الفعل التلازني للكتين المرتبط بالمانن (MBL) تجاه بعض العزلات المحلية من الجراثيم الممرضة

عصام فاضل الجميلي، ريما محمد عبد العبيدي، محمد ابراهيم نادر

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا- جامعة بغداد. العراق، بغداد.

الاستلام: 2004/3/6 القبول: 2004/11/2

الملخص

أظهر اللكتين المرتبط بالمانن (MBL) المنقى من مصل دم الانسان قابلية على ملازنة بعض الاحياء المجهرية المرضية السالبة لصبغة غرام بتقنية الشريحة الزجاجية وقد ابدى قدرة عالية في تلزن خلايا كل من *Salmonella choleraesuis* و *Shigella dysenteriae* .

كما أختبرت فعالية اللكتين في تلزن خلايا عصيات القولون والكليسبلا الرئوية باستخدام تقنية المطياف الضوئي ولوحظ استمرار تلزن خلايا عصيات القولون لغاية آخر تخفيف وظهور تلزن قوي في التخافيف الثلاثة الاولى . بينما لم تظهر أي فعالية تلازنية للكتين مع بكتريا العنقوديات الذهبية عند جميع التخافيف ماعدا التخفيف 1/2 .

The Agglutination Action of Mannan Binding Protein (Lectin) Against Some Local Isolates of Pathogenic Bacterial

Abstract

The purified Serum mannan protein (Lectin) exhibited antibacterial properties against some isolates of some Gram -negative pathogenic bacteria by silde agglutination test .They were clear that the (SMBP) has the ability to agglutinate *Salmonella choleraesuius, Shigella dysenteriae.* We studied the effect of lectin toward *E.coli and Klebsiella pneumoniae* by using spectrophotometric assay which it was found to agglutination all dilutions of *E.coli* cells and gave high agglutination activity to wards the first three dilutions, and it improved weak agglutination activity towards *Staphylococcus aureus* which gave agglutine in 1/2 dilution only.

المقدمة

يشترك اللكتين المرتبط بالمانن (MBL) في عملية تنشيط نظام المتمم [1] ، كما وجد بان ارتباط MBL بسطح الجراثيم المعويه *E . coli* (K12 , B)، يحفز القتل الجرثومي المعتمد على المتمم، وان هذا الارتباط يعتمد على وجود السكريات وايونات الكالسيوم، اذ يعملان على زيادة الالفة بين الجراثيم و MBL وبالتالي القتل الموجه ضد الجرثومة [2].

ذكر Devyatyarova وزملائه [3] ان تركيب LPS دور في عملية ارتباط MBL بالجراثيم، اذ لاحظ ان ازالة LPS من جدار الجراثيم السالبة لصبغة غرام يقلل من ارتباط MBL بالجراثيم كما ان اضافة حامض الساليك Sialic acid في معلق بكتيريا *Neisseria gonorrhoeae* يعيق ارتباط MBL بسطحها، لذلك فان بكتيريا *Gonococci* تصبح مقاومة للارتباط MBL عند اضافة حامض الساليك للـ LPS

لكن MBL يستطيع ان يحمي المضيف ضد الاصابة بهذه الجراثيم قبل حصول عملية اضافة حامض الساليك Sialysion للـ LPS.

بين Kuhlman وجماعته [4] ان MBL في الانسان له قابلية الارتباط بسطح الجراثيم المعوية *Salmonella motivideo* التي تظهر سكر المانوز على سطحها وبالتالي حصول عملية الاستساغة وقتلها من قبل الخلايا البلعمية بسبب ارتباط MBL بمنطقة O-antigens الغنية بسكر المانوز[5].

كما لوحظ ايضاً ان بكتيريا *Neisseria meningitidis* غير المكبسلة بنوعيها B ,C لها قابلية الارتباط بـ MBL [5]، اما[6] و[7]، وان هذا الارتباط يزداد بازالة Lip–oligosaccharide (LOP) او ازالة حامض الساليك، أذ يؤدي النقص او القصور في MBL الى زيادة الاصابة بهذه الجراثيم، كما وجد ان هناك انواعا معينة من الجراثيم غير المكبسلة لