مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 19 (4) 2006

دراسة التاثير السمي للكولسين الخام المستخلص من بكتيريا *Escherichia Coli* على عيوشية الخلايا المناعية

رجوة عيسى ، هند حسين ، نضال عبد المهين*
قسم علوم الحياة ، كلية علوم المستنصرية
* قسم الأحياء المجهرية، الكلية الطبية

الخلاصة

استخلص الكولسين الخام من بكتيريا *E.Coli* المعزولة من مرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية، ثم درست سمية الكولسين الخام على عيوشية الخلايا المناعية [البلعمية(polymorphnuclear cells(PMNS), Macrophage(MØ)) واللمفاوية] وتوصلت الدراسة الى ان التأثير السمي للكولسين الخام يعتمد بصورة رئيسة على التركيز المستخدم. فالتراكيز الواطئة (50،25،10مكغم/مل) (حسب هذه الدراسة) لم يكن لها تأثير معنوي أما عند بدء ارتفاع التركيز بالتدريج تبدأ عيوشية الخلايا تقل وصولاً الى التركيز (1500مكغم/مل) والذي سبب قتل جميع الخلايا.

المقدمة

الكوليسنات مضادات بروتينية تنتج من بعض سلالات بكتيريا *E. coli* والأنواع الاخرى القريبة من البكتيريا المعوية وهي ذات فعل قاتل (Bactericidal) للسلالات الأخرى من هذه البكتيريا والأجناس القريبة لها.(1،2،3) ان آليات عمل الكولسينات تختلف حسب نوع الكولسين فمنها ما يعمل على الغشاء البلازمي(4) ومنها يعمل على المادة الوراثية (5) وأخرى تسبب تثبيط صنع البروتين (6) والأخيرة تعمل على تثبيط صنع طبقة الميورين (peptidogly can)(7) لكي يستطيع البكتريوسين أن يعمل يجب

ان تكون الخلايا الهدف حاوية على مستقبلات متخصصة لإرتباط ذلك النوع فيه وهذا تم إثباته بالنسبة للخلايا البكتيرية(prokarytic cells) اما بالنسبة لخلايا حقيقية النواة (Eukaryotic cells) ومنها اللبائن فلا يوجد ما يثبت وجود هذه المستقبلات على سطوح الخلايا الطبيعية(8) . وذكر (9) ان كولسين (7) يسبب تحلل كريات الدم الحمراء أما [10] فذكر إن لهذا الكولسين تاثيراً ساماً على خلايا حقيقية النواة.

أما بخصوص فعالية الـActinobacillicin فقد أكد الباحث (11) بان ليس لهذا البكتريوسين تأثير على حيوية الخلايا البيضاء. أما دراسة الباحث (12) فقد توصلت الى ان كولسين E2 يسبب تحطيم المادة الوراثية (DNA) لأحد الخلايا الحيوانية وهي *Euglena gracilis* مما يثبط تكاثر هذه الخلايا. لذلك ومن خلال البحث في الأدبيات لم نجد دراسات متخصصة حول تاثير البكتروسيتات او الكولسينات بصورة خاصة عن خلايا اللبائن عدا القليل جداً المتيسر منها لذلك ارتأينا ان تكون هذه الدراسة حول دراسة التأثير السمي للكولسين الخام على احد اهم خلايا جسم الإنسان وهي الخلايا المناعية.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص البكتيريا:

بعد جمع العينات من مرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية، تم عزل البكتيريا وتشخيصها وفقاً الى ما جاء في (13)، (14).

استخلاص الكولسين الخام:

تم التحري عن العزلات المنتجة للكولسين من بين عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة بعدها تم انتخاب عزلة منتجة كفوءة من بين العزلات المنتجة وثم تم استخلاص الكولسين الخام منها وحسب طريقة (15). قيست فعالية الكولسين بطريقة التنقيط المباشر(method Directly spotting)(16) وحسب تركيز البروتين الكلي في النموذج المحضر حسب طريقة (17).

