تقدير الفعالية النوعية لبعض الانزيمات في مستخلص الدودة الكبدية العملاقة *fasciola gigantic*

شيماء عبيد مصطفى العكيدي   محمد صلاح الدين الصالحي

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية قياس الفعالية النوعية لعدد من الأنزيمات باستخدام الطرق الكيميائية الحيوية ، والتي بلغت لإنزيم الأدينوسين دي أمينيز 1.66 ± 0.1 نانومول/ دقيقة/ ملغم من البروتين، ولإنزيم الاسيتايل كولين استيريز 194.35 ± 0.98 مايكرومول/ دقيقة/ غم من الوزن الطري، والكلوتاثيون –S– ترانسفيريز 45.95 ± 0.27 مايكرومول/ دقيقة/ ملغم من البروتينز .

Abstract:

This study includes an estimating of the specific activity of the number of enzymes was measured as 1.66 ± 0.1 *n* mol/ min/ mg of protein for adenosine deaminase, 194.35 ± 0.98 µ mol/ min/ gm of wet weight for acetylcholinesterase, and glutathione -s- transferase, 45.95 ± 0.72 µ mol/ min/ mg of protein

المقدمة

تعد الأنزيمات مواد بروتينية مساعدة على زيادة سرعة التفاعلات الكيميائية الحيوية داخل الخلية وتشترك جميع الأنزيمات في الخواص التركيبية والوظيفية بغض النظر عن التفاعل الذي تحفزهُ، جميع الأنزيمات مواد بروتينية التركيب تحتوي على المواقع الفعالة ذات شكل هندسي محدد وثابت (Wilson and Walker, 2000 ؛ Pratt and Cornely, 2004; Garrett and Grisham, 2002 ؛ جندل، 2007a). ولها دوراً مهماً في العمليات الحياتية في الطفيليات كالأيض وإنتاج الطاقة والنمو والتطور خلال دورة الحياة (Humiczewska and Rajski, 2005). كما تعمل أيضاً على تحليل انسجة المضيف ليسهل اختراقهُ من قبل الطفيلي أثناء هجرتهِ وانتقالهِ بين أجهزةِ المضيف (McKerrow and Salter, 2002; ; Salter *et al.*, 2000). ولها دور في عملية هضم المواد الغذائية (Choubisa, 2008; Collins *et al.*, 2004)، وتلعب دوراً هاماً في النشاط العضلي – العصبي وبالتالي حركة وانتقال الديدان الطفيلية (Ghani *et al.*, Stewart *et al.*, ; 2003 Mair *et al.*, 2000 ;2008). كما تعد الأنزيمات هدفاً تثبطهُ بعض الأدوية المضادة للطفيليات من خلال توقف عمل الإنزيم مما يؤدي إلى السيطرة على نمو الطفيلي داخل المضيفِ (Alvarez *et al.*, 2007).

يعمل انزيم الاديونوسين دي أمينيز (ADA, E.C. 2.5.4.4) على تحفيز تفاعل الإزالة الأمينية غير العكسية للأدينوسين و 2- أدينوسين منقوص الأوكسجين إلى الاينوسين و 2- اينوسين منقوص الاوكسجين على التوالي مع تحرير الامونيا (الجلبي، 1991 .(Saboury *et al.*, 2003;

يقع هذا الإنزيم في مسار معقد للايض التقويضي لنيوكليوتيد البيورين الذي ينتهي بتكون حامض اليوريك (Poursharifi *et al.*, 2009) وهناك علاقة وثيقة الصلة بين الإنزيم والجهاز المناعي، حيث يوجد بشكل رئيس في الخلايا اللمفاوية Lymphocyte .(Jalilfar *et al.*, 2009)

لاحظ الداؤدي (2006) وجود فروقات معنوية في مستوى الفعالية النوعية لإنزيم ADA بين أنواع المُذنبات المدروسة، إذ بلغ أعلى مستوى للفعالية 4.90±0.26 نانومول/ دقيقة/ ملغم بروتين في المذنبة أحادية الممص. وأقل مستوى للفعالية النوعية وجد في المذنبة عارية الرأس 2.60± 0.10 نانومول/ دقيقة/ ملغم بروتين.

