# دراسة تاثير الفا هيمولايسين المنتج من *Staphylococcus aureus* على عملية البلعمة خارج الجسم الحي

**رسمية عبد ابو ريشة ، دنيا فريد سلوم ، لميس خليل**

*قسم علوم الحياة– كلية العلوم– جامعة بغداد. العراق، بغداد.*

**الملخص**

استخلص الهيمولايسين الفا المنتج من عزلة محلية لبكتريا ال *S.aureus* بطريقة الطرد المركزي المبرد وقد تم تعقيمه باستخدام ورق الترشيح ذي القطر 0.22 مايكروميتر. تمت دراسة تاثير الهيمولايسين الفا على قابلية الخلايا البلعمية على عملية البلعمة خارج الجسم الحي باستخدام عشرين عينة دم المعاملة بالهيمولايسين الفا المنقى حيث بينت النتائج ان معامل البلعمة لعينات الدم المعامل بالهيمولايسين مساوي 52.2% مقارنة بالسيطرة حيث بلغ معامل البلعمة 76.6% والذي تم الحصول عليه من اشخاص اصحاء. وهذا يعني ان هنالك تاثيراً سلبياً للهيمولايسين الفا المنتج من بكتريا *S.aureus* على فعالية الخلايا البلعمية على البلعمة.

**Abstract**

Hemolysin-α of *Staphylococcus aureus* was purifed by cooling centrifuge at 6.000 r.p.m. for 1/2 hr. And fliterate by using milipore filter (0.22 μm).

The effect of crude hemolysin on phagocytosis process was studied by measuring the phagocytic index for 20 blood sample which was collected from healthy with control blood samples.

From the result we found that the phagoctic index of blood sample which was treated with α-hemolysin was 52.2% while the phagocyte index of control blood sample was 76.6%.

**المقدمة**

تعد بكتريا العنقوديات الذهبية *S.aureus* من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام حسب مصنف بيركي (1)، تنتج هذه الجرثومة العديد من العوامل الخارجية التي لها دور في امراضيتها ومنها الهيمولايسين بانواعه بيتا الذي يسبب تحلل كريات الدم الحمر للانسان والخراف والارانب (2) ويعتبر الهيمولايسين المنتج من هذه البكتريا من عوامل امراضيتها حيث يسبب تحطم للاغشية الخلوية لكريات الدم الحمر. حيث وجد ان الهيمولايسين الفا عبارة عن وحدة واحدة ترتبط الى اغشية الخلايا الهدف حيث يسبب تحلل لكريات الدم الحمر والبيض والصفيحات الدموية للانسان حيث يسبب ثقب في الاغشية والاختراق الى داخل الخلايا. ووجد ان ميكانيكية عمل هذا النوع من الحال الدموي مشابهة لعملية التحلل الاوزموزي الذي يحدث للخلايا الحية (4)، (5). والفا الذي يسبب تحلل جزيئي لكريات الدم الحمر (3) والنوع غير المحلل لكريات الدم الحمر والذي يطلق عليه كاما (4). كما وجد ان الهيمولايسين بيتا والفا المنتج من اجناس بكترية مختلفة له تاثير مثبط على عملية البلعمة (3)، لذا استهدف هذا البحث دراسة تاثير الهيمولايسين المنتج من بكتريا *S. aureus* على عملية البلعمة خارج الجسم الحي وبالتالي دوره في امراضية البكتريا وتاثيره في عمل مناعة الجسم الخلوية.

**المواد وطرق العمل**

**انتاج الهيمولايسين الفا المنتج من بكتريا *S.aureus* :**

انتج الهيمولايسين الفا من العزلة المحلية *S.aureus* والتي تم الحصول عليها من عينات ادارا لاشخاص مصابين بالتهاب المجاري البولية وفق طريقة (6). تم تلقيح 500 مل من وسط نقيع القلب والدماغ بالعزلة المحلية لبكتريا *S. aureus* ثم حضن الوط بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة وبعد التاكد من نقاوة المزروع تم الحصول على الهيمولايسين الخام بعملية الطرد المركزي المبرد لعالق البكتريا وبسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة، ثم رشح الراشح باستخدام المرشحات ذو قطر 0.22 مايكروميتر ويمثل الهيمولايسين الفا الخام.

