University of Mosul

College of Science

A taxonomic and biochemical study comparing two species of medicinal leeches risident in Iraq

Islam Khalid Kamal Mohammad Al-Hakim

M.Sc. Thesis

In

Biology / Zoology

Supervised By

Assist. Prof.

Dr. Najah Sobhi Nayef Al-Omar

1443 A.H. **2022 A.D.**

Abstract

Medical leeches are well known parasites which have been used as therapeutic agents in medicine and surgery.

The present study involved a comparison between two types of medical leeches, considering classic and molecular classification methods. Leeches samples which were collected from two different regions in Iraq, the first samples of leeches were collected from Khormal village- Sulaymania governorate, the second sample was collected from Shaqlawa town in Erbil governorate.

The study included two parts, the first one was a taxonomic study where the samples of leeches were diagnosed depending on their external features (morphological taxonomy), *Hirudo verbana* having two characteristics features of broad diffuse pale orange paramedian stripes and an unicolored, greenish to yellow on a ventral surface with a pair of black ventro-lateral stripes, while the *Hirudo medicinalis* the dorsal side is dark brown to black bearing six longitudinal reddish or brown striped. To confirm this classification, molecular biology was used, DNA was extracted from the samples of the two regions and sent to National Center for Biotechnology Information (NCBI) and we discovered a new strain of *Hirudo medicinalis* in the first samples (Khormal village) which were given the name NI (which refers to first letter of the supervisor and the student's names).

Hirudo medicinalis isolate NI was most closely related to *Hirudo medicinalis* isolate PO61 and *Hirudo medicinalis* isolate K067.

The second sample of the other region was proved by NCBI to be *Hirudo verbana* isolate IN was most closely related to *Hirudo verbana* (Accession No. KU672397.1) with 100% sequence similarity and 100% query coverage.

The other most related isolates to *H.verbana* isolate IN were *Whitmania laevis.*

Random Amplified Polymorphic DNA- Polymerase chain reaction (RAPD-PCR) was also done to study the genetic differences between the samples of the two types and the results showed no clear differences, the reason may be due to limited number of samples.

After that phylogenetic trees were done for the two types which showed the lines of evolutionary descent of different species.

The second part of the study was a biochemical study of the two types of medical leeches which included the study of the saliva and the body of *Hirudo medicinalis* and *Hirudo verbana.*

The results showed that the total protein concentration in saliva of *H.medicinalis* was 16.66 ± 1.15µg/cm³ and in saliva of *H.verbana* was 16.33 ± 0.57µg/cm³. The results of the total protein in the body tissues of *H.medicinalis* was 31 ± 1µg/cm³and in body tissues of *H.verbana* was 37.33 ± 1.52µg/cm³.

The results of estimating the Albumin in saliva of *H.medicinalis* was 6.00±0 µg/ cm³and in saliva of *H.verbana* was 6.00 ±0 µg/ cm³. Concentration the Albumin in the body of *H.medicinalis* was 8.667 ± 1.52 µg/ cm³ and in the body of *H.verbana* was 10.334 ± 0.57 µg/ cm³.

Concentration of cholesterol, triglycerides and HDL in the saliva of *H.medicinalis* were 136.67 ± 5.77, 143.33 ± 5.77 and 51.1 ± 8.50µg/cm³, respectively.

The results in the body tissues were 415 ± 25, 395 ± 5 and 202.25 ± 1.25µg/cm³, respectively.

The results in the saliva of *H.verbana* were 130 ± 0, 140 ± 0 and 51.1 ± 3.56µg/cm³, respectively.

The results in the body were 673.33 ±72.34, 530 ± 0 and 316.40 ± 83.48µg/cm³, respectively.

Estimating the AchE enzyme activity was 10.19 ± 5.43 mu/ml in the saliva of *H.medicinalis* and 10.68 ± 1.06 mu/ml in the body of *H.medicinalis*,

while the result was 5.28 ± 2.65mu/ml in the saliva of *H.verbana* and 9.75 ± 2.03mu/ml in the body of *H.verbana.*

Estimating the carbonic anhydrase enzyme activity was 1929.04 ± 505.94 ng/L in saliva of *H.medicinalis* and 29.99 ± 6.91 ng/L in the body of *H.medicinalis,* while the result was 1529.58 ± 258.42 ng/L in saliva of *H.verbana* and 20.01 ± 10.003 ng/L in the body of *H.verbana.*

Estimating calcium, ssDNA, dsDNA, RNA, miRNA and the purity of DNA and RNA were done; the results are mentioned in chapter four.

This study showed that there were only simple differences in some biochemical substances and notable differences in other substances between the two types of the medical leeches.

الخلاصة

ديدان العلق الطبي طفيليات معروفة منذ القدم والتي تم استعمالها ومازالت تستعمل كأداة علاجية في الطب والجراحة.

هذه الدراسة تضمنت المقارنة بين نوعين من ديدان العلق الطبي التي تم جمعها من منطقتين مختلفتين في العراق ، العينات الأولى تم جمعها من قرية خورمال في محافظة السليمانية اما العينات الثانية فقد تم جمعها من قضاء شقلاوة في محافظة اربيل.

