فعالية أنزيم السايتوسين دي أمنيز في الكائن الهدبي حر المعيشة *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg,1830)

منى حسين جانكير زهراء عز الدين دلال باشي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام 26 / 03 / 2007 القبول 15 / 08 / 2007

ABSTRACT

Cytosine deaminase (EC.3.5.4.1) activity and properties was determined in the extract of the free living ciliata *Tetrahymena pyriformis* grown in proteose peptone medium.

The optimum conditions for the enzyme activity was also determined and it was found that the highest activity was obtained from the reaction mixture containing 300 µM of Tris-HCl buffer at pH 7.2 containing 3 µM of cytosine as a substrate and a concentration of enzyme extract equal to 250 µg at 35°C for 10 min.

Under the optimum conditions, the specific activity was found to be 42.23±2.3 µM of cytosine deaminated per min per mg protein in the supernatant of *Tetrahymena pyriformis* extracts compared with 20.08 ± 1.0 µM of cytosine deaminated per min per mg protein.

الخلاصة

تم التعرف على فعالية وخواص أنـزيم الـسايتوسين دي أمينيـز (EC 3.5.4.1 Cytosine deaminase) فـي مـستخلص الكـائن الابتـدائي الهـدبي *Tetrahymena pyriformis*، النامي في وسط بروتيس ببتون Proteose Peptone .

ففي هذه الدراسة تم تحديد الظروف المثالية لقياس فعالية الأنزيم، ووجـد أن أفـضل فعالية يمكن الحصول عليها في خليط التفاعل المكون من 300 مـايكرومول مـن المحلـول المنظم Tris-HCl، بدالة حامضية 7.2 والحاوي على 3 مايكرومول سايتوسين كمادة أسـاس

وكمية من المستخلص الانزيمي مساوية لـ 250 مايكروغرام، بدرجة حرارة 35°م ولمدة 10 دقيقة.

تبين تحت هذه الظروف المثالية ان الفعالية النوعية لأنزيم الـسايتوسين دي امينيـز مساوية لـ 42.23±2.3 مايكرومول من السايتوسين المزال منه الامين لكل دقيقة لكل ملغـم بروتين في الجزء الرائق من مستخلص الكائن الهـدبي *T. pyriformis* مقارنـة بالفعاليـة النوعية تحت الظروف التمهيدية مساوية لـ 20.08 ±1.0 مايكرومول من السايتوسين المزال منه الامين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين.

المقدمة

يعد الكائن الحر المعيشة التتراهايمنا بايريفورمز *Tetrahymena pyriformis* مـن الابتدائيات المهدبة، ومن الخلايا حقيقية النواة، واسعة الانتشار في مختلف أنحاء العالم(1،2)، لها القدرة على التكيف البيئي في بيئات مختلفة ومنها بيئة المياه العذبة، لذا تشكل جزءاً مهمـاً من السلسلة الغذائية في تلك البيئات (3)، وتتكيف للعديد من العوامل والظروف عند تنميتهـا في المختبر (4). للتتراهايمنا بايريفورمز استخدامات متعددة كما في الاختبارات الحيوية وفي تطبيقات التقنيات الحياتية لدراسة النظريات البايولوجية العامـة وتطبيقاتهـا عنـد المـستوى الخلوي(5)، فمثلا تستخدم في تحديد سمية عدد من المركبات ذات المنشأ الكيمياوي كالمبيدات والمعادن الثقيلة (6،7) أو البايولوجي كالسموم الفطرية Aflatoxine (8)، كما تستخدم فـي الصناعات الدوائية وفي اختبار مضادات الأورام (9). وتستخدم أيضا كدليل على تلوث البيئة المائية (10،11).