تحديد سمية الكولسين الخام على الخلايا المناعية(البلعمية واللمفاوية):

- عزل الخلايا الصفاقية (MØ) من الفئران حسب طريقة (18) .
- عزل الخلايا البيضاء متعددة أشكال النوى (PMNS) حسب طريقة (19)

- عزل الخلايا اللمفاوية من دم الاشخاص الاصحاء حسب طريقة (20).

بعد عزل كل نوع من الخلايا أعتمدت طريقة (21) في عد الخلايا بوساطة شريحة عد خلايا الدم (Haemo cytometer) تحت المجهر الضوئي وإخذت النماذج التي أعطت نسبة عيوشية (95%) فأكثر بأستعمال صبغة ألتريبان الزرقاء حيث عدت الخلايا المصبوغة خلايا ميته أما الخلايا التي لم تأخذ الصبغة فهي خلايا حية.

ولدراسة تأثير الكولسين الخام على عيوشية الخلايا البلعمية والخلايا اللمفاوية فقد اعتمدت طريقة[22] وفق الخطوات الأتية:-

1- تم تحضير عالق الخلايا اللمفاوية في وسط RPMI – 1640 وبتركيز (4×10^6 خلية/مل).

2- حضر الكولسين الخام بتراكيز نهائية مختلفة وهي (صفر، 10، 25، 50، 100، 300، 500، 700، 900، 1100، 1300، 1500 مكغم/مل) في الوسط RPMI-1640 في أنابيب بلاستيكية معقمة.

3- أضيف (0.5) مل من عالق الخلايا المحضر الى كل أنبوب احتوى على (0.5 مل) من الكولسين الخام بالتركيز المطلوب (مراعاة الحجم النهائي للمزيج) حيث عدت الأنبوبة الأولى بالتركيز(صفر) أنبوبة سيطرة ثم وضعت الأنابيب في الحاضنة لمدة ساعة بدرجة حرارة (37م).

4- بعد انتهاء مدة الحضن حسبت أعداد الخلايا الحية لاستخراج النسبة المئوية لعيوشية الخلايا ومدى سمية الكولسين عليها باستعمال صبغة التريبان الزرقاء(0.2%) وحسب القانون الاتي:-

$$\text{النسبة المئوية لعيوشية الخلايا} = \frac{\text{عدد الخلايا الحية}}{\text{العدد الكلي}} \times$$

-طبقت الخطوات نفسها لكن باستعمال الخلايا البلعمية المحضرة بتركيز (8×10^6 خلية / مل).

التحليل الاحصائي

حللت نتائج الاختبارات إحصائياً باستعمال (T-test) واختبار تحليل التباين باتجاه واحد (Anova test) فضلا عن استخدام (LOD) للتحري عن وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة عند مستوى معنوية (5%).

النتائج والمناقشة

يوضح الجدول (1) التاثير السمي للكولسين الخام على الخلايا المناعية، فنجد ان عيوشية تلك الخلايا تراوحت بين(94-96%) في تراكيز الكولسين الخام الواطئة (15، 25،50 مكغم/مل) حيث لم تظهر نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية ($P>0.05$) بينها وبين معاملة السيطرة من جهة وفيما بينهما كذلك من جهة اخرى.

بعد ذلك نلحظ ان العيوشية تبدأ بالانخفاض فتصل الى (85%) للخلايا البلعمية و (90.2%) للخلايا اللمفاوية عند استخدام التركيز (100مكغم/مل) من الكولسين الخام وبفروق معنوية ($P<0.05$) عن معاملة السيطرة ويستمر ذلك الانخفاض معنوياً كلما ارتفع تركيز الكولسين الخام ومن ذلك نستنتج ان التأثير السمي للكولسين الخام يزداد مع ارتفاع التركيز.. ولم تظهر النتائج وجود فروق معنوية ($P>0.05$) عند مقارنة عيوشية كل من خلايا البلعم الكبير MØ والخلايا متعددة اشكال النوى (PMNs) والخلايا اللمفاوية فيما بينهما..