يقوم انزيم الاسيتايل كولين استيريز (AchE, E. C. 3.1.1.7) بتحليل الناقل العصبي الاسيتايل كولين إلى الكولين Choline وحامض الخليك Acetic acid، في مواقع الاشتباك العصبي Synapses والنهايات العصبية الحركية (Tiwari *et al.*, 2005). تشمل انزيمات الكولين استيريز مجموعتين من الانزيمات الأول الإنزيم المحلل للكولين (AchE) الذي يعمل على تحليل الاسيتايل كولين إلى كولين وحامض الخليك (Dzik, 2006)، أما الثاني فهو الإنزيم المحلل البيوتريل كولين يسمى Butyrylcholin esterase (BuchE). إن زيادة تركيز المادة الأساس (الاسيتايل كولين) فوق الإشباع يؤدي إلى تثبيط عمل الإنزيم AchE، في حين زيادة تركيز مادة البيوتريل كولين لا يؤثر على عمل (BuchE) (Wilson and Henderson, 1992).

ويعد الكلوتاثيون -s- ترانسفيريز (GST, E.C. 2.5.1.18) من الإنزيمات النازعة للسموم Detoxification يُحفز المركبات الكيميائية المحبة للإلكترون Electrophilic على الاقتران Conjugation مع الكلوتاثيون المختزل (GSH) وتحويلها إلى مركبات ذائبة في الماء (Deghiedy *et al.*, 2008; Liebau *et al.* 1997), يُعد انزيم الـ GST من الإنزيمات ذات الوظائف المتعددة Multifunctions ، فهو يلعب دوراً فسلجياً في إزالة السمية Detoxifing للمركبات الكيميائية الغريبة الداخلية والخارجية، ويعمل على إزالة نواتج بيروكسيد الدهون ونواتج أيض السموم (Farid *et* Hamed, 2006; Kang *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2000; *al.*, 2009; Degheidy and Shalaby, 2010). كما أنهُ يُساهم في تطوير المقاومة ضد مبيدات الحشرات ومضادات الجراثيم والديدان فضلاً عن المقاومة ضد عدد من الأدوية (Liebau *et al.*, 1997؛ Tafreshi *et al.*, 2009)، ويساعد على تجنب الآليات الدفاعية للمضيف. يوجد الإنزيم في جميع الخلايا الحقيقية النواة Eukaryotes وبشكل واسع في الديدان الطفيلية، ويقسم إلى ثلاثة أصناف رئيسة هي (Pi, Mu, Alpha). (Liebau *et al.*, 1997) .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Samples collection:

جُمعِت 100 عينة من أكباد الجواميس المصابة بالديدان والمذبوحة في مناطق متفرقة من مدينة الموصل وذلك من شهر تموز إلى آذار. فُتحِت القنوات الصفراوية لهذه الأكباد واستخرجت الديدان منها، وُضِعَتْ في قناني بلاستيكية حاوية على محلول ملحي فسلجي ومن ثم نُقِلت إلى المختبر وغُسِلَتْ عدة مرات بمحلول ملحي ثم فُحِصَت باستخدام مجهر التشريح. اظهر الفحص أنَّ جميع العينات المستحصل عليها كانت من نوع *F. gigantica* ، واختيرت العينات السليمة منها .

3.3. تحضير العينات Preparation of samples:

3.3.1. تحضير العينات للدراسة الكيميائية الحيوية:-

Preparation of sample for biochemical study

بعد أن غُسِلَتْ الديدان عدة مرات بالمحلول الفسلجي، وُضِعَتْ بين ورقتي ترشيح لتنشيفها ثم وزن 0.5 غم من الديدان وسحقت بجهاز المتجانس الكهربائي Homogenizer عند سرعة 1500 دورة / دقيقة في 5 سم^3 من المحلول المنظم Triss-sucrose buffer (20 ملغم من السكروز و650 ملغم من مادة الترس تذاب في 20 سم^3 من الماء المقطر وتضبط الدالة الحامضية ثم يكمل الحجم إلى 100 سم^3) ذي دالة حامضية pH7.2 أجريت عملية السحق في حمام ثلجي لمنع ارتفاع درجة حرارة المتجانس والتي تؤدي إلى تلف النسيج، ثم أكمل السحق باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic بتردد 12000 ذبذبة / ثانية لمدة 30 ثانية وباستخدام حمام ثلجي، إذ كُرِرَت هذه العملية أربع مرات مع فترة توقف لمدة 5 دقائق وذلك لأجل الحفاظ على درجة حرارة منخفضة لمستخلص الدودة الكبدية العملاقة. ثم تم الفصل باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد (في كلية التمريض) بسرعة 10000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق بدرجة 4°م. فصل المحلول إلى جزأين الرائق للأعلى والراسب أسفل الأنبوب ثم سُحِب الجزء الرائق ووُضِع في أنابيب اختبار واستخدم لاحقا في الدراسة الكيميائية الحيوية.