أثبتت العديد من الدراسات العلمية وجود مـسار الاورتيـت Orotate Pathway أو المسار الحقيقي للتكوين الحيوي لليوردين الأحادي الفوسفيت (UMP) من خلال سلسلة مـن التفاعلات المحفزة بأنزيمات في العديد من الكائنات الحية، وأنه مسار عام وشائع في معظـم الأحياء المجهرية والابتدائيات والطفيليات والديدان واللبـائن (12،13،14،15،16). كمـا ان هناك مسار ثاني هو المسار الإنقاذي لتكوين الـ (UMP) من القاعدة البريمدينية اليوراسـيل أو نيوكليوسيد اليوردين، والاستفادة منهما في بناء النيوكليوتيد (17)، إذ يمكن الحصول علـى اليوراسيل من تحلل الأحماض النووية أو من الغذاء وكـذلك مـن التحـولات البينيـة مـع السايتوسين (18)، ان وجود الأنزيمات المزيلة للامين Deamination مـن نيوكليوتيـدات ونيوكليوسيدات السايتوسين، يمكن تحولها إلى اليوراسيل، ومن ثم استخدامه عن طريق المسار الإنقاذي.

ان أنزيم السايتوسين دي أمينيز(Cytosine deaminase (EC 3.5.4.1 ويسمى أيضا سايتوسين أمينو هايدروليز Cytosine aminohydrolase ، الذي يحفز الإزالة الامينية بتفاعل التحلل المائي للسايتوسين ويحوله إلى اليوراسيل (19). وتكمن آلية عمل هذا الأنزيم في إضافة الماء ومن ثم فقدان الامونيا (20)، فضلا عن دور أنزيم السايتوسين دي أمينيز في التكوين الحيوي للبرميدينات بالمسار الإنقاذي ، ودوره في الايض التقويضي وعملية التنظيم الخلوي وله أهمية كبيرة في معالجة الأورام السرطانية في الإنسان (21). وهنالك العديد من الدراسات حول أنزيم السايتوسين دي أمينيز في مختلف الأحياء المجهرية والخمائر والحيوانات والإنسان (22،23،24)، ودرست فعاليته في الطفيليات كاللشمانيا الاحشائية *Leishmania donovani* واللشمانيا الجلدية *Leshmania major* (25،26) ، والمشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* (27). وتم التعرف على فعالية الأنزيم في خلايا وأنسجة وأعضاء اللبائن مثل الخلايا السرطانية وكريات الدم الحمر ومصل الدم (28،29،30). ووجد من خلال الدراسات المختلفة أن خواص الأنزيم تختلف باختلاف مصدره من ناحية تخصصه للمادة الأساس، وزنه الجزيئي، ثباتيته تجاه درجة الحرارة، واختلافات أخرى في خواصه الحركية (مثل فترة التحضين، المحلول المنظم والدالة الحامضية).

ان محور البحث الحالي يتضمن تنمية الكائن التتراهايمنا بايريفورمز على وسط Proteose Peptone ودراسة تواجد أنزيم السايتوسين دي أمينيز فيه والتعرف على فعاليته.

المواد وطرائق العمل

الكائنات المستخدمة قيد الدراسة

جمعت الابتدائيات وحيدة الخلية حرة المعيشة *Tetrahymena pyriformis* من مياه بركة مؤقتة تقع في المنخفض المحاط بسور نينوى الأثري (الذي يقع على بعد حوالي 500 متر عن جامعة الموصل)، عزلت وحفظت في وسط زرعي سائل مستخلص من نقيع التبن Hay Infusion بتركيز20 % في الحاضنة (31)، تمت تنمية التتراهايمنا في وسط Proteose Peptone (32) لغرض إدامة حيويتها والحصول على نمو جيد ونقي، ثم حضنت بدرجة حرارة27±1 °م لمدة 4-5 أيام (7)، حدد عدد الكائنات في كل مزرعة بحساب عدد التتراهايمنا باستخدام شريحة الهيموسايتوميتر Hemocytometer.

