------ مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد8، خاص بعلوم الحياة، ص 50-62، 2005-----

تواجد وخواص أنزيم السايتدين دي أمنيز في طفيلي المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis*

زهراء عزالدين دلال باشي منى حسين جانكير

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2004/4/25 ، تاريخ القبول 2004/8/16)

الملخص

تناولت الدراسة التعرف على فعالية وخواص أنزيم السايتدين دي أمينيز (Cytidine deaminase EC 3.5.4.5) في مستخلص طفيلي المشعرات المهبلية *Trichomanas vaginalis* النامية في وسط دايموند.

كما تم تحديد الظروف المثالية لقياس فعالية الأنزيم، ووجد ان أفضل فعالية تم الحصول عليها في خليط التفاعل الذي يتكون من (400) مايكرومول من المحلول المنظم (Tris-HCl Buffer) ذي الأس الهيدروجيني (7.2) والحاوي على (7) ملي مولار سايتدين كمادة أساس وكمية من الأنزيم تتراوح ما بين (200-250) مايكروغرام من مستخلص الأنزيم .بدرجة حرارة (37) درجة مئوية ولمدة (10) دقيقة. تحت هذه الظروف المثالية تبين ان الفعالية النوعية لأنزيم السايتدين دي أمينيز مساوية لـ (17.5) مايكرومول من السايتدين المزال منه الأمين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين في الجزء الرائق من مستخلص خلايا طفيلي المشعرات .كما بينت نتائج دراسةخواص أنزيم السايتدين دي أمينيزانه من الممكن ان يكون السايتدين أحادي الفوسفيت (CMP)كمادة أساس بديلة لفعالية الانزيم.

Presence and Properties of Cytidine Deaminase Enzyme in *Trichomonas vaginalis*

Muna H. Janker **Zahra I. Dallal Bashi**
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The investigation indicated the presence and the properties of cytidine deaminase(EC.3.5.4.5) activity in extract of the parasite *Trichomonas vaginalis* grown in Diamond's TYM medium.

The optimum conditions for the enzyme activity was determined and enzyme activity was obtained in a reaction mixture of (400)µM of Tris-HCl buffer at pH (7.2) containing (7) mM of cytidine as a substrate and an amount of the enzyme ranging from (200-250)µg of the enzyme extract, and an incubation period of (10) min. at (37)°C.

Under the optimum conditions, the specific activity was found to be (17.5) mM of cytidine deaminated per min/ mg protein in the supernatant of *Trichomonas vaginalis* extracts.

the investigated Results of the properties of the cytidine deaminase activity showed that cytidine monophosphatet(CMP)might function as alternative substrate for enzyme activity.

المقدمة

يعد طفيلي المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* من الابتدائيات المسوطة واسعة الانتشار في مختلف انحاء العالم يستوطن هذا الطفيلي في المسالك البولية التناسلية genito-urinarytract لكلا الجنسين ويكون ممرضاً لها (Benchimol et al., 2000).

يعد انزيم السايتدين دي أمينيز من الأنزيمات المهمة في مجال المعالجة الكيمياوية، وذلك من خلال معالجة مرض السرطان عن طريق الاستفادة من خاصية نزع مجاميع الامين من بعض المركبات الكيمياوية (القواعد المفلورة) مثل 5 – فلوروديوكسي سايتدين (5- Fluorodeoxycytidine) وتحوله الى الشكل الفعال من 5 – فلوروديوكسي يوردين (5- Fluorodeoxyuridine) الذي يلعب دوراً مهماً في مجال المعالجة الكيمياوية لهذا المرض (Blackburn, 1998).