**قياس فعالية الهيمولايسين الفا الخام:**

تم قياس فعالية الهيمولايسن الفا الخام Hemolytic unit وفق طريقة (7) وتمثل معكوس اعلى تخفيف يعطي تحلل كامل لكريات الدم الحمر، عملت سلسلة من تخافيف مضاعفة للهيمولايسين الخام حيث اخذ 1 مل من كل تخفيف واضيف اليه 1 مل من عالق كريات الدم الحمر للانسان بتركيز 2% ثم حددت الفعالية من خلال اخذ معكوس اعلى تخفيف يعكي تحلل كامل للدم مقارنة مع التحلل القياسي الذي تم الحصول عليه من خلال معاملة 1 مل من اعلى تخفيف يعطي تحلل كامل للدم مقارنة مع التحلل القياسي الذي تم الحصول عليه من خلال معاملة 1 مل من عالق كريات الدم الحمر المعاملة بمادة SDS (Sodium dotysyl sulphate) التي تسبب تحلل كامل لكريات الدم الحمر.

**تنقية الهيمولايسين الفا:**

تمت عملية التنقية باستخدام هلام Sephadex-G-100 والاسترداد باستخدام Phosphate Buffer Saline حيث تم جمع الاجزاء النافذة وقدرت فعاليتها بالطريقة السابقة لتحديد فعالية الهيمولايسين المنقى (3).

**دراسة تاثير الهيمولايسين المنقى على عملية البلعمة:**

**1- فحص البلعمة Phagocytosis:**

اجري هذا الاختبار وفق طريقة(8)، حيث استخدمت المكورات العنقودية *S.aureus* لقياس فعالية الخلايا الملتهمة على الالتهام.

**2- تحضير نموذج الدم للفحص:**

استعمل الدم خلال 1-2 ساعة من جمعه لاجراء الفحص لضمان فعالية الخلايا الملتهمة.

سحب الدم لعشرين اشخاص ظاهرياً اصحاء في انابيب اختبار معقمة مغطاة بمادة السليكون لضمان عدم ادمصاص الخلايا الملتهمة على الزجاج لقابليتها العالية على ذلك، كما احتوت الانابيب على مادة مانعة للتخثر (الهيبارين) بتركيز 50 وحدة دولية/مل كما تم مراعاة عدم احتواء الانابيب على مادة الازايد لكي لا تتاثر فعالية الخلايا البكترية والخلايا الملتهمة.

**3- طريقة اجراء الفحص:**

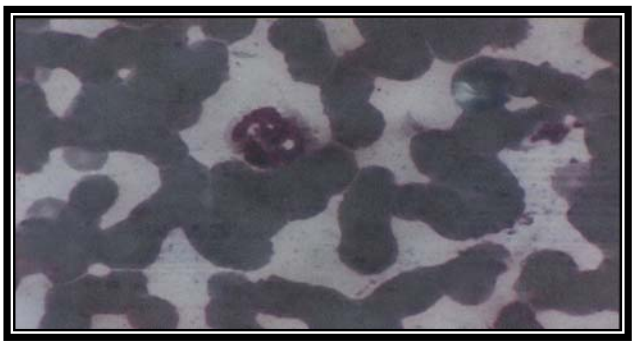
- تم مزج 1 مل من الدم مع 1 مل من عالق البكتريا بتركيز $1\times10^6$ خلية/مل في انابيب اختبار مطلية بالسليكون معقمة ولتكن السيطرة بينما احتوت الانابيب الاخرى على 0.1 مللتر من الهيمولايسين المركز باعتبارها الحجم الذي بامكانه ان يسبب تحلل لخلايا الدم.
- وضع المزيج في حمام مائي بدرجة 37°م لمدة 30 دقيقة مع التحريك البطئ.
- بعد انتهاء مدة الحضن اخذت قطرة من المزيج ووضعت على شريحة زجاجية وعمل منها وترك في جو الغرفة ليجف بشكل كامل.
- صبغ الغشاء باضافة قطرات من صبغة ليشمان لمدة 1-2 دقيقة ثم خففت الشريحة بالبفر الخاص بالصبغة وتركت لمدة 5-10 دقائق بعدها غسل الغشاء بالماء.
- تم حساب عدد الخلايا الملتهمة بالمجهر الضوئي على قوة تكبير 10 × 100 م حسبت نسبة عدد الخلايا الملتهمة وكما في المعادلة الاتية:

$$\text{نسبة عدد الخلايا الملتهمة} = \frac{\text{عدد الخلايا الملتهمة}}{\text{عدد 100 خلية ملتهمة وغير ملتهمة}} \times 100$$

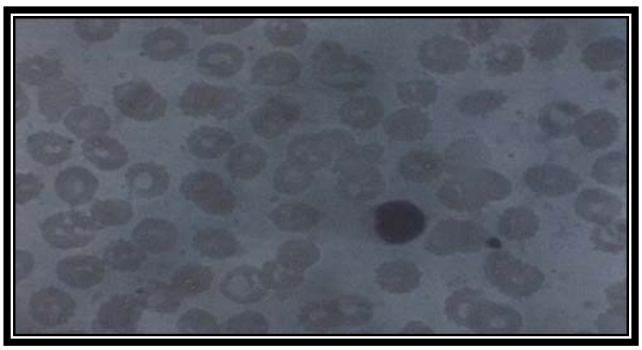
**النتائج**

**جدول (1) النسبة المئوية للخلايا البلعمية في عدد من عينات الدم المعاملة بالهيمولايسين المنقى وعينات السيطرة**

| عدد العينات | نسبة الخلايا الملتهمة% لعينات السيطرة | نسبة الخلايا الملتهمة لعينات الدم المعاملة بالهيمولايسين الفا المنقى |
|---|---|---|
| 1 | 66 | 50 |
| 2 | 75 | 53 |
| 3 | 73 | 64 |
| 4 | 55 | 44 |
| 5 | 69 | 55 |
| 6 | 50 | 60 |
| 7 | 78 | 49 |
| 8 | 80 | 56 |
| 9 | 83 | 61 |
| 10 | 75 | 50 |
| 11 | 87 | 44 |
| 12 | 77 | 52 |
| 13 | 54 | 43 |
| 14 | 83 | 60 |
| 15 | 75 | 55 |
| 16 | 60 | 61 |
| 17 | 74 | 42 |
| 18 | 73 | 49 |
| 19 | 81 | 55 |
| 20 | 70 | 41 |
| معامل البلعمة | 76.6 | 52.2 |



**صورة (1) توضيح خلايا بلعمية ملتهمة لبكتريا *S. aureus***



**صورة (2) توضيح خلايا بلعمية غيرملتهمة لبكتريا *S. aureus***

## النتائج والمناقشة

من خلال قياس معامل البلعمة لعينات الدم المعاملة بالهيمولايسين الفا الخام المنتج من S.aureus مقارنة بعينات الدم السيطرة، اظهرت النتائج انخفاض واضح في معامل البلعمة، حيث وجد ان معامل البلعمة مساوي 52.2، جدول (1) مقارنة بمجموعة السيطرة حيث بلغ 76.6%. من هذه النتائج نلاحظ ان الهيمولايسين الفا المنتج من هذه الجرثومة له تاثيراً سلبياً على عملية البلعمة وجاءت هذه النتائج مطابقة مع دراسات سابقة حيث لوحظ انخفاض معنوي لعملية البلعمة وجاءت هذه النتائج مطابقة مع دراسات سابقة حيث لوحظ انخفاض معنوي لعملية البلعمة لعينات معاملة بـ Staphylolysin المنتج من *S.aureus* و Streptolysin المنتج من *Streptococcus* من خلال تثبيط عملية البلعمة عن طريق تثبيط عملية الانتحاء الكيميائي Chemotaxis لكريات الدم البيض الى منطقة الاصابة (9)، (10).