تحضير مستخلص الخلايا الخام

جمعت التتراهايمنا من الوسط الزرعي السائل، عندما كانت المزارع في الطور الثابت Stationary Phase من النمو، وبعدد 10^9x1 حيوان/ سـم^3، وذلـك بترسـيب الخلايـا باستعمال جهاز الطرد المركزي الفوقي المبرد بسرعة 3000xg لمدة 15 دقيقـة وبدرجـة حرارة 4 ْم (33). غسلت الخلايا مرتين بمحلول المنظم Tris-HCl بتركيز 200 مايكرومول وبدالة حامضية 7.4 ، وفحصت الابتدائيات التي جمعت بالمجهر الضوئي للتأكد مـن عـدم تلوثها بالبكتريا أو الفطريات. ثم علقت الخلايا المترسبة في المحلول المنظم المعنـي بحـسب التركيز المطلوب للتجارب اللاحقة. حطمت الخلايا المترسبة باستخدام جهاز الترددات فـوق الصوتية، بتسليط 24.000 ذبذبة/ ثانية لمدة 30 ثانية في حمام ثلجي، كررت هذه العمليـة أربع مرات مع فترات توقف لمدة 15 ثانية بعد كل مرة لتبريد المحلول والحفاظ على درجة حرارة 4ْم، عرض المتجانس الخام للتتراهايمنا بايريفورمزالتي جمعت فـي أثنـاء الطـور اللوغاريتمي للنمو، والمحضر سابقا، إلى عملية نبذ باستخدام جهاز الطرد المركـزي المبـرد بسرعة xg 9000 لمدة 10 دقائق. فصل المستخلص إلى ثلاثة أجزاء هي: المتجانس الخـام قبل الفصل Crude Homogenate ، الرائق Supernatant و الراسـب Pellet ، حـددت فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز في هذه الأجزاء.

قياس فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز

قيست فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز في المستخلص اعتمادا على طريقة Sakai وجماعته (24) والتي تعتمد على الاختلاف فـي الامتـصاصية للـسايتوسين وتحولـه إلـى اليوراسيل عند الطول الموجي 290 نانوميتر، إذ يتكون خليط التفاعل (بحجم نهائي1 سـم^3) من 0.4 سم^3 سايتوسين (المادة الأساس) بتركيز 3 مايكرومول، 0.4 سم^3 من المحلول المنظم بتركيز 200 مايكرومول Tris-HCl وبدالة حامضية 7.4 و 0.2 سـم^3 مـن مـستخلص الأنزيم (المحضر مسبقا). حضن خليط التفاعل بعد ذلك بدرجة حرارة 37 ْم ولمدة زمنيـة محدودة اعتماداً على نوع التجربة، وتم إيقـاف التفاعـل بإضـافة 4 سـم^3 مـن حـامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.1 عياري. ثم قيست فعالية الأنزيم باستخدام جهاز مطياف الأشـعة فوق البنفسجية والمرئية الضوئي عند الطول الموجي 290 نانوميتر، ثم قدرت الفعالية النوعية على انها كمية السايتوسين المزال منه الامين بالمايكرومول خلال دقيقة واحـدة لكـل ملغـم بروتين، باستخدام معامل الحيود المـولاري للـسايتوسين والمـساوي $0.937\ mM^{-1}.Cm^{-1}$ (34)، وقدرت كمية البروتين الكلي في المستخلص المحضر للتتراهايمنا باسـتخدام طريقـة لاوري (35).

النتائج والمناقشة

حددت فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز في أجزاء مستخلص الكائن الهدبي التتراهايمنا بايريفورمز التي تم الحصول عليها في الفقرة السابقة من المواد وطرائق العمل. يبين الجدول (1) أن أعلى فعالية نوعية لوحظت في الجزء الرائق، مقارنة مع المتجانس الخام والراسب، مما يدل على تواجد الأنزيم في السايتوبلازم، وهو مطابق لما وجد في جرثومة *S.typhimurium* و*B.subtilis* (36،37)، وفي خميرة الخبز Baker's Yeast (38)، وفي طفيلي اللشمانيا بنوعيها الاحشائية والجلدية (25)، كما يتفق مع ما توصلت إليه الباحثتان جانكير ودلال باشي (27) في دراستهما حول تواجد أنزيم السايتوسين دي أمينيز في رائق مستخلص طفيلي المشعرات المهبلية.