تتوافر العديد من الدراسات حول هذا اللانزيم في مختلف الاحياء المجهرية، والخمائر والنباتات والحيوانات والانسان. (Sakai et al., 1971; Bqyum et al., 2000; Madigan et al., 2000) اذ تمت دراسة فعالية هذا الانزيم في الابتدائيات الطفيلية، وقد اشار (Kidder,1984) إلى وجود فعالية هذا الانزيم في المثقبيات *T.cruzi* و *Crithidia fasciculata*، ودرست فعاليته في اللشمانيا الاحشائية والجادية

Leishmania donovani , Leshmania major (المشهداني، 2000 ؛ Hassan and Coombs, 1986) وتمت دراسة فعالية انزيم السايتدين دي أمينيز في عدد من اللبائن وفي عضـلات وقـلب وكبـد ومعـدة الانسان (Eliopoulos et al., 1998; Bqyum et al., 2000). كما تمت دراسته في مصل ومتحلل كريات الدم الحمرللانسان (حمودات، 2001). وجد من خلال الدراسات المختلفة ان خواص الانزيم تختلف في الكائنات الحية، باختلاف مصدر الانزيم من ناحية تخصصه للمادة الاساس، ووزنه الجزيئي، وثباتيته تجاه درجة الحرارة ووجد اختلاف اخر في خواصهِ الحركية.

ان محور البحث الحالي يتضمن تنمية الطفيلي على وسط دايموند ودراسة تواجد وخواص انزيم السايتدين دي أمينيز فيه، وتحديد تاثير عدد من المركبات الكيمياوية على فعاليته.

المواد وطرائق العمل

الوسط المستخدم لتنمية الكائنات

تم عزل طفيليات المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* من مسحات مهبلية ونميت في وسط دايموند (Diamonds' TYM medium) (Diamond, 1957)، مكونات هذا الوسط لـ(100)سم^3 هي:

وسط مرق تريبتون صويا	Trypton Soya broth (Trypticase)	gm 2.0
خلاصة الخميرة	Yeast extract	gm 1.0
D- مالتوز	D- maltose	gm 0.5
L- هيدروكلوريد السستين	Cystein hydrochloride – L	gm 0.1
حامض الاسكوربيك	ascorbic acid – L	gm 0.02
اكار	Agar	gm 0.05

اذيبت مكونات الوسط المذكور أعلاه في الماء المقطر، وعدل الاس الهيدروجيني (pH) الى (6.2)، ثم وزع الوسط بواقع (5)سم^3 في قناني زجاجية معقمةسعة (30)سم^3، ثم عقم الوسط في المعقام (Autoclave) بدرجة حرارة (121) درجة مئوية وتحت ضغط (1) جو ولمدة (15) دقيقة (Kulda et al., 1993) برد الوسط الى درجة (56) درجة مئوية تقريباً، وتحت ظروف معقمة، اضيف (10)سم^3 من مصل الانسان المثبط والمضادات الحيوية لمنع نموالجراثيم والفطريات (الحيالي، 2001) وحفظ في الثلاجة بدرجة (4) درجةمئويةلحين الاستعمال (Levi et al., 1997).

تحضير مستخلص الخلايا الخام

جمعـت طفيليـات المـشعرات المهبليـة *Trichomonas vaginalis* عنـدما تكـون المـزارع بالطورااللوغاريتمي من النمو، أي بعدد (3-5 ×10^6) خلية/سم^3(Tachezy et al.,1993)، وذلك باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقي المبرد من نوع (MSE-High Speed 18) بسرعة (3000xg) لمـدة (10) دقيقة وبدرجة حرارة (4) درجة مئوية (Terkuile et al., 2000)، تم غـسل الخلايـا مـرتين بمحلـول (Phosphate buffer saline) (Rasoloson et al., 2001) وفحصت الطفيليات التي جمعـت بـالمجهر الضوئي للتأكد من عدم تلوثها بالبكتريا او الفطريات. ثم علقت الخلايا المترسبة فـي المحلـول المـنظم المعني بحسب التركيز المطلوب للتجارب اللاحقة. حطمت الخلايا المترسبة باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية (Ultra-sonic disintegrater)، بتسليط (20.000) ذبذبة/ثانيـة (Am pu dance/ sec) لمـدة (30) ثانية في حمام ثلجي، كررت هذه العملية ثمان مرات مع فترات توقف لمدة (5) دقائق بعد كل فترة لتبريد المحلول والحفاظ على درجة حرارة (4) درجة مئوية(Rasolson et al., 2001)، عرض المتجانس الخام لخلايا طفيلي المشعرات المهبلية التي جمعت في أثناء الطور اللوغاريتمي للنمو، والمحضر سـابقا، إلى عملية نبذ باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة (18000 xg) لمـدة (45) دقيقـة. فـصل المستخلص إلى ثلاثة أجزاء هي:المتجانس الخام قبل الفصل أو المجنس(Crude homogenate)، والرائق (Supernatant)، والراسب (Pellet). حددت فعاليـة أنـزيم الـسايتدين دي أمينيزفـي هـذه الأجـزاء (Vincenzo and Thomas, 1977).