تقدير فعالية إنزيم الادينوسين دي امينيز :-

Estimation of adenosine deaninase activity (ADA) :-

قُدِّرَت فعالية إنزيم (ADA) حسب الطريقة المتبعة من قبل الداؤدي(2006)

3.4.6. تقدير فعالية أنزيم الاسيتايل كولين استريز في مستخلص الدودة الكبدية العملاقة:

Estimation of acetylcholin esterase activity in *F. gigantica* extraction :

قُدِّرَت فعالية إنزيم الأسيتايل كولين استريز (AchE) حسب طريقة المذكورة لدى الداؤدي(2006)

. تقدير فعالية إنزيم الكلوتاثيون –S– ترانسفيريز:-

.Determination of glutathione –s– transferase activity (GST)

تم تقدير مستوى فعالية انزيم كلوتاثيون –S– ترانسفيريز (GST)حسب طريقة الواردة في (Khynriam and Prasad , 2003) .

النتائج والمناقشة

جدول (1):

الفعالية النوعية للإنزيمات ADA و AchE و LDH و GST في دودة الـ *F. gigantica*

الأنزيمات	الفعالية النوعية	الوحدة
ADA	0.1 ± 1.66	نانو مول / دقيقة / ملغم من البروتين
AchE	0.98 ± 194.35	مايكرو مول/ دقيقة/ غم من الوزن الطري
GST	0.27 ± 45.95	مايكرو مول/ دقيقة/ ملغم من البروتين

4 فعالية إنزيم الادينوسين دي أمينيز (ADA)

يشير الجدول (1) إلى الفعالية النوعية لإنزيم ADA والتي بلغت 1.66 ± 0.1 نانومول/دقيقة/ملغم بروتين في الديدان الكبدية العملاقة، وقد أشار الداؤدي (2006) إلى الفعالية النوعية لإنزيم ADA والتي بلغت 2.60 ± 0.10 نانومول/دقيقة/ملغم بروتين في المُذنبة عارية الرأس.

يُعدّ هذا الإنزيم من الإنزيمات المتخصصة بالإزالة الأمينية في سلسلة تقويض نيوكليوتيدات البيورين (الجلبي، 1991). وهنالك أدلة تُشير إلى دور الإنزيم في عملية تنظيم النمو والتمايز الخلوي (Franco and

Centellis, 1989) ، وهذا قد يُفسر الاختلاف في فعالية الإنزيم بين الديدان الكبدية العملاقة والمذنبة عارية الرأس، أو ربما يعود السبب إلى تأثير بعض المعادن كالخارصين والنحاس والزئبق وغيرها على فعالية الإنزيم، إذ أن وجود مثل هذه المعادن في البيئة أو غذاء الطفيلي يؤدي إلى كبح فعالية الإنزيم (Ali, 2008). أو قد يعود سبب التباين في فعالية الإنزيم في الديدان الكبدية العملاقة إلى كونها كاملة النمو أي لا تعاني خلاياها أي انقسام، وهذا ما أكدهُ الدليمي (2005)، حين لاحظ وجود علاقة ما بين فعالية الإنزيم ودورة الخلية، حيث أن الإنزيم المستخلص من الديدان الكبدية العملاقة الفتية أدى إلى تطور الخلايا اللمفاوية وتكوين الاورمات الليفية (أي تحفيز قدرتها على الانقسام) في الوسط الزرعي على العكس من الانزيم المستخلص من البالغات أدى انخفاض كبير في قدرة الخلايا على الانقسام.