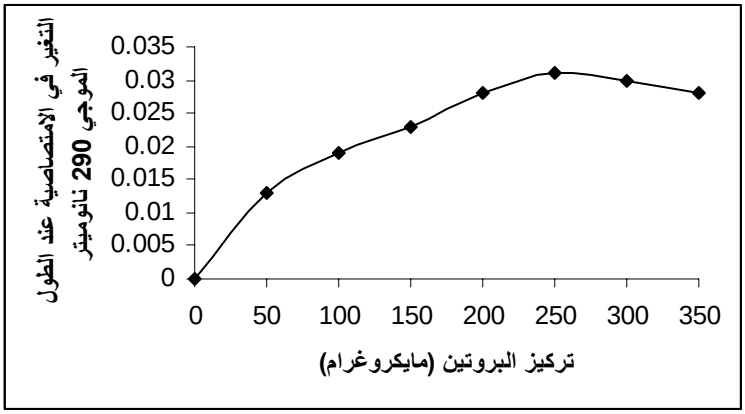
الجدول 1:

الفعالية النوعية لأنزيم السايتوسين دي أمينيز في الأجزاء المختلفة من مستخلص *T. pyriformis*

أجزاء المستخلص	* الفعالية النوعيـــة المعدل ± الخطأ لقياسي	% للفعالية	% للزيادة أوالنقصان
المتجانس الخام	1.0 ± 17.20	100	- -
الرائق	1.7 ± 30.34	176	76 +
الراسب	2.0 ± 9.35	54	46 -

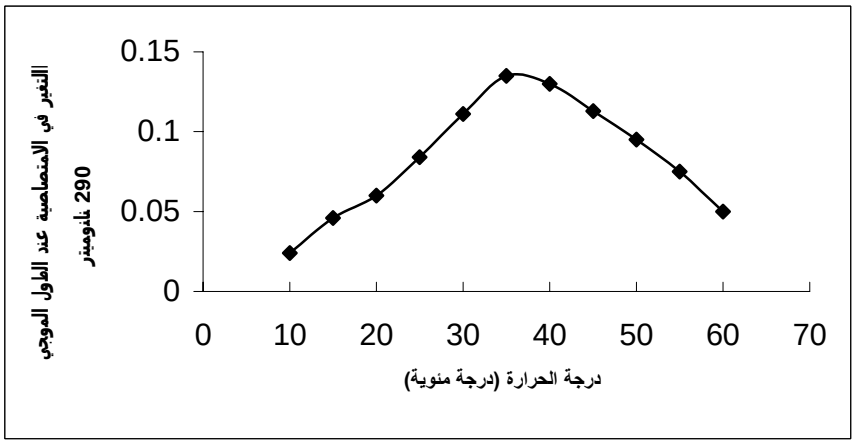
* الفعالية النوعية : مايكرومول من السايتوسين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين.
المعدل والخطأ القياسي هو لثلاثة مكررات.

تم قياس فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز بوجود تراكيز مختلفة من رائق مستخلص الكائن الهدبي التتراهايمنا بايريفورمز تراوحت ما بين 0.0-350 مايكروغرام. يبين الـشكل (1) زيادة سرعة الفعالية طرديا" بزيادة تركيز الأنزيم (البروتين)، إذ بلغت أقصى حد لها عند 250 مايكروغرام بروتين، عند ثبوت العوامل الأخرى. وهذا التركيز متطابق مع ما توصلت إليه الباحثتان جانكيرو دلال باشي (27) في طفيلي المشعرات المهبلية، وهذا يـدل علـى أن الإزالة الامينية لأنزيم السايتوسين دي أمينيز هي بفعل الأنـزيم الموجـود فـي المـستخلص الخلوي للكائن الهدبي *T. pyriformis* .