قياس فعالية انزيم السايتدين دي أمينيز

قيست فعالية انزيم السايتدين دي أمينيز بطريقة (المشهداني، 2000; Sakai et al., 1975) والتي تعتمد على الاختلاف في الامتصاصية للسايتدين وتحوله الى اليوردين عند الطول الموجي (290) نانوميتر. يتكون خليط التفاعل من :

3 cytidine micromole (كمادة اساس)

200 micromole Tris-HCl Buffer, pH =7.4

مزجت مع كمية محددة من مستخلص الانزيم. حضن خليط التفاعل بعد ذلك بدرجة حرارة (37) درجة مئوية، ولمدة زمنية محدودة اعتماداً على نوع التجربة، واوقف التفاعل باضافة(4) سم^3 من (0.1) عياري من محلول حامض الهيدروكلوريك (HCl) وتم قياس فعالية الانزيم باستخدام جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية الضوئي (Ultraviolet / visible spectrophotometer) من نوع (Cecil CE 1021) عند الطول الموجي (290 نانوميتر)، قدرت الفعالية النوعية على انها كمية السايتدين المزال منه الامين بالمايكرومول خلال دقيقة واحدة لكل ملغم بروتين. باستخدام معامل الحيود المولاري للسايتدين

والمساوي($2.2mM^{-1}.Cm^{-1}$) (المشهداني، 2000)، وقدرت كمية البروتين الكلي في المستخلص المحضر للمشعرات باستخدام طريقة لاوري (Lowry et al., 1951).

النتائج والمناقشة

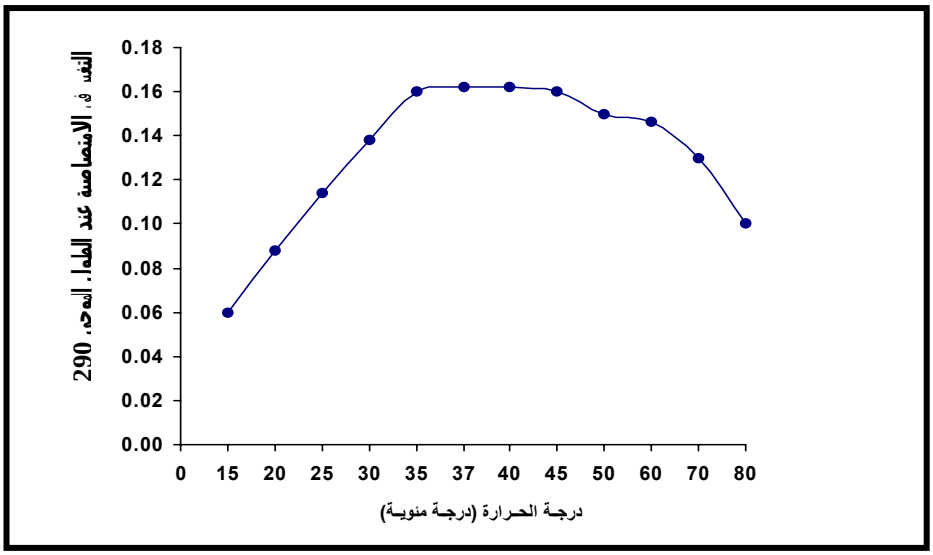
حددت فعالية انزيم السايتدين دي أمينيز في أجزاء المستخلص التي تم الحصول عليها في الفقرة السابقة من المواد وطرائق العمل. يوضح الجدول (1) أن أعلى فعالية نوعية لوحظت في الجزءالرائق ، مقارنة مع المتجانس الخام والراسب ، ممايدل على تواجدالأنزيم في السايتوبلازم ، وتطابق هذه النتيجة ماوجدفي طفيلي التريبانوسوما *Trypanosoma* وطفيلي الكريثديا *Crathidia* (Kidder, 1984; Hassan and Coombs, 1986) وطفيلي اللشمانيا بنوعيها الجلدية والاحشائية (المشهداني، 2000).