واشارت مصادر سابقة الى دور الهيمولايسين الفا وبيتا المنتج من بكتريا *S.aureus* في تحطيم الاغشية الخلوية للخلايا الملتهمة وبذلك التقليل من كفاءة عملية البلعمة (11)، كما وجد ان العديد من الحالات المرضية المتسببة عن هذه البكتريا ومنها حالات النخر Necrosis في الاعضاء مثل الكبد تعزى الى انتاجية هذه الجرثومة لهذه السموم ومنها الهيمولايسين حيث وجد ان الاشخاص الذين يعانون من هذه الحالات المرضية يكون لديهم انخفاض واضح في مناعة الجسم الخلوية. بسبب تاثيره على الخلايا المناعية الملتهمة (12، 13).

نستنتج من هذا البحث ان للهيمولايسين الفا المنتج من بكتريا S. aureus تاثيراً سلبياً على كفاءة الخلايا البلعمية في عملية الالتهام وبالتالي التاثير على مناعة الجسم الخلوية.

## المصادر References


1. Holt, J., G., Krieg, N.R.; Shoath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (**1994**). *Bergey's Mannual of determination bacteriology (9th ed.)* P:532-553. Williams and Wilkins. U.S.A.
2. Gemmell, C.G. and Thlestam, M. (**1981**). *Toxinogenecity of clinical isolates of coagulase-Negative streptococci toward various animal cells*. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 89:417-421.
3. Wiswman, G.M. (**1968**). *The Nature of Staohylococci beta hemolysin. Cand.* J., of Microbiol. 14 (**1968**).
4. Butt, H. L.; Dunsyon, R.; McGregor, N.; Roberts, J.; Zerbes, M. and Klincherg, I.

(**1998**). *An association of membrane damaging toxin from coagulase negative Staphylococcus*.

5. Kenneth, T. (**2004**). *The genus Staphylococcus* (Internet).
6. Kreger, A. S.; Kim, K. S.; Zeboretzky, F.; and Bernehm (**1971**). *Purification and properties of Staphylococcal delta hemolysin.* Infect. Immune. 3: 449-465.
7. Santes, J. A.; Ganzoler, C. J.; Lopez, T. M.; Otero, A. and Garcia, Lopez, M. L. (**1999**). *Hemolytic and elastoyltic activities influenced bu iron in P. Shigelloides.* J. Food. Protect. 62: 146-147.
8. Furth, R. V.; Theda, L.V.; Leiji, P.C. (**1985**). *In vitro determination phagocytosis and intracellular killing by PMW* "Handbook of experimental immunuology" Blakwell Scientific Publication. (3th ed.) Vol.2. P:1-14.
9. Duncan, J. L. (**1974**). *Characteristics of streptolysin O., Hemolysis: Kinetics of hemoglobin and rubidium relase.* J. Infect. Immun. 9(6): 102-1027.
10. Scheifele, D.W.; Bjoornson, G.L.; Dyer, R.A. and Dim nick, J.E. (**1987**). *DeHe like toxin produced by coagulase-Negative Staphylo-cocci is associcated with neonatal necrosis enterocolitis.* J. Infect. Immune. 55.
11. Gentry, M.J.; Snitility, M.U. and Prehicne, L.C. (**1995**). *Phagocytosis of Streptococcus pneumoniae in vitro and in vivo in a rat model of carbon tetra-chloride induced liver cirrhosis*. J. Infect. Dis. 7:350-355.
12. Johnson, M.K.; Boes-Marrazo, D. and Pierce, W.A. Jr. (**1981**). *Effect of pneumolysin on human polymorphnuclear leukocyte and platelets.* Infect. Human. 34(1): 171-176.
13. Freer, J.H. and Arbuthott, J.P. (**1980**). *Toxins of Staphylococcus aureus pharmacol.* Ther. (19):55-106.