ان عمل الكولسينات على الخلايا البكتيرية(بدائية النواة) معروف، أما عملها على خلايا حقيقية النواة ومنها اللبائن فلازال قيد البحث، حيث اختلفت آراء الباحثين في هذا الموضوع ويعود السبب في ذلك لاختلاف انواع البكتريوسينات في التركيب.

لبعض الكولسينات تاثيراً ساماً على خلايا حقيقية النواة وتأثيرها مشابه لما هو عليه في بداية النواة (23)، (24)، (25)، (26) وبينما البعض الأخر فيها لا تؤثر على خلايا حقيقية النواة او إنها ذات تأثير طفيف جداً[11] . كما وذكر (8)، (27) بان التأثير السام يعتمد التركيز المستخدم.

وعلى الرغم من ان الكولسينات تحتاج الى مستقبلات للدخول الى الخلية الهدف لكن توجد آراء تشير الى ان الكولسين يمكن ان يدخل عن طريق الانتشار في الخلايا الفاقدة

للجدار الخلوي (Spheroplast) (26) او إنها تدخل عن طريق مستقبلات الغذاء مثل($V.B_{12}$) او من خلال مستقبلات الفايروسات او الهرمونات(8).

ومن خلال النتائج المذكورة في جدول (1) يظهر بوضوح دور التركيز المستخدم في التأثير فالتراكيز المرتفعة سببت حدوث صدمة ازموزية لاختلاف تركيز المادة داخل وخارج الخلية مما سبب زيادة إفراز الجزيئات الداخلة الكبيرة وقتل تلك الخلية، او ان ارتفاع عدد جزيئات الكولسين في هذه التراكيز ادى الى إظهار فعله السام والقاتل للخلايا بإحدى الميكانكيات المعروفة سابقة الذكر.

المصادر

1. Shirabe, K.; Yamada, M.; Merrill,A.; Cramer, W.A. and Nakazawa,A.(1993). Plasmid 29: 236-240.
2. Obrien, G.J.and Mahanty, H.K.(1994).Coli. Plasmid,31:288-296.
3. Smjs, D.; Plilsi,H.and Braun,V.(1997).T. of Bacterriol.,179:4919-4928.
4. Wiener,M.; Freymann,D.; Ghosh,P.and Stroud, R.M.(1997). Crystal structure of colicin Ia Nature, 385: 461-4.
5. Riley,M.(1993). Mol. Biol.Evol., 10:1380-1395.
6. Masaki,H.; Ogawa, T.; Tomita, K.; Ueda, T.; Waeanabae, K. and Uozmi, T.(1997). Nucleic-Acids.Symp-ser, 37:287-8.
7. Braun, V.; Gaisser,S.; Glaser, C. ; Harkness, R.; Ölschäger, T. and Mende, J.(1992). Import and Export of Colicin M. Nato ASI series H65:226-242.
8. Saito, H. and Watanabe, T.(1979). Concer Res., 39:5114-7.
9. Waalwjk, C. and Graaff, J.(1983). Antonie Van Leeuwonhoek, 49:23-30.
10. Waters, V.L. and Crosa, J.H.(1991).Microb.Rev.,55:437-450.
11. Hammond,B.F., Lillard,S.E.and Stevens, R.H.(1987). Abacterio Cins of Actinobcillus actionmycetemcomitans.
12. Smarda, J.; Ebringer, L.and Mach,J.(1975). J.Gen Microbiol ., 86:363-6.
13. Koneman, E.W.; Allen, S.D. and Jaunda, W.M.C(1992). Colorplates and textbook of diagnostic microbiology 4th ed. J.B. Lippin Cott Company.