الجدول1: فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في الأجزاء المختلفة مـن خلايـا طفيلـي المـشعرات المهبلية *T. vaginalis*

الأجـــزاء	* الفعالية النوعيـــة المعدل ± الخطأ القياسي	النسبة المئوية للفعالية
المجنس Crude homogenate	0.64 ± 3.18	100
الرائق Supernatant	2.56 ± 12.88	405
الراسب Pellet	0.22 ± 1.08	35

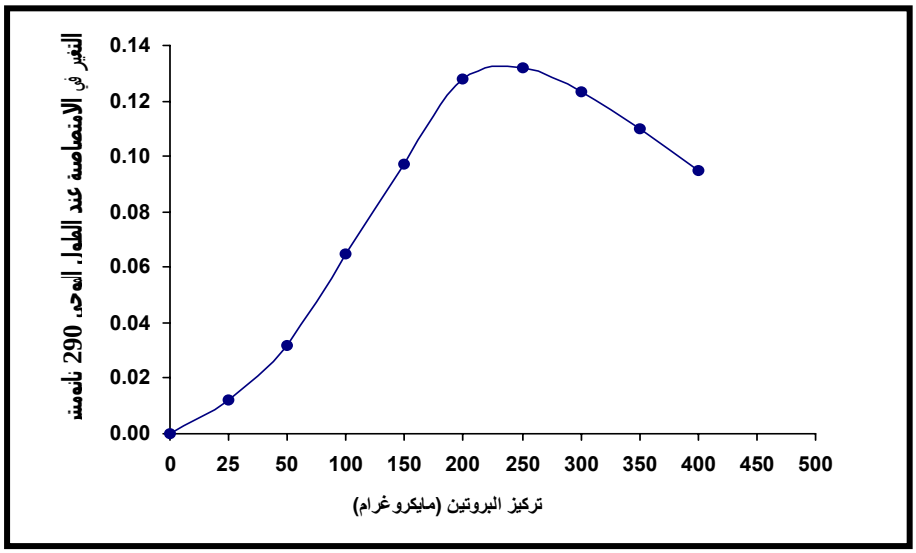
*الفعالية النوعية : مايكروموول من السايتدين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين.
المعدل والخطأ القياسي هو لثلاثة مكررات.

قيست فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز عند مدى من درجات الحرارة المختلفة، يبين الشكل (1) العلاقة بين درجة الحرارة والتفاعل الأنزيمي. وتبين ان الارتفاع التدريجي لدرجات الحرارة يعمل على رفع نشاط الأنزيم تدريجيا حتى تصل درجة الحرارة إلى (45) درجة مئوية، ثم تبدأ فعالية الأنزيم بالانخفاض عندرفع درجة الحرارة، ويلاحظ ان زيادة الفعالية بين درجة حرارة (35–45) درجة مئوية تكون محدودة، لذا تم اختيار درجة حرارة (37) درجة مئوية لقياس فعالية الأنزيم في جميع التجارب اللاحقة. وهذه النتائج مقاربة لدرجة الحرارة المثلى لأنزيم السايتدين دي أمينيز في طفيلي *Entamoeba histolytica* والتي كانت مساوية لـ(37) درجةمئوية. اما في طفيلي اللشمانيا الجلدية *L. major* فقد كانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم مساوية لـ(35) درجة مئوية(Hassan and Al-Chalabi, 1993)



الشكل 1: تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في طفيلي المشعرات المهبلية *T. vaginalis*.

قيست فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز بوجود تراكيز مختلفة من رائق مستخلص خلايا طفيلي المشعرات المهبلية تراوحت ما بين(25– 400) مايكروغرام. يبين الشكل (2) العلاقة بين فعالية الأنزيم وكمية البروتين الموجودة في الرائق، ويتضح أنه عند ثبوت العوامل الأخرى، تزداد سرعة التفاعل الأنزيمي طرديا بزيادة تركيز الأنزيم (البروتين) حتى تصل الى أقصى حد لها عند تركيز (250) مايكروغرام بروتين.