الشكل1 : كمية المستخلص البروتيني للكائن الهدبي *T. pyriformis* التي توصل التفاعل إلـى أقـصى سرعة عند استخدام تركيز (3) مايكرومول من المادة الأساس (السايتوسين)

قيست فعالية الأنزيم في درجات حرارية تراوحت بين 10-60 ْم ، يوضح الـشكل (2) العلاقة بين درجة الحرارة والتفاعل الأنزيمي. وتبين ان درجة حرارة 35 ْم هي الدرجة المثالية لعمل الأنزيم المستخلص من الكائن الهدبي *T. pyriformis* . ولوحظ أن الارتفـاع التدريجي لدرجات الحرارة يعمل على رفع نشاط الأنزيم تدريجيا حتى تصل إلى درجة 35ْم، ثم تبدأ بالانخفاض مع زيادة درجة الحرارة. لذا تم اختيار درجة 35ْم لقياس فعالية الأنزيم في جميع التجارب اللاحقة، وهذه النتائج متطابقة تقريبا مع ما توصلت إليـه الباحثتـان جـانكير ودلال باشي (27) في دراسة فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيـز فـي طفيلـي المـشعرات المهبلية، كما توصل الباحث المشهداني (25) إلـى ان الدرجـة الحراريـة المثلـى لأنـزيم السايتوسين دي أمينيز في طفيلي اللشمانيا الجلدية مساوية لـ (37)ْم.



الشكل2 : تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيزفي مستخلص الكائن الهدبي *T. pyriformis*.

يبين الجدول (2) العلاقة بين فعالية الأنزيم والمحاليل المنظمة المستخدمة، فقد وجد ان أعلى فعالية للأنزيم كان عند استخدام المحلول المنظم Tris-HCl تركيز 10 ملـي مـولار وبدالة حامضية 7.4 ، إذ كانت الفعالية النوعية مساوية لـ 40.95 ± 1.7 مايكرومول مـن السايتوسين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين. لذا استخدم المحلول المنظم Tris-HCl عند الدالة الحامضية 7.4 ، على انه أفضل المحاليل المنظمة.

الجدول2 :

تأثيرالمحاليل المنظمة المختلفة على فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز في الكائن الهدبي *T. Pyriformis*

المحلول المنظم Buffer	التركيز ملي مولار	*الفعالية النوعية المعدل ± الخطأ القياسي	% + للفعالية
Potassium Phosphate	10	2.7 ± 23.75	58
Tris-HCl	10	1.7 ± 40.95	100
Citric Acid, Sodium Citrate	10	1.0 ± 15.34	37

* الفعالية النوعية : مايكرومول من السايتوسين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين .

+ النسبة المئوية للفعالية : احتسبت على أساس ان أعلى فعالية هي 100 % .

المعدل والخطأ القياسي هو لثلاثة مكررات .

تم قياس فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز بوجود تراكيز مختلفة من المحلول المنظم Tris-HCl وبدالة حامضية 7.4 و300 مايكروغرام من المـستخلص الانزيمـي (تركيـز البروتين) والمحضن لمدة 10 دقيقة وبدرجة حرارة 35 ْم . يبين الجدول (3) أعلى فعاليـة للانزيم كان عند استخدام 40 ملي مولار من المحلول المنظم، إذ كانت الفعالية النوعية مساوية لـ 42.23 ± 2.3 مايكرومول سايتوسين المزال منه الامين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين.

الجدول 3 :

تأثير تراكيز مختلفة للمحلول المنظم Tris-HCl على فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز في الكائن الهدبي *T. pyriformis*.

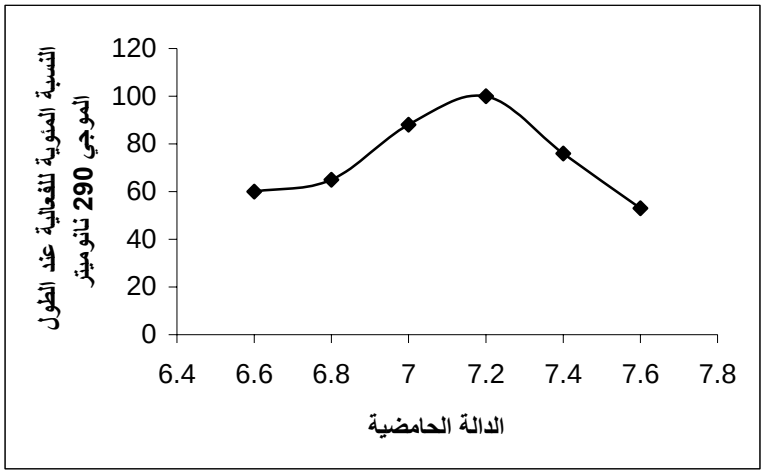
تركيز المحلول المنظم Tris-HCl (ملي مولار)	* الفعالية النوعية المعدل ± الخطأ القياسي	+ % للفعاليـــة
10	1.7 ± 40.95	97
20	1.5 ± 15.11	36
30	2.7 ± 25.97	62
40	2.3 ± 42.23	100
50	1.0 ± 22.01	52

* الفعالية النوعية : مايكرومول من السايتوسين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين .

+ النسبة المئوية للفعالية : احتسبت على أساس ان أعلى فعالية هي 100 % .

المعدل والخطأ القياسي هو لثلاثة مكررات .

ثم قيست فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز في المحلول المنظم المـذكور مـسبقا وبتركيز40 ملي مولار مع تغير الدالة الحامضية (pH) لغرض إيجاد الدالـة الحامـضية المثلى. يبين الشكل (3) تأثير الدالة الحامضية على فعالية الأنزيم، إذ يتضح من الشكل ان pH الامثل كان 7.2 .



الشكل 3 : تأثير الدالة الحامضية على فعالية أنزيم السايتوسين دي أمينيز في المحلول المنظم Tris- HCl بتركيز 40 ملي مولار .

يعد السايتوسين المادة الأساس الطبيعية لانزيم السايتوسين دي أمينيز، ومع ذلك فقـد اختيرت مركبات أخرى كمواد أساس بديلة لفعالية هذا الأنزيم، استخدم السايتوسين والثايمدين والسايتدين أحادي الفوسفيت (CMP) وبنفس التركيز 3 مايكرومول كمواد أساس بديلة عـن

السايتوسين وتحت الظروف المثالية للقياس، يوضح الجدول (4) الفعالية النوعية للانزيم تجـاه السايتوسين في حين انه لم تلاحظ اية فعالية مع السايتوسين احـادي الفوسـفيت والـسايتدين والثايمدين. وهذا بدوره يؤكد ان الأنزيم متخصص يعمل فقط عند وجـود المـادة الأسـاس السايتوسين.

الجدول 4 : الفعالية النوعية لأنزيم السايتوسين دي امنيز في مستخلص الكائن الحر الهدبي *T. pyriformis* تجاه مواد بديلة للسايتوسين كمادة أساس.

المادة الأساس بتركيز (3) مايكرومول	* الفعالية النوعية المعدل ± الخطأ القياسي	+ % للفعالية
السايتوسين Cytosine	2.3 ± 42.23	100
السايتدين أحادي الفوسفيت CMP	0.0	-
السايتدين Cytidine	0.0	-
الثايمدين Thymidine	0.0	-

* الفعالية النوعية : مايكرومول من السايتوسين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين .

+ النسبة المئوية للفعالية : احتسبت على أساس ان أعلى فعالية هي 100 % .

المعدل والخطأ القياسي هو لثلاثة مكررات .

مما سبق تم التعرف على الظروف المثالية لعمل أنزيم السايتوسين دي أمينيز في مستخلص الكائن الهدبي *T. pyriformis* ، إذ وجد ان الظروف المثالية لفعاليته تتمثـل بتركيز 40 ملي مولار من المحلول المنظم Tris-HCl بدالة حامـضية 7.2 ، وبوجـود 3 مايكرومول من السايتوسين و 250 مايكروغرام من المـستخلص الأنزيمـي (تركيـز البروتين) والمحضن لمدة 10 دقيقة في درجة حرارة 35°م ، إذ كانت الفعاليـة النوعيـة لانزيم السايتوسين دي أمينيز تحـت الظـروف التمهيديـة مـساوية لـ 20.08± 1.0 مايكرومول المزال منه الامين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين، مقارنة بالفعالية النوعية تحـت الظروف المثالية والتي أصبحت 42.23 ± 2.3 مايكرومول المزال منه الامين لكل دقيقـة لكل ملغم بروتين.