2.5.1.4. فعالية إنزيم الأسيتايل كولين استيريز (AchE)

يُبين الجدول (1) ، فعالية انزيم AchE وقد بلغت 194.35 ± 0.98 مايكروغرام/ دقيقة/غم من الوزن الطري في الديدان الكبدية العملاقة، بينما أشار الداؤدي (2006) إلى أن فعالية هذا الإنزيم قد بلغت 50.05 ± 2.87 مايكرومول/دقيقة/غم من الوزن الطري للمذنبة عارية الرأس، وإن هذا التباين في الفعالية ربما يعود إلى عدم اكتمال تكوين الجهاز العصبي، وللتأكد من أن فعالية هذا الإنزيم أكثر في الديدان البالغة من يرقاتها فقد ذكر Moor و Helton (1976) انعدام الفرق المعنوي في فعالية انزيم (AchE) وفي مناطق تواجده ما بين الديدان الكبدية الفتية والبالغة.

إن لإنزيم AchE دوراً مهماً في الآلية الحركية في الطفيليات، إذ يوجد في النهايات الحركية أي نقاط الاتصال الفسلجي بين نهايات المحاور العصبية مع الألياف العضلية (Hazdai *et al.*, 1999; Arnon *et al.*, 1999) حيث يوجد الإنزيم في الجليد والبلعوم والأعضاء التناسلية كالذؤابة وكيس الذؤابة (Proberta and Durranil, 1977)، ويوجد أيضاً في المحاجم والعقد العصبية (محمد، 1990) إن الموصلات العصبية Cholinergic تسيطر على الوظائف الحيوية مثل التغذية والنمو والتكاثر والتطور (Arafa *et al.*, 2002) ومن الناحية الفسلجية فإن المُذنبات غير نامية أو متطورة بشكل جيد مقارنةً بالبالغات (Robarts and Janovy, 2005)، وهذا السبب يفسر الفرق في فعالية الإنزيم في المُذنبات كما وجد في هذه الدراسة.

فعالية إنزيم الكلوتاثيون –s– ترانفسيريز (GST)

قُدِّرَتْ الفعالية النوعية لإنزيم (GST) بـ 45.95 ± 0.27 مايكرومول/دقيقة/ملغم من البروتين، وكما مبين في الجدول (1) . في حين ذكر الداؤدي (2006) أن الفعالية النوعية لإنزيم GST في مذنبة عارية الرأس بلغت 69.93 ± 3.93 مايكرومول/دقيقة/ملغم من البروتين، وقد أشار كل من (Kang *et al.*, 2001) و (Degheidy *et al.*, 2008) و (Farid *et al.*, 2009) و (Degheidy and Shalaby, 2010) إلى دور إنزيم GST في عملية نزع السموم من جسم الطفيلي وذلك من خلال تحويل المركبات الكارهة للماء إلى مركبات محبة للماء ليسهل طرحها إلى خارج الجسم وبهذه الطريقة يتمكن الطفيلي من طرح النواتج الأيضية السامة(Hamed, 2006). كما أن للآلية نفسها دور في تقليل تأثير العقاقير والمبيدات المتواجدة في البيئة المحيطة

بالطفيلي (Tafershi *et al.*, 2009; Liebau *et al.*, 1997) وبهذه الآلية يستطيع الطفيلي أن يتغلب على السموم الداخلة إلى جسمه ويستمر في نموهِ. بما أن المُذنبات أسرع حركة من البالغات لذا فهي تستهلك طاقة أكبر وهذا الاستهلاك للطاقة يؤدي إلى تراكم نواتج أيضية في انسجتها أكثر مما في أنسجة البالغات، ولعل هذا سبباً يفسر الفرق في الفعالية النوعية لإنزيم GST في الدراسة الحالية عن دراسة الداؤدي (2006)، والتي أدت إلى ارتفاع فعالية إنزيم GST في المذنبات لأجل التخلص من النواتج الأيضية السامة.

المصادر

أولاً: المصادر العربية

الجلبي، قصي عبدالقادر (1991). الأحماض النووية. مطبعة جامعة الموصل، جامعة الموصل.

جندل، جاسم محمد (2007). كيمياء الأنزيمات. تكريت، مطبعة جامعة تكريت.

الداؤدي، أحمد عقيل خضير يونس (2006). دراسة بايولوجية وكيموحيوية مقارنة لعدد من المذنبات. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

الدليمي، جواد كاظم علي (2005). دراسة وبائية ومناعية لطفيلي *Fasciola gigantica* بين الأبقار في محافظة بابل. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.