الشكل 2 : تأثير التراكيز المختلفة من مستخلص الأنزيم (البروتين) على فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في طفيلي المشعرات المهبلية *T. vaginalis*.

يبين الجدول (2) العلاقة بين فعالية الأنزيم والتراكيز المختلفة من المحاليل المنظمة، فقد وجد ان أعلى فعالية للأنزيم كانت في حالة استخدام تركيز (400) مايكرومول من المحلول المنظم (Tris-HCl Buffer)، إذ كانت الفعالية النوعية مساوية لـ(16.66 ± 0.20) مايكرومول سايتدين المزال منه الأمين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين، وتركيز(500) مايكرومول من المحلول المنظم (Potassium Phosphate Buffer) فقد كانت الفعالية النوعية مساوية لـ(6.97 ± 0.27).

الجدول 2: تأثير التراكيز المختلفة للمحاليل المنظمة على فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في طفيلي المشعرات المهبلية *T. vaginalis*.

المحلول المنظم Buffer	تركيز المحلول المنظم مايكرومول	* الفعالية النوعية المعدل ± الخطأ القياسي	+ النسبة المئوية للفعاليـ ـة
HCl – Tris	100	1.48 ± 7.57	45
	200	1.01 ± 13.99	84
	400	0.20 ± 16.66	100
	600	0.47 ± 15.46	93
	800	0.47 ± 13.12	79
	1000	0.52 ± 10.91	65
Potassium Phosphate K_2HPO_4 KH_2PO_4	100	0.26 ± 2.34	34
	500	0.27 ± 6.97	100
	1000	0.13 ± 1.30	19

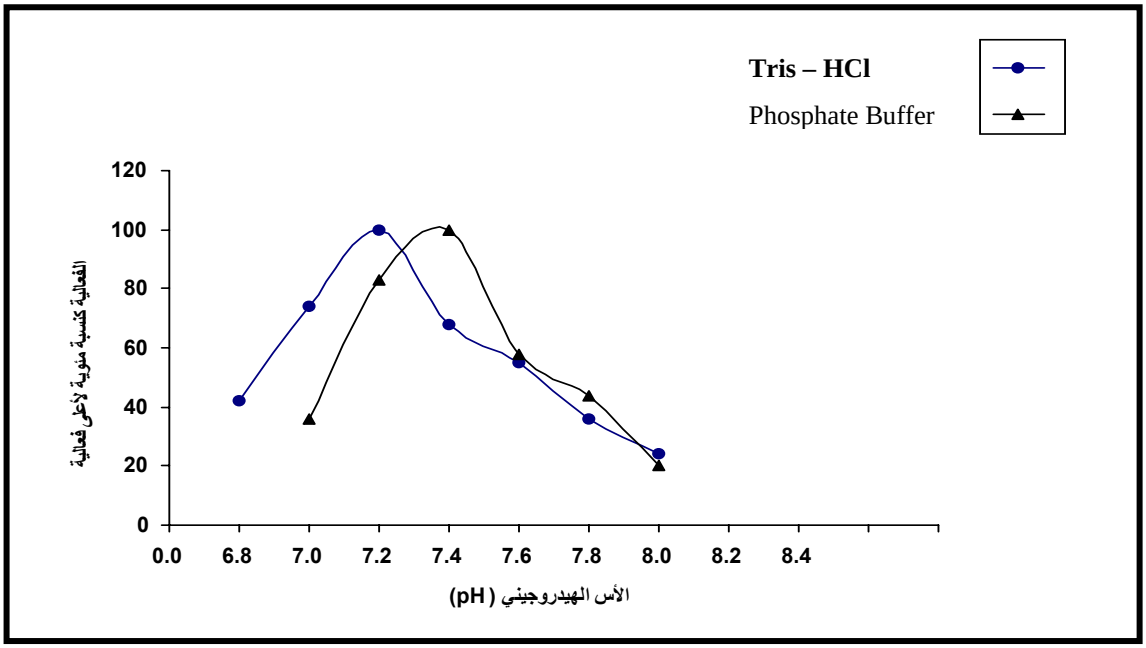
* الفعالية النوعية : مايكرومول من السايتدين المزال منه الأمين / دقيقة / ملغم بروتين .

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

المعدل والخطأ القياسي هو لثلاثة مكررات .