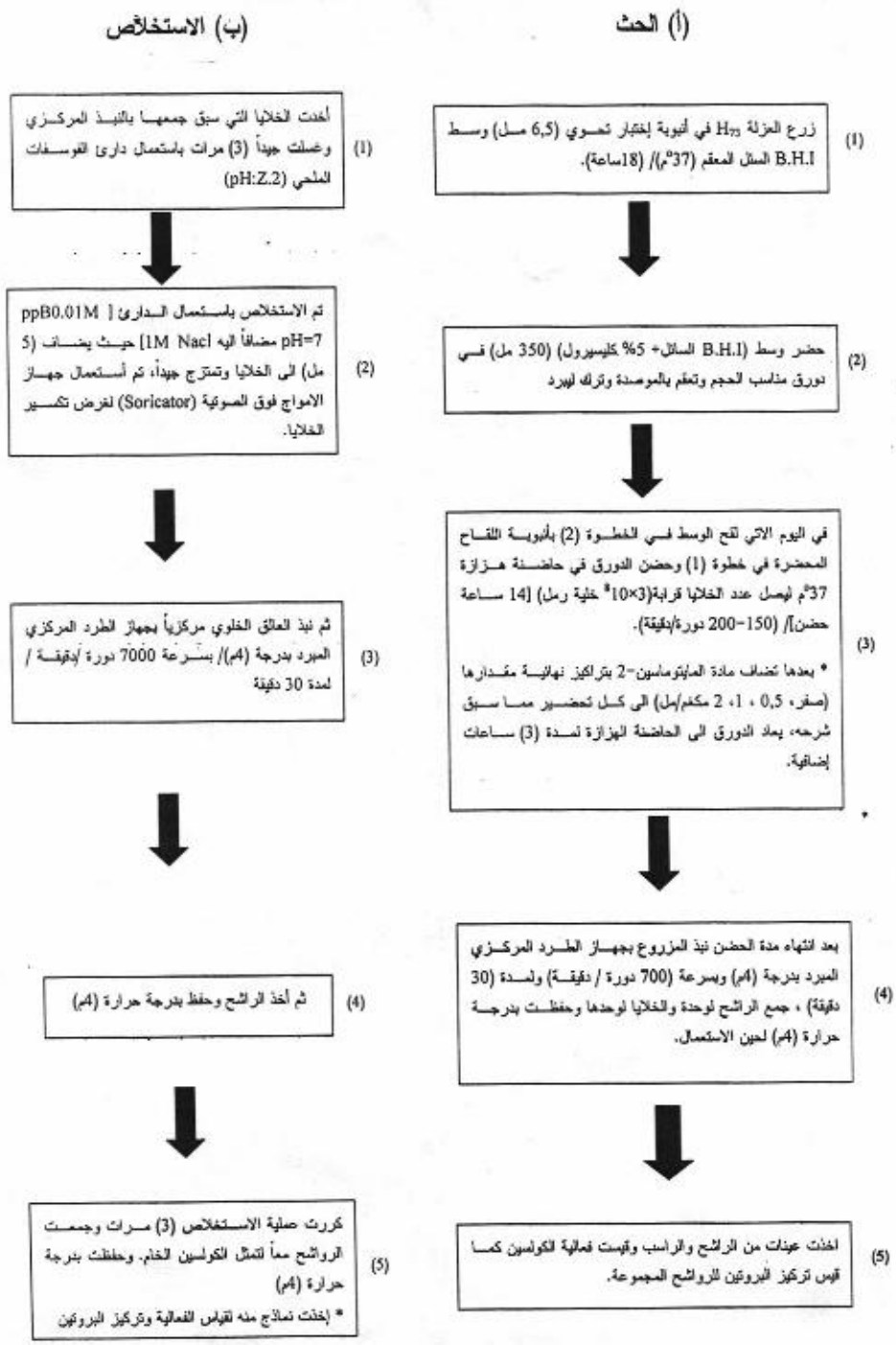
14. Mahon, C.R. and Mannselis, G.J.(1995). Textbook of diagnostic microbiology.W.B. Saunders Company.
15. Herschman,H.R. and Helinski, D.R.(1967).The J.of Biological Chemistry, 242:5360-8.
16. Pilsl, H.and Braun, V.(1995). J. of Bacteriol., 177:6966-6972.
17. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Fair, A.L. and Randall, R.J. (1951). J.Biol. Chemical., 193: 265-275.
18. Weber, B.; Nickol, M.M.; Tagger, K.S. and Saelinger, C.B.(1982). Can. J.Microb. 28: 679-685.
19. Cech, P. and Lehrir, R.I. (1984). Blaod, 64: 147-151.
20. Boyum, A.(1968). Scand. J. Clin. Lab Invest., 21: 77-89.
21. Hudson,L. and Hay, F.C. (1980). Practial immunology 2nd ed. Blackwell. Scient Public.
22. Nonoyama, S.; Kojo, H.; Mine, Y.; Nishida, M.; Gota, S. and Kuwahara, S. (1979). . Infect. Immun., 24:399-403.
23. Ozanne,G.; Mathieu, L. G. and Baril, P.(1977). Infect. And Immun., 17: 497-503.
24. Smarda, J.; Obdrzalek, V.; Taborsky, I. and Mach, J. (1978). Folia Microbiol., 23: 272-7.
25. Bures, J.; Horak, V.; Buresova, E.; Fixa, B., Komarkova, O. and Hartman, M. (1986). Scand. J. Gastrocnterol., 21: 819-823.
26. Bures, J.; Horak, V.; Fixa, B.; Komarkova, O.; Zaydlar, K.; Lonsky, V. and Masurka, V.(1986). Neoplasma, 33:233-237.
27. Lokaj, J.; Smarda. and Mach, J. (1982). Exp., 38: 1352-3.