يتضح مما سبق بان للكائن الحر الهدبي *T. pyriformis* القـدرة علـى بنـاء اليوراسيل بالإزالة الامينية للسايتوسين بالمسار الإنقاذي وذلك بدلالة وجود فعاليـة أنـزيم السايتوسين دي أمينيز في مستخلص الكائن الهدبي، وبذلك تعد هذه الدراسـة أول دراسـة تؤيد بصورة مباشرة وجود هذا الأنزيم في الكائن الحر الهدبي *T. pyriformis* .

المصـادر

1. Corliss JO: The comparative systematics of species comprising the hymenostome ciliate genus *Tetrahymena.* (1970). *J. Protozool* 17:198-209.

2. Machinnon, D.L. and Hawes, R.S.J."An introduction of the study of protozoa". .(1961) Oxford, at the clarendon press. PP.275-280.

3. Carter, J.W. and Cameron,I.LToxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena pyriformis*. (1973).Wat.Res.,7: 951-961.

4. Fink,K.and Zeothen,E. Heat shock proteins in *Tetrahymena* studied under growth conditions. (1980). Exp.Cell.Res.,128: 23-30.

5. Sleigh, M.A. "Protozoa and other protests". (1989). Edward Arnold, Adivision of Hodder and Stoughton, London, pp.219.

6. Saxena, D.M., Shivaji, S. and Lal, R. Effect of DDT on DNA, RNA & Protein synthesis. (1981). In *Tetrahymena pyriformis* . Indian J.Exp.Bio., 19:568-570.

7. جانكير، منى حسين والجلبي، قصي عبد القادر. تأثير الكادميوم والنحاس والخارصـين على فترة بقاء الكائن الهدبي حر المعيـشة *Tetrahymena pyriformis*. (2000). مجلة علوم الرافدين .11(4) : 22-35.

8. Dewaart, J. Detection of bacterial and fungal toxins in food by means of biological test system. (1967). Antonie Van Leeuwen hoak J.Microbiol. Serol., 33:230.

9. Parks, R.E., Jr. "Antimetabolite studies in Tetrahymena and tumors". (1955). In C.P. Rhoads, Antimetabolites and cancer, Amer. Ass. Adv. Sci., Publ., Washington, D.C., pp. 175-197.

10. Foissner,W. Dynamics of ecology of free-living protozoa. (1990). Zool.Sci., 7:155-165.

11. Mathur, R. and Saxena, D.M. Inhibition of macromolecule synthesis in a ciliate protozoan, Tetrahymena pyriformis, by BHC isomers. (1986). Acta, Protozool. 25:397-410.

12. O'Donovan, G.A. and Neuhard, J. Pyrimidine metabolism in microorganism. (1970). Bacter. Rev., 34 : 278-343.

13. Hassan, H.F. and Coombs, G.H. Purine and Pyrimidine Metabolism in Parasitic Protozoa. (1988). F.E.M.S. Microbiol. Rev., 54 : 47-89.

14. Mathews, C.K. and Van Hold, K.E. "Biochemistry". (1990). The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. California.

15. Jones, M.E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis. (1980). Annu. Rev. Biochem., 49 : 253-279.

16. Dallal Bashi, Zahraa I. Cytosine deaminase activity in earthworm *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758). 2006.Accepted In Tikrit J.Pure Sci.

17. Martinez-Garcia, F. ; Regardera, J. ; Mayer, R. ; Sanchez, S. and Nistal, M. Protozoan infections in the male genital tract. (1996). J. Urol., 156 : 340-349.

18. AL-Chalabi, K.; Arteen, H. and AL-Khayat, B. Uridine Phosphorylase activity from Promastigote from *Leishmania*. (1993). J. Ed., and Sci., 11 : 79-92.

19. Zubay, G. (1993). "Biochemistry". 3rd ed., W.C. Brown Publishers, England.

20. Cohen, R.M. and Wolfenden, R. Cytidine deaminase from *Escherichia coli*. (1971). J. Biol. Chem., 246 (24): 7561-7565.

21. Blackburn,R.V. Adenoviral-mediated transfer of a heat in duible double suicide gene into prostate carcinoma cell. (1998) Cancer Res., 58 (7) : 1358-1362.