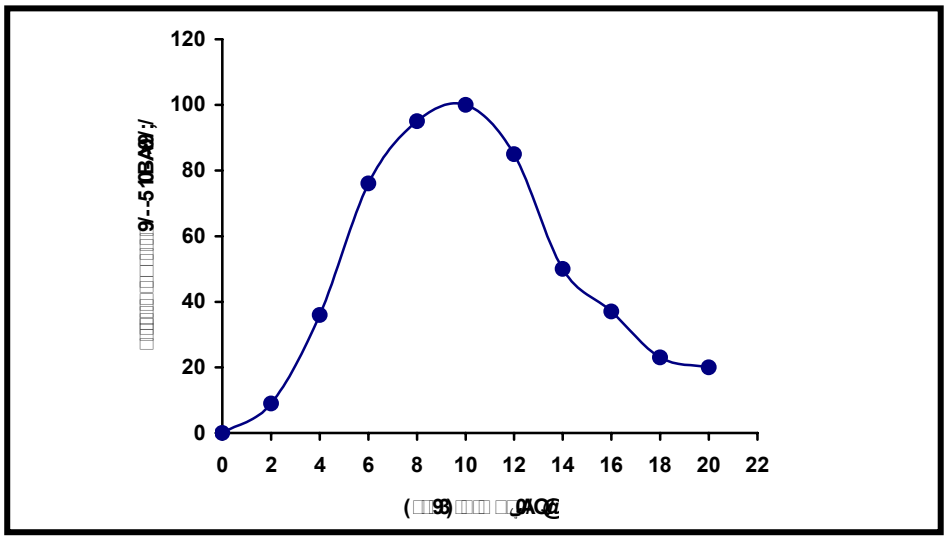
قيست فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في المحاليل المنظمة المستخدمة في الفقرة السابقة وبتراكيزها المثلى وبتغير الأس الهيدروجيني (pH) لغرض ايجاد الأس الهيدروجيني الأمثل لكل محلول منظم. يبين الشكل (3) تأثير الأس الهيدروجيني (pH) على فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في المحلول المنظم(Tris-HCl Buffer) والمحلول المنظم (Potassium Phosphate Buffer). ويتضح من الشكل ان الأس الهيدروجيني الأمثل كان (7.2) لـ (Tris-HCl) و(7.4) لـ (Potassium Phasphate). ومن ملاحظة هذه القيم وجد ان مدى الأس الهيدروجيني الملائم لفعالية الأنزيم في جميع المحاليل المنظمة المذكورة في أعلاه يقع بين (7.2-7.4) وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Hassan and Al-Chalabi, 1993)، إذ تم قياس فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في طفيلي *Entamoeba histolytica* عند أس هيدروجيني مساولـ(7.2)، بينما وجد ان أفضل فعالية لأنزيم السايتدين دي أمينيز في جرثومة السالمونيلا *S. Typhimurium* كانت عند أس هيدروجيني مساو لـ(7.3) باستخدام المحلول المنظم

(Tris-HCl Buffer)(Beck et al., 1972)، وأفضل فعالية للأنزيم في طفيلي التريبانوسوما كانت عند أس هيدروجيني مساوٍ لـ(7.4) في المحلول المنظم (Tris-HCl Buffer)(Hassan and Coombs, 1986) وفي طفيليات اللشمانيا كانت أعلى فعالية للأنزيم في المحلول المنظم (Tris-HCl Buffer)عند أس هيدروجيني مساو لـ (7.4) (المشهداني، 2000).



الشكل 3: تأثير الأس الهيدروجيني على فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في مختلف المحاليل المنظمة ذات التركيز الأمثل.

يوضح الشكل (4) العلاقة بين فعالية الأنزيم وفترة التحضين (زمن التفاعل) المختلفة التي تتراوح ما بين (0 – 20) دقيقة. يبين الشكل (4) تقدم الفعالية الأنزيمية وبصورة خطية إلى حدود (10) دقيقة ومن ثم تبدأ هذه الفعالية الأنزيمية بالانخفاض عند زيادة فترة التحضين وهذه النتيجة مطابقة مع ما توصل إليه كل من (Tomchick et al., 1968) من ان مدة (10) دقيقة تمثل مدة التحضين المثلى لخليط التفاعل الأنزيمي في اللبائن .