جدول(1): النسبة المئوية لعيوشية الخلايا المناعية(البلعمية واللمفاوية) بتأثير تراكيز مختلفة من الكولسين الخام

تركيز الكولسين مكغم/ مل	النسبة المئوية للعيوشية (المعدل ± الانحراف المعياري)		
	خلايا صفاف الفئران البلعمية(MØ)	الخلايا متعددة اشكال النوى(PMN)	الخلايا اللمفاوية
صفر	a ± 96 1.73	a ± 95.5 1.85	a 2.7 ± 96.1
10	a 95.15 1.33 ±	a ± 94.14 1.82	a 1.4 ± 96
25	a ± 94.9 0.99	a 1± 94	a 1.1 ± 96.3
50	a 2 ± 94	a ± 95.15 1.77	a 1,2± 95.2
100	b ± 85.6 2.1	b 1 ± 85	b 1.6 ± 90.2
300	c ± 70.5 2.42	c 2 ± 68	c 1.5 ± 73.4
500	d ± 54.1 1.5	d 1.8 ± 52.9	d 1.7 ± 60
700	e ± 42 1.7	e 1.3 ± 40.2	e 1.33 ± 47.86
900	f ± 35.7 1.02	f 2.3 ± 35.2	f 1.1 ± 41
1100	g 1± 30	g 1 ± 29	g 1.72 ± 30
1300	h 2 ± 25	h 1.73 ± 25	h 1.22 ± 25
1500	صفر	صفر	صفر

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية (P>0.05)/(المقارنة بين المعاملات المختلفة لكل عمود).

مخطط (1) حث وأستخلاص الكولسين الخام



IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI. VOL.19(4) 2006

Study of Toxic Effect of Crud Colicin Exracted from *Escherchia Coli* on Viability of Immune Cells.

R. Essa , H. Hussain , N. A. Al Mohymen*
Department of Biology, College of Science,University of Al-Mustansiyria
***Department of Microbiology, College of Medicine**

Abstract

Crude-colicin was extracted from *E.coli* isolated from urinary tract infection patients. Toxicity of various concentrations of crude colicin on the viability of immune cells [phagoeytic cells(MØ,PMN) and lymphocytes] was studied. Results indicated that toxicity effect of crude colicin is dependent on concentration. Low concentrations (10, 25, 50 mg/ml) didn't have toxic effects, but when there was an increase in the consternation of this extract, the viability of the immune cells began to decrease.