شملت الدراسة جانبين الأول دراسة تصنيفية حيث تم تشخيص ديدان العلق بالأعتماد على صفاتها الخارجية (التصنيف المظهري) وللتأكد من هذا التشخيص تمت الأستعانة بعلم الأحياء الجزيئي حيث تم استخلاص الحامض النووي الدي اوكسي رايبوزي (DNA) من عينات المنطقتين وتم ارسالها الى المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية وتم اكتشاف سلالة جديدة من *Hirudo medicinalis* من العينات الأولى (قرية خورمال) وتم تسميتها NI (الحرف الاول من اسم المشرفة والطالبة).

المعزولة NI ل *Hirudo medicinalis* كانت الأكثر قرابة للمعزولة PO61 من *Hirudo medicinalis* والمعزولة K067 من *Hirudo medicinalis* .

العينات الثانية للمنطقة الأخرى تم تشخيصها *Hirudo verbana* ،(سلالة IN) كانت الاكثر قرابة ل *Hirudo verbana* (رقم الانضمام KU672397.1) مع 100% تشابه تسلسلي و100% تشابه مع بنك الجينات.

المعزولات الاخرى الأكثر قرابة لمعزولة IN ل *Hirudo verbana* كانت Whitmania laevis.

كذلك تم فحص العينات بواسطة التضخيم العشوائي لبلمرة الحامض النووي الدي اوكسي رايبوزي- تفاعل البوليميراز المتسلسل لدراسة الاختلاف الجيني بين عينات المنطقتين ولم تظهر النتائج اختلافات واضحة ربما كان السبب محدودية عدد النماذج.

بعد ذلك تم عمل الشجرة الوراثية للنوعين التي اوضحت خطوط النسب التطوري لمختلف الأنواع.

اما الجانب الثاني فكان دراسة كيموحيوية لنوعين من ديدان العلق الطبي وتضمنت دراسة لعاب وجسم *Hirudo medicinalis* و *Hirudo verbana* .

النتائج اظهرت ان كمية البروتين الكلي في اللعاب ل *H.medicinalis* كان 16.66± 1.15 مايكروغرام لكل سم مكعب وفي لعاب *H.verbana* كان 16.33± 0.57 مايكروغرام لكل سم مكعب ، اما نتائج كمية البروتين الكلي في جسم *H.medicinalis* فكانت 31± 1 مايكروغرام لكل سم مكعب وفي جسم *H.verbana* كانت 37.33± 1.52 مايكروغرام لكل سم مكعب.

نتائج قياس الألبومين في لعاب ال *H.medicinalis* كانت 6.00 ±0 مايكروغرام لكل سم مكعب وفي لعاب ال *H.verbana* كانت 6.00 ±0 مايكروغرام لكل سم مكعب ، أما نتائج الألبومين في جسم ال *H.medicinalis* كانت 8.667 ± 1.52 مايكروغرام لكل سم مكعب وفي جسم ال *H.verbana* كانت 10.334 ± 0.57 مايكروغرام لكل سم مكعب.

نتائج قياس الكوليسترول ،الدهون الثلاثية والدهن البروتيني عالي الكثافة في لعاب ال *H.medicinalis* كانت 136.67± 5.77 ، 143.33± 5.77 ، 51.1± 8.50 مايكروغرام لكل سم مكعب على التوالي.

أما نتائج الجسم فكانت 415± 25 ، 395± 5 و 202.25± 1.25 مايكروغرام لكل سم مكعب على التوالي.

نتائج اللعاب في *H.verbana* كانت 130± 0 ، 140± 0 و 51.1± 3.56 مايكروغرام لكل سم مكعب على التوالي.

أما نتائج الجسم فكانت 673.33± 72.34 ، 530± 0 و 316.40± 83.48 مايكروغرام لكل سم مكعب على التوالي.

نتائج قياس انزيم اسيتايل كولين استريزكانت 10.19± 5.43 ملي يونت لكل مل في لعاب ال *H.medicinalis* و 10.68± 1.06 ملي يونت لكل مل في جسم ال *H.medicinalis* ، بينما النتيجة كانت 5.28± 2.65 ملي يونت لكل مل في لعاب ال *H.verbana* و 9.75± 2.03 ملي يونت لكل مل في جسم ال *H.verbana* .

أما نتائج قياس انزيم الكاربونيك انهايدريز كانت 1929.04± 505.94 نانوغرام لكل لتر في لعاب ال *H.medicinalis* و 29.99± 6.91 نانوغرام لكل لتر في جسم ال *H.medicinalis* ، بينما النتيجة كانت 1529.58± 258.42 نانوغرام لكل لترفي لعاب ال *H.verbana* و 20.01± 10.003 نانوغرام لكل لتر في جسم ال *H.verbana* .

تم قياس الكالسيوم ، ssDNA، dsDNA ، RNA، miRNA و نقاوة الDNA والRNA وذكرت النتائج في الفصل الرابع .

هذه الدراسة اظهرت وجود تغيرات بسيطة في بعض المواد الكيموحيوية وفروقات واضحة في بعض المواد الاخرى بين النوعين من العلق الطبي .

جامعة الموصل

كلية العلوم

دراسة تصنيفية وكيموحيوية مقارنة لنوعين من العلق الطبي المتوطن في العراق

اسلام خالد كمال محمد الحكيم

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الاستاذ المساعد

الدكتورة نجاح صبحي نايف العمر

1443هـ 2022م