الشكل 4: العلاقة بين فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز وفترات التحضين المختلفة.

قيست فعالية الانزيم في خليط التفاعل المتكون من (400) مايكرومول من المحلول المنظم (Tris-HCl Buffer) ذي الأس الهيدروجيني (7.2) والذي يحتوي على تراكيز مختلفة من السايتدين تتراوح بين (0 – 10) ملي مولار وبتركيز ثابت من البروتين، ويوضح الشكل (5) تأثير التراكيز المختلفة للمادة الأساس السايتدين على سرعة التفاعل المحفز بأنزيم السايتدين دي أمينيز عند بقاء تركيز البروتين ثابتا، إذ وجد ان التراكيز الواطئة تؤدي إلى زيادة في سرعة التفاعل وتكون متناسبة مع تركيز المادة الأساس، في حين ان زيادة تركيز المادة الأساس يعمل على زيادة سرعة التفاعل حتى تصل إلى نقطة لا يحدث بعدها أية زيادة في سرعة التفاعل بسبب حدوث تشويه في طبيعة الانزيم (Denaturation) وفقدان فعاليته. وبذلك يمكن تحديد تركيز المادة الأساس اللازمة لحصول السرعة القصوى، وباستخدام رسم لاينويفر- برك، وجد ان ثابت ميكيلس – منتون (Km) للسايتدين يساوي (1.88×10^{-3}M) وكما هو موضح في الشكل (6). ولا تتطابق هذه النتيجة مع ما أشاراليه (المشهداني، 2000) إلى ان قيمة (Km) للسايتدين مساوية لـ (2.7×10^{-5} M) في طفيلي اللشمانيا الجلدية. أما في اللبائن فقد كانت قيمة الـ(Km) مساوية لـ (7.53×10^{-5} M) عند قياس فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في الفئران (Tomchick et al.,1968).

الشكل 5: تأثيرتركيزمادة الاساس السايتدين على سرعة التفاعل المحفز بانزيم السايتدين دي أمنيزفي طفيلي المشعرات المهبلية *T.vaginalis*.

الشكل 6: رسم لاينويفر ـ برك يوضح قيمة ثابت ميكيلس ـ منتون للمادة الاساس السايتدين.

ان السايتدين هو المادة الأساس الطبيعية لأنزيم السايتدين دي أمينيز ومع ذلك فقد اختبرت مركبات أخرى كمواد أساس بديلة لفعالية هذا الأنزيم. استخدم السايتدين أحادي الفوسفيت (CMP) والسايتوسين (Cytosine) والثايمدين (Thymidine) وبنفس التركيز(7) ملي مولار كمواد أساس بديلة عن السايتدين وتحت الظروف المثالية للقياس. لقد وجد في الجدول (3) والذي يوضح فعالية الأنزيم تجاه المواد الأساس المختلفة ان السايتدين أحادي الفوسفيت أقل كفاءة من المادة الأساس الأصلية (السايتدين) حيث كانت الفعالية النوعية للأنزيم مع السايتدين كمادة أساس مساوية لـ(16.36 ± 0.45) بينما كانت الفعالية النوعية للسايتدين أحادي الفوسفيت كمادة أساس مساوية لـ(8.63 ± 0.60)، بينما لم تلاحظ أية فعالية مع السايتوسين والثايمدين. مما سبق تم التعرف على الظروف المثالية لعمل الأنزيم في طفيلي المشعرات المهبلية، إذ وجد ان الظروف المثالية لفعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز تتمثل بتركيز(400) مايكرومول من المحاول المنظم (Tris-HCl Buffer) ذي الأس الهيدروجيني(7.2) وان أفضل تركيز للسايتدين هو (7) ملي مولار وأفضل تركيز للبروتين (المستخاص الأنزيمي) هو(200-250) مايكروغرام، وان مدة التحضين المثالية هي(10) دقيقة وبدرجة حرارة(37) درجة مئوية وكانت الفعالية النوعية لأنزيم السايتدين دي أمينيز تحت الظروف التمهيدية مساوية لـ(8.18) مايكرومول من السايتدين المزال منه الأمين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين مقارنة بالفعالية النوعية تحت الظروف المثالية والتي اصبحت مساوية لـ(17.5) مايكرومول من السايتدين المزال منه الأمين لكل دقيقة لكل ملغم بروتين.

الجدول 3: فعالية أنزيم السايتدين دي أمينيز في طفيلي المشعرات المهبلية *T.vaginalis* تجاه المواد الأساس البديلة.

المادة الاساس	* الفعالية النوعية المعدل ± الخطأ القياسي	+ النسبة المئوية للفعالية
السايتدين Cytidine	0.45 ± 16.36	100
السايتدين أحادي الفوسفيت CMP	0.60 ± 8.63	53
سايتوسين Cytosine	0.0	-
ثايمدين Thymidine	0.0	-

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

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

المعدل والخطأ القياسي هو لثلاثة مكررات .

المصادر العربية

الحيالي، فرح محمد غزال، 2001. التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية لعدد من النباتات الطبية في نمو طفيلي المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* في الزجاج *In vitro*، رسالة ماجستير، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المشهداني، ثائر محمد حسن، 2000. تواجد وخواص أنزيمات مسار السايتدين في طفيليات الليشمانيا، رسالة ماجستير، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل.

حمودات، زهراء محمد علي احمد، 2001. خواص وفعالية أنزيمي السايتوسين والسايتدين دي أمينيز في دم الأصحاء والمرضى، رسالة ماجستير قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الاجنبية

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

Benchimol, M., Diniz, J.A.P. and Riberio, K., 2000. The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. Tissue and Cell.,32(2): pp.178-187.

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

Bqyum, A., Tennfjord, V.A., Gran, C., Lqvhaug, D., Qktedalen, O. and Brandtzaeg, P., 2000. Bioactive cytidine deaminase, an Inhibitor of Granulocyte-Macrophage Colony-Forming cell, Is Massively Released in Fulminant Meningococcal Sepsis. J. Infect. Dis., 182: pp.1784-1787.

Diamond, L.S., 1957. The establishment of various trichomonads of animals in axenic cultures. J. Parasitol., 43: pp.488-490.

Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Le, N.L.O., Momparler, L.F., Greenbaum, M., Letourneau, S., Cournoyer, D. and Momparler, R.L., 1998. Retroviral transfer and long-term expression of human cytidine deaminase cDNA in hematopoietic cells following transplantation in mice.Gen.Thera.,5: pp.1545-1551

Hassan, H.F. and Al-Chalabi, K., 1993. Pyrimidine Salvage enzyme in *Entamoeba histolytica*. Mu. J. Res. St., 8 (5): pp.199-208.

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

Kidder, G.W., 1984. Characteristics of cytidine aminohydrolase activity in *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. J. Protozool., 31 (2): pp.298-300.

Kulda, J., Tachezy, J. and Cerkasovova, A., 1993. In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. J. Euk. Micrbiol., 40 (3) : pp.262-269.

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

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Rasoloson, D.; Tomkova, E.; Cammack, R.; Kulda, J. and Tachezy, J., 2001. Metronidazole- resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. Parasitol., 123: pp.45-56.

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

Sakai, T.; Yu, T.S. and Omata, S., 1976. Distribution of enzymes related to cytidine degradation in Bacteria. Agric. Biol. Chem., 40 (9): pp.1893-1895.

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

Tachezy, J.; Kulda, J. and Tomkova, E., 1993. Aerobic resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole induced *in vitro*. Parasitol., 106: pp.31-37.

Terkuile, B.H.; Hrdy, I.; Sanchez, L.B. and Muller, M., 2000. Purification and specificity of two α-glucosidase isoforms of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. J. Eukaryot. Microbiol., 47(5): pp. 440-442.

Tomchick, R.; Saslaw, L.D. and Waravdekar, V.S., 1968. Mouse Kidney cytidine deaminase Purification and Properties. J. Bio. Chem., 243 (10): pp.2534-2537.

Vincenzo, P. and Thomas, A., 1977. General purification schemes for restriction endonuclease. In.Methods in Enzymology.(Ed. By Lawrence, K.and Kivie,M.) 65: Part (1), Section (III). Pub. Grossman, Moldave on (III).