة وشدة تفاعلها في مختلف تراكيب الجسم باستعمال التقنيات الخاصة بالكشف عن البروتينات والدهون والحامض النووي منقوص الاوكسجين . الجدول (3) تتضح فيه درجات التفاعل مختلف الاعضاء التناسلية الذكرية والانثوية للتقنيات المستعملة للكشف عن البروتينات والدهون والحامض النووي منقوص الاوكسجين . الشكل (1) يتبين فيه تفاعل رؤيس دودة قرنفلية الرؤيس ، والشكل (2) يبين فيه تفاعل الغدد المحية مع صبغة MMB أما الشكلان (3) و(4) فيظهران تفاعل اسود سودان ب للكشف عن الدهون في مناطق الجسم المختلفة . الشكلان (5) و (6) يظهر منها تفاعل فولكن للكشف عن الحامض

النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين والمناطق الحمراء تؤشر مناطق وجوده.

جدول (1). تفاعل البشرة والحزام العضلي والنسيج الميزنكيمى والقناة الابرازية لدودة قرنفلية الرؤيس *K. grypi* بعد تطبيق تقنيات ازرق البروموفينول الزئبقي للكشف عن البروتينات واسود سودان ب للكشف عن الدهون وتفاعل فولكن للكشف عن الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين .

الاعضاء التي اختبرت	الاختبارات الكيميائية النسجية التي اجريت		
	M.B.B	S.B.B	F.R
	البروتين	الدهون	DNA
البشرة	++++	++++	+
الحزام العضلي الفاصل(العضلاتالطولية)	++	++	++
النسيج الميزنكيمي	++++	++	+++
القناة الابرازية	+	++	+

جدول (2). تفاعل مختلف الاعضاء الجسمية بدرجات متفاوته بعد تطبيق تقنيات الكشف عن البروتينات والدهون والحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين .

(-: سالب ، + : ضعيف ، ++ : موجب ، +++ : معتدل ، ++++ :موجب شديد).

المواد المطلوب كشفها	اسم الفحص	البشرة	العضلات الطولية	النسيج الميزنكيمي	القناة الابرازية
البروتينات	Mercuricbrmophenol blue method	++++	++	++++	+
الدهون	Sudan black B	++++	++	++	++
DNA	Feulgen rection	+	++	+++	+

جدول (3).درجات تفاعل مختلف الاعضاء التناسلية الذكرية والانثوية في الدودة قرنفلية الرؤيس *K. grypi* للتقنيات الكيميائية _النسيجية الثلاث للكشف عن البروتينات والدهون والحامض النووي منقوص الاوكسجين .

الأعضاء التناسلية		ازرق البروموفينول الزئبقي (البروتين)	اسود سودان ب (دهون)	تفاعل فولجين (حامض نووي)
كيس الذؤابة		++++	-	++
الخصى		++++	+	++++
الوعاء الناقل		+	+	++
الحويصلة المنوية الداخلية		++++	+	++
القناة القاذفة		++++	+	++
الحيامن		+	+ -	++
المبيض		++++	++	++++
القناة المهبلية الرحمية مناطق الرحم UT3		++++	+	+
UT2		++++	+++	++
UT1		+	+ -	+
المهبل		++++	+	+
الغدد المحية		++++	++	+++
البيوض	UT3	++	++	+
	UT2	++	++	+
	UT1	+ -	+	+
المستودع المنوي		++++	+	+

المناقشة

البروتينات:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تفاعلا موجبا شديدا في بشرة الدودة الحالية وعلى طول امتداد الجسم. وبما ان هذه البشرة اعطت تفاعلا موجبا شديدا مع PAS كما اشير الى ذلك سابقا وعليه فان البروتينات الموجودة في بشرة الديدان الشريطية مكونة من بروتينات سكرية glycoproteins وبروتينات دهنية lipoproteins مطمورة في طبقة الدهن الثنائية bilayer lipid حسب نموذج الموزائيكي السائل mosaic fluid model لتركيب غشاء البلازما الدقيق (12-13) وهكذا فان بشرة الديدان تتكون من سكريات متعددة غير كلايكوجينية non - glycogen وسكريات متعددة مخاطية حامضية وبروتينات مرتبطة مع كميات صغيرة من الفينولات المتعددة polyphenols (14) وقد علم من المراجع العلمية الى وجود البروتين في البشرة (15).