محمد، محمد صلاح الدين عبدالفرج (1990). دراسة الأجهزة العصبية لبعض طفيليات ثنائية المنشأ. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

ثانياً: المصادر الأجنبية

1. Ali, E. M. M. (2008). *Fasciola gigantica*: purification and characterization of adenosine deaminase. Exp. Parasitol., 119(2): 285-290.
2. Alvarez, L.I.; Mottier, M. L. and Lanusse, C. E. (2007). Drug transfer into target helminth parasites. Tren. Parasitol., 23(3): 97-104.
3. Arafa, S. Z.; Reda, E. S. and El-Nagger, M. M. (2002). Cholinergic component of the nervous system of the digenea parasites, *Haplorchoid*

cahirinus and *Acanthostomum absconditum* from catfish *Bagrus bayad* in Egypt. Acta. Parasitol., 47: 272-279.

4. Arnon, R.; Silman, I. and Hazdai, R. T. (1999). Acetylcholinesterase of *Schistosoma mansoni* functional correlates. Pro. Sci., 8: 2553-2561.
5. Choubisa, S. L. (2008). Mode of nutrition in pathogenic trematode larvae (Redia and Cercaria) which infect hepatopancreas of fresh water snails (Mollusca: Gastropoda). J. Arasit. Dise., 32(1):68-73.
6. Collins, P. R.; Strack, C. M.; O'Neill, S. M.; Doyle, S.; Ryan, T.; Brennan, G. P. ; Mousley, A. ; Stewart, M. ; Maule, A. G. ; Dalton, J. P. and Donnelly, S. (2004). Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence. J. Biolog. Chem., 279(17): 17038-17046.
7. Degheidy, N. S. and Shalaby, H. A. (2010). Scanning electron microscopic observation of adult *Fasciola gigantica* after immunizati with glutathione -s-transferase in goats. Res. J. Parasitol., 5(2): 79-89.
8. Deghiedy, N. S.; Awad, W. S.; Shalaby, H. A.; Ghazy, A. A. and Abdel Hamid, A. F. (2008). Evaluation of some *Fasciola gigantica* antigens as vaccines against fasciolosis in goats. Glo. Veter., 2(4):169-174.
9. Dzik, J. M. (2006). Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. Acta. Biochim. Polon., 53(1): 33-64.
10. Farid, N. M. ; Hamed, R. R. and Shokeer, A. G. (2009). Glutathione and its related enzymes in Fasciola snails (*Lymnaea natal*ensis): purification and characterization of glutathione -s- transferase. Res. J. Agricul. Biolog. Sci., 5(4): 317-325.
11. Franco, R. and Centellis, J. J. (1989). Adenosine deaminase inhibitors as therapeutic agents. Dru. Tod., 25: 155-170.
12. Garrett, R. H. and Grisham, C. M. (2002). "Principles of Biochemistry With A Human Focus". Harcourt, Inc. USA.
13. Ghani, S. ; Ghani, Z. and Abidi, S. M. A. (2008). Immunocytochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine and localization of monoamine oxidase in *Gigantocotyle explanatum* and *Gastrothylax crumenifer* (Digenea: Paramphistomidae). J. Parasit. Disea., 32(1): 34-41.

14. Hamed, M. A. (2006). Excretory-secretory product of *Fasciola hepatica* worm protects against *Schistosoma mansoni* infection in mice. Indian J. Exp. Biol., 44: 554-561.

15. Hazdai, T. ; Toker, L. ; Silman, I. and Arnon, R. (1999). Acetylcholinesterase from *Schistosoma mansoni* : interaction of globular species with heparin. Biochem. J. , 344: 945-951.

16. Humiczewska, M. and Rajski, K. (2005). Lipids in the host – parasite system digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected with the developmental stages of *Fasciola hepatica*. Acta Parasitolog., 50(3): 235-239.

17. Jalilfar, S. ; Saghiri, R. ; Ebrahimi-Rad, M. ; Ansari, S. ; Hajihosseini, R.; Nazem, H. ; Poorfallah, F. and Poorsharifi, P. (2009). The analysis of serum adenosine deaminase and its isoenzymes activities in patients with acute lymphoblastic leukemia. J. Iran. Chem. Soc., 6(1): S41. Abstract.