22. Bqyum,A.;Tennfjord,V.A.;Gran, C. ; Lqvhaug, D.; Qktedalen, O. and Brandtzaeg, P. Bioactive Cytidine Deaminase,an Inhibitor of Granulocyte-macro phage Colony-Forming cell, Is Massively Released in Fulminant Meningoc - occal Sepsis. (2000) J. Infect. Dis., 182 : 1784-1787.

23. Vita, A.; Amici, A.; Cacciamani, T.; Lanciotti, M. and Magni, G. Cytidine deaminase from *E. coli* .purification and enzymatic and molecular properties. (1985). Biochem., 24 : 6020-6024.

24. Sakai, T. ; Watan be, T. and Chibata, I. Metabolism of pyrimidine nucleotides in a microorganisms. (1971). Appl. Microbiol., 22 (6) : 1085-1090.

25. المشهداني، ثائر محمد حسن. تواجد وخواص أنزيمات مسار السايتدين في طفيليـات الليشمانيا. (2000). رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل / العراق.

26. Hassan,H.F.andCoombs,G.H. A comparative study of the purine- and pyrimidine – metabolising enzymes of a range of trypanosomatids. (1986). Comp. Bioch. Physiol., 84(2) : 217-223.

27. جانكير، منى حسين و دلال باشي، زهراء عزالدين. تواجد وخواص أنزيم السايتوسين دي أمنيز في طفيلي المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis*. (2004). مقبول للنشر في المجلة القطرية للكيمياء / العدد 15.

28. حمودات، زهراء محمد علي احمد. خواص وفعالية أنزيمي السايتوسين والـسايتدين أمينيز في دم الأصحاء والمرضى. (2001). رسالة ماجستير، كلية العلـوم، جامعـة الموصل/العراق.

29. Cui, L.; Lin, Y.Z. and Zhu, Z.G. (1998). Study on the effect of Suicidal gene of cytosine deaminase on colorectal carcinoma. Chin. J. Dig. Dis., 18: 341-343.

30. Huber, B.; Austin, E., Richards, C.; Davis, S. and Good, S. "Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: Significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase". (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

31. جانكير، منى حسين علي. ايض نيوكليوتيد الثايمين في الهـدبيات حـرة المعيـشة التتراهايمنا بايريفورمز *Tetrahymena pyriformis*. (1992). رسالة ماجـستير. كلية العلوم، جامعة الموصل /العراق.

32. Dias,N.;Mortara,R.A.and Lima, N. Morphological and Physiological Changes in *Tetrahymena pyriformis* for the invitro cytotoxicity ssessment of Triton X-100. Toxicology invitro. (2003). 17:357-366. Available at: www. elsevier.com /Locate/ toxin it.Accessed.June 14, 2005.

33. Eichler, W. Properties of purified L-Ornithine ecarboxylase (EC.4.1.1.17) from *Tetrahymena thermophila*. (1989). J.Protozool., 36: 577-582.

34. Sakai, T. ; Yu, T.S. ; Tabe, H. and Omata, S. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. (1975). Agric. Biol. Chem., 39 (8): 1623-1629.

35. Lowry, O.H.; Rosebruogh, N.J.; Farr,A.L. and R and all, R.J. Protein measurment with the folin reagent. (1951). J.Biol. Chem., 193 : 265-275.

36. Beck, C.F.; Ingraham, J.L.; Neuhard, J. and Thomassen, E. Metabolism of pyrimidines and Pyrimidine nucleosides by *Salmonella typhimurium*. (1972). J. Bact., 110 (1) : 219-228.

37. يونس، دعاء عبد المنعم. تواجد وخواص أنزيم السايتوسين دي أمينيز في بكتريا الباسلس سبتلس *Bacillus subtillis* . (1995)، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل/العراق.

38. Katsuragi, T.; Sonoda, T.; Matsumoto,K.;Sakai, T. and Tonomura, K. Purification and some properties of cytosine deaminase from Baker's. (1989). Yeast.Agric.Biol.Chem.,53(5):1313-1319.