اتضح من الدراسات ان لهذا المحتوى العالي للبروتينات في الديدان الطفيلية علاقة بغذاء المضيف ، كما تعد البروتينات من المكونات الاساسية التي تدخل في بناء جسم الكائن الحي فضلا عن تخزينها في اماكن مختلفة من الجسم (16). ولعل هذا قد يعود الى الحالة الفسلجية والعمليات الايضية الاساسية والضرورية لاصلاح السايتوبلازم ونمو خلايا جسم الطفيلي .كما أظهرت السايتونات cytones تفاعلا متباينا على طول امتداد الجسم قد يعود السبب في ذلك الى تباين قدرتها على بناء البروتين ، اذ اشار Lumsden (17) الى ان السايتونات تبني البروتينات ومن ثم تعبر من خلال الامتدادات السايتوبلازمية الى السايتوبلازم البعيد حيث تندمج مع غشاء السطح الخارجي اذ تعد البشرة طبقة حية او نسيج ايضي ، وذات فعالية حيوية تحتوي على جزء بروتيني يمتلك عددا قليلا من مجاميع disulphide و sulphydryl ومجاميع امينية حرة فضلا عن السكريات المتعددة (18) وأظهرت تحت البشرة تفاعلا في قرنفلية الرؤيس وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره (2) في حين اختلفت عن النتائج الموجبة الشديدة المشار اليها من قبل Chakravarty and Tandon (19) التي شوهدت في دودة *L. indicus* لكنها توافقت مع دودة . *D. penetrance* اما Schardein and Waitz (20) فقد وجدا تراكيز عالية من البروتين في منطقة تحت البشرة لاربعة انواع من ديدان رتبة المحجميات الدائرية عدا دودة الكلب الشريطية ، فقد لاحظا فيها تراكيز معتدلة وعندئذ قد يعود سبب هذا التباين الى استخدامهما لصبغة كشفت عن البروتين متباينة عن تقنية الدراسة الحالية ، ولربما كان السبب أيضا في اختلاف

والى تباين في حجم الخلايا وطبيعة الانسجة لكل من مجموعة القرنفليات والشريطيات الحقيقية eucestoda ، كما يعتقد ان وجود الدهون في مثل هذه التراكيب يعزى الى كونه ناتجا نهائيا للعمليات الايضية للديدان (5).

اظهر النسيج الميزنكيمي تفاعلا موجبا معتدلا وكما هو معلوم فان النسيج ميزنكيمي له القابلية على خزن الدهون ومن ثم ينتقل الى مختلف مناطق الجسم ، ولعل السبب في هذا يفسر تباين الديدان في احتوائها على كميات متباينة من الدهون نتيجة لاختلاف طبيعة النسيج الميزنكيمي وخاصة كثافته وتباين عضياته بين الديدان المختلفة . وقد اتضح من المراجع العلمية تواجد الدهون في النسيج الميزنكيمي (18) للديدان الشريطية واشار Schardein and Waitz (20) الى وجود الدهون في النسيج الميزنكيمي في دودتي المحرشفة الصغيرة و *H. taeniaeformis* ، بينما احتوت كل من المحرشفة القزماء *Hymenolepis nana* ودودة الكلب الشريطية على كميات اكبر من الدهون في النسيج البرنكيمي مقارنة بالنوعين السابقين ، ومن جانب اخر فان Sharma (25) وجد قطيرات من الدهون في الانسجة الميزنكيمية لبعض من المثقبات ، مما يدل على ان النسيج الميزنكيمي له القابلية على خزن المواد الدهنية . وبشكل عام لوحظ من نتائج الدراسة الحالية ان كمية الدهون قليلة في جسم قرنفلية الرؤيس قد يعود السبب في ذلك الى خصوصية كل نو ع من الديدان ويعتقد ان المخزون من الدهون في الطفيليات يستفاد منها لانتاج الطاقة للاعضاء المختلفة في الجسم وقسم منها تكون مرتبطة مع التفاعلات الانزيمية .(22) كما كشفت من نتائج الدراسة الحالية عن وجود المواد الدهنية في الاعضاء التناسلية وهي المناطق المتميزة ايضيا او ذات ايض فعال ، وان عمليات كهذه تحتاج الى مصادر للطاقة لانتاج كمية كافية من الخلايا الجرثومية والمح وعليه وجدت كميات من الدهون في الغدد المحية .اما المبيض فقد اظهر تفاعلا موجبا معتدلا في قرنفلية الرؤيس ، وان سبب هذا قد يعود الى اختلاف في حجم الحويصلات المبيضية وكذلك في مراحل نضج المبيض ومع ذلك فقد جاءت متوافقة مع (19،20) للديدان الشريطية المعقلة وغير المعقلة اذ ان وجود المواد الدهنية في المبيض تعد اشكالا للطاقة وربما لها دور في انتاج البيض (19) ، أظهرت الخصى تفاعلا موجبا في دودة قرنفلية الرؤيس لعل تفسير هذا التفاعل ترسب الدهون في الخصى يكون نتيجة لايض الكربوهيدرات بينما تقل كمية الدهون المفسفرة في انتاج ونضج الحيامن (31) .كما اظهرت البيض تفاعلا موجبا معتدلا في دودة قرنفلية الرؤيس قد يعود السبب الى تباين نضجها وتطورها في مناطق رحم دودة قرنفلية الرؤيس والى خصوصية نمط البيض ، ومع ذلك جاءت هذه النتيجة

متوافقة مع ما اشار اليه Pence (32) فقد لاحظ وجود قطيرات دهنية في محافظ بيض دودة الكلب الشريطية ، كما واشار الى ان وجود محافظ البيض في انسجة غنية بالدهون ربما تبطئ جفافها desiccation خارج المضيف ، اذ ان محافظ الرحم تكون محاطة تماما بخلايا محتوية على كميات كبيرة من الدهون ، وفي كل الاحوال فان التفاعلات الموجبة المعتدلة والشديدة ، جاءت متوافقة مع ما اشار اليه كل من Chakravarty and Tandon (19) في حين وجد Schardein and Waitz (20) ان اغلفة البيض سالبة التفاعل في اربعة انواع من الديدان المعقلة ولعل تباين التقنية المستخدمة في تلك الدراسة قد تفسر سبب التفاعل السالب لكل من غلاف البيضة وكيس الذؤابة بصورة عامة يمكن ان يعزى تباين كمية الدهون المفسفرة في الدراسة الحالية الى علاقة ذلك بغذاء المضيف وربما الى ايض الدهون والكربوهيدرات وعمر الطفيليات المستخدمة في الدراسة الحالية .

الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA

تبين من النتائج ان نوى خلايا انسجة جسم الدودة تحتوي على كميات من DNA ، مما يؤكد ان هذه الانسجة تمر بمراحل مختلفة من النمو والانقسام والتجدد والايض العالي للبروتين ، ولعل التباين في بنية جسم الدودة يكمن في ظهور بعض الاختلاف في كمية الـ DNA لبعض المناطق ، وعلى اية حال فقد جاءت هذه النتائج متوافقة لما ذكرته الدراسات السابقة(27,26,22) قد يعود السبب في ذلك الى الاختلاف في نسبة الكوانين :السايتوسين G: C content اذ تعد هذه النسبة صفة لكل كائن بل وبين الانواع حيث تختلف من جزيئة الى اخرى ، واشار (12) الى ان هناك تباينا في هذه النسبة بين العديد من الديدان الشريطية .وربما كان لنوع التقنية والصبغة المتبعة سببا في تباين تفاعل الـ DNAعن تلك التي اتبعت في الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Chakravarty and Tandon (19) فقد لوحظ اختلاف في شدة التفاعل بين الدراسة الحالية والدراسة المذكورة على الرغم من ان هاتين الدراستين اجريتا على ديدان غير معقلة واتبعت التقنية نفسها ولعل ذلك قد يعود الى حالة النشاط الانقسامي للدودة عند اجراء تلك الدراسة وربما يكمن السبب في درجة حيوية الانسجة.

المصادر

1.Muthukrishnan S. Acta Histochemica. Bd. 50, S.: 174. 1974.

2.Gupta N.K. and Kapoor M. Rivista Di Parassitologia,15(1/2):63, 1979.

3.Kuravskaya L. Parazitologin 27 (6): 505, 1993.

4.Lucas M.S. , Gottstein B. and Felleisen R.G. Parasite lmmunology, 20: 473,1998.

5.Chandra K.J. , Hanumantha K.R. and Shyamasundari K. Proceeding of Indian Academy of Sciences, 94(1) : 11,1985.

6.Verneau O. , Renaud F. and Catzeflis F. Molecular Biology and Evolution, 14 (6): 630, 1997.

7.Scholz T. , Hanzelova V. , Kralova I. and Griffiths D. Systematic Parasitology, 40:35,1998.

8.Mariaux J. Journal of Parasitology, 84 (1): 114,1998.

9.AL – Kalak S.N. and Rahemo Z.I.F..Submitted to Rivista di Parassitlogia.2002.

10.الكلاك ، سندس نذير ؛ ورحيمو ، زهير إبراهيم فتوحي. بحث مقدم للنشر وللمؤتمر القطري الثاني لعلوم الحياة – بغداد ، 2002.

11.Pearse A.G.E. "Histochemistry Theoretical and Applied" 4th ed., Vol. 2 , Analytical Technology. Churchill - Livingstone. Edinburgh. PP, 849. 1985.

12.Smyth J.D. and McManus D.P. The Physiology and Biochemistry of Cestodes. Cambridge University Press, pp. 1 - 22, 114 - 130, 60 - 62. 1989.

13.Mader S. "Biology". WCB McMgraw - Hill. Companres. 1998.

14.Lee D.L. The structure and composition of the helminth cuticle Edited by Dawes, B, Advances in Parasitology, 4 : 187 – 214, 1966.

15.Rothman A.H. and Elder J.E. Comparative Biochemistry and Physiology, 33 (4): 745 1970.

16.Smyth J.D. The Physiology of Cestodes. Oliver and Byod, 2nd ed.,279 pp. 1969.

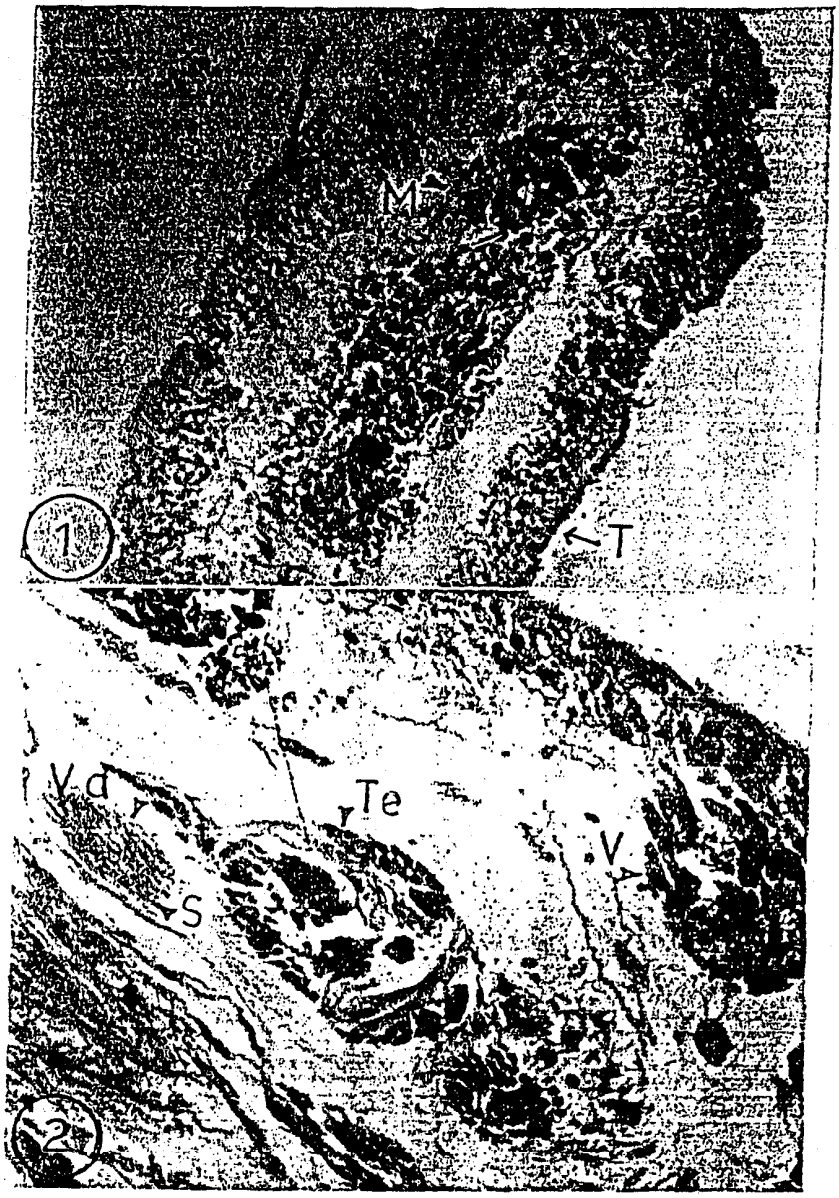
17.Lumsden R.D. Experimental Parasitology, 37: 267, 1975.

18. Howells R.E. and Erasmus D.A. Parasitology, 59: 505,1969.

19.Chakravarty R. and Tandon V. Helminthologia. 26: 259 ,1989.

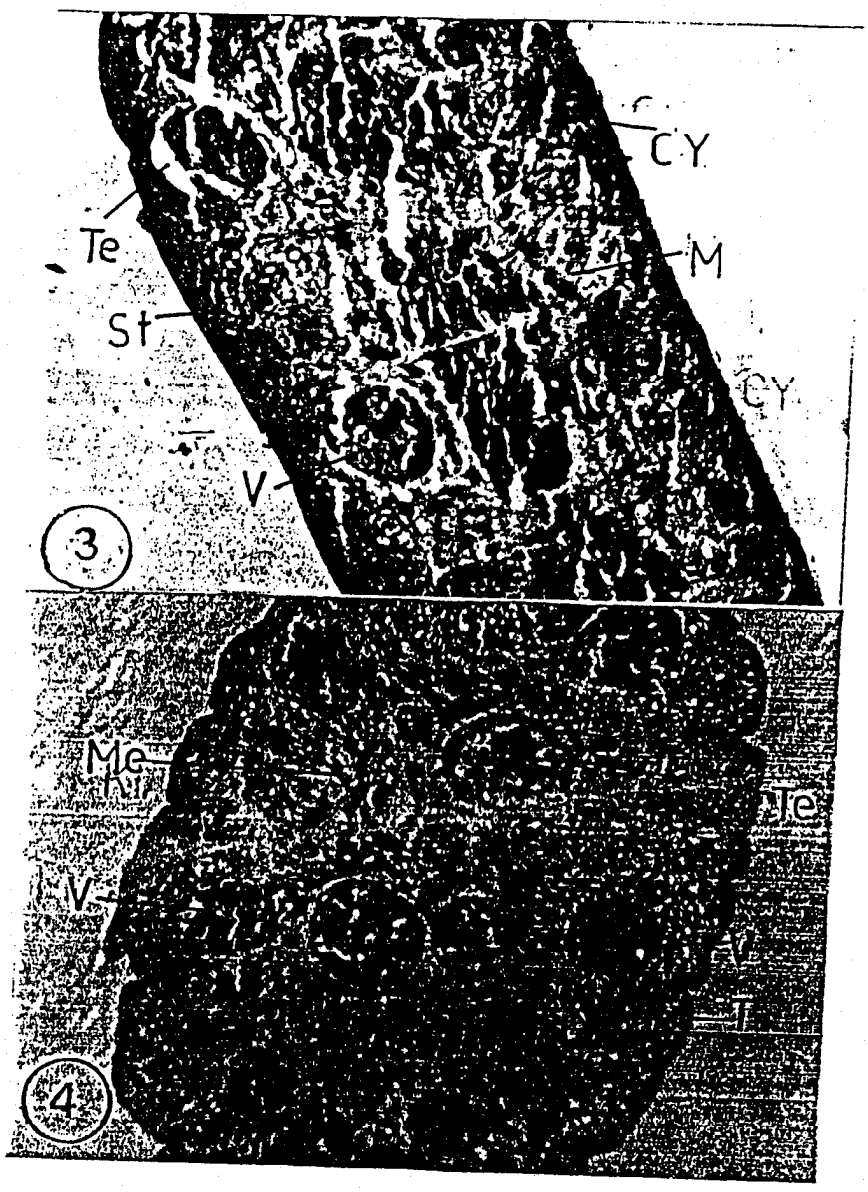
20.Schardein, J.L. and Waitz T.A. The Journal of Parasitology. 50 (2): 256 ,1964.

21.Hayunga E.G. and Mackiewicz J.S. International Journal of Parasitology, 5: 309,1975.
22.Barrett J. Biohemistry of parasitic helminths. Scientific and Medical Division, McMillan Publisher Ltd.,London and Basingstoke, 380pp.1981.
23.Malcolm K.H.J. International Journal for Parasitology, 28:913, 1998.
24.Cheng T.C. General Parasitology. Academic press. Inc., London, pp. 387 – 444, 1986.
25.Sharma P.N. Indian Journal of Experimental Biology, 17: 479,1979.
26.Mansour M.A , Kelada E.P. , Khalil A.I. and Abou Laban A.M. Proceeding Zoology A. R. Egypt.81: 27,1996.
27.Mansour M.A. , Kelada E.P. , Khalil A.I. and Abou Laban A.M. Bulletin Faculty Sciences Zagazig University, 19 (1): 300,1997.
28.Conn D.B. and Etges F. Zeitschrift fur Parasitenkunde, 70: 769,1984.
29.VonBrand T. Biochemistry of Parasites. 2nd ed. Academic Press, New york, pp.499 , 1973.
30.Waitz J.D. Journal of Parasitology, 49 (1): 37,1963.
31.Gupta B.C. , Parshad V.R. and Guraya S.S. Folia Parasitologica (Praha), 33 (20): 131,1986.
32.Pence D.B. Journal of Parasitology, 53: 1014,1967.



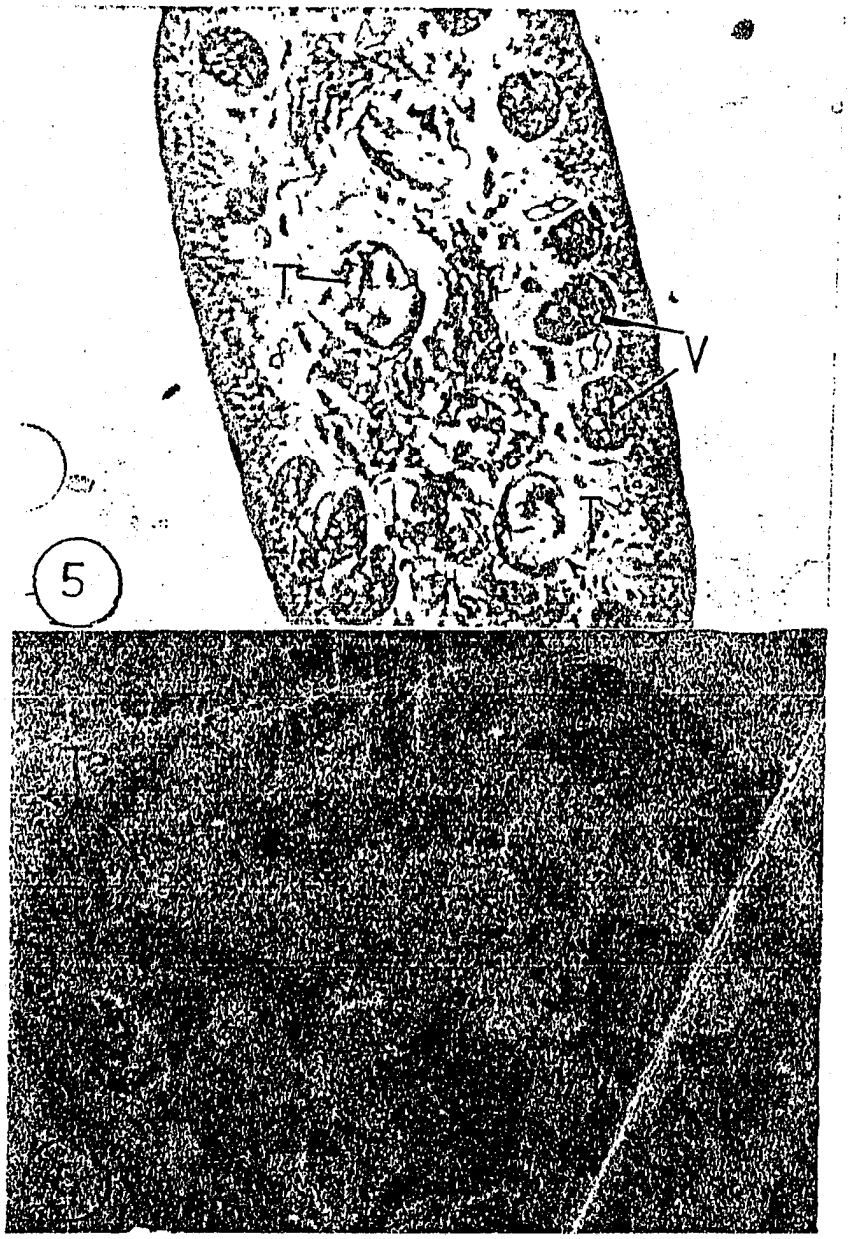
الشكل (1):مقطع عرضي لدودة قرنفلية الرؤيس *Khawia grypi* يتبين فيه البشرة (T) والعضلات الطولية (M) ، 125X تقنية ازرق البروموفينول الزئبقي .

الشكل (2):مقطع عرضي مكبر لدودة قرنفلية الرؤيس يتضح فيه الخصى (Te) والغدد المحية (V) والوعاء الناقل (Vd) والحيامن (S) ، 250 X ، تقنية ازرق البروموفينول الزئبقي.



الشكل (3):مقطع عرضي لدودة قرنفلية الرؤيس يتضح فيه السايتونات (Cy) وتحت البشرة (St) والعضلات الطولية (M) والخصى (Te) والغدد المحية (V) ، 125X تقنية أسود سودان ب.

الشكل (4):مقطع عرضي لدودة قرنفلية الرؤيس في وسط الجسم يتضح فيه البشرة (T) والغدد المحية (V) والخصى (Te) والنسيج الميزنكيمي (Me) ، 125X تقنية اسود سودان ب.



الشكل (5):مقطع عرضي لدودة قرنفلية الرؤيس في وسط الجسم يتضح فيه البشرة (T) والغـــدد المحية (V) والخصى (Te) ، 125X تقنية تفاعل فولكن.

الشكل (6):مقطع عرضي مكبر مار في خصية دودة قرنفلية الرؤيس يتضح فيه الخصيـــة (Te) ومراحل تكوين الحيامن (- -) ، 125X تقنية تفاعل فولكن.