18. Kang, S. Y.; Ahn, I. Y.; Park, C. Y.; Chung, Y. B.; Hong, S. T.; Kang, Y.; Cho, S. Y. and Hong, S. J. (2001). *Clonorchis sinensis* molecular cloning and characterization of 28-KDa glutathione s- transferase. Exp. Parasitol., 97(4): 186-195.

19. Khynriam, D. and Prasad, S. B. (2003). Changes in endogenous tissue glutathione level in relation to murine ascites tumor growth and the anticancer activity of cisplatin. Brazilian J. Med. Biol. Res., 36(1); 53-63.

20. Liebau, E.; Eckelt, V. H. O.; Wildenburg, G.; Teesdal-Spittle, P. ; Brophy, P. M. ; Walter, R. D. and Henkle-Dührsen, K. (1997). Structural and functional analysis of a glutathione s-transferase from *Ascaris suum*. Biochem. J. , 324: 659-666.

21. Mair, G. R. ; Maule , A. G. ; Day, T. A. and Halton, D. W. (2000). A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. Parasitol., 121: 163-170.

22. McKerrow, J. H. and Salter, J. (2002). Invasion of skin by *Schistosoma* cercariae. TRENDS Parasitol., 18(5): 193-195.

23. Moore, M. N. and Halton, D. W. (1976). *Fasciola hepatica*: histochemical observations on juveniles and adults and the cytopathological changes

induced infected mouse liver. Exp. Parasitol. , 40(2): 212-224.

24. Poursharifi, P. ; Saghiri, R. ; Ebrahimi-Red, M.; Nazem, H.; Pourpk, Z. ; Moin, M. ; Shams, S.; Pourfallah, F.; Bidhendi, M. A. and Ghazizadeh, L. (2009). Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 and ADA2 isoenzymes activities. J. Iran. Chem. Soc., 6(1): S27.
25. Pratt, C. W. and Cornely, K. (2004). "Essential Biochemistry". John Wiley and Sons, Inc. USA.
26. Proberta, A. J. and Durranil, M. S. (1977). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: total cholinesterase, characteristics, and effects of specific inhibitors. Exp. Parasitol., 42(1):203-210.
27. Rao, K. V. ; He, Y. X. and Kalyanasundaram, R. (2000). Expression of a 28-kilodalton glutathione -s- transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phage and evaluation of its vaccine potential. Clin. Diagno. Labor. Immunol., 10(4): 536-541.
28. Roberts, L. S. and Janovy, Jr. J. (2005). "Foundation of Parasitology". 7th ed., Published by McGraw-Hill and Larry S. Roberts. New York.
29. Saboury, A. A.; Divsalar, A.; Ataie, G.; Amanlou, M.; Movahedi, A. A. and Hakimelahi, G. H. (2003). Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetry. Acta. Biochim. Polon., 50(3): 849-855.
30. Salter, J. P.; Lim, K. C.; Hansell, E.; Hsieh, I. and McKerrow, J. (2000). Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by asingle serine protease. J. Biol. Chem., 275(49): 38667-38673.
31. Stewart, M. T.; Marks, N. J. and Halton, D. W. (2003). Neuroactive substances and associated major muscle systems in *Bucephaloides gracilescens* (Trematoda: Digenea) metacercaria and adult. Parasitol. Res., 91: 12-21.
32. Tafreshi, A. R. S.; Zamani, Z., Nahrevanina, H. ; Arjmand, M.; Lame-Rad, B. ; Sadeghi, S. and Poorfallah, F. (2009). Study of glutathione -s-

transferase enzyme activity in rodent and human malaria (*Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*). J. Iran. Chem. Soc., 6(1): S24.

33. Tiwari, S.; Singh, S. K. and Singh, A. (2005). The contribution of the anticholinesterase activity of *Pedialanthus tithymaloide* to it's molluscicidal activity. Afr. J. Trad. C. A. M., 2(3): 326-336.
34. Wilson, B. W. and Henderson, J. D. (1992). Blood esterase determinations as markers of exposure. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 128: 55-69.
35. Wilson, K. and Walker, J. (2000). "Principles and Techniques of Practical Biochemistry". 5th ed., Cambridge University Press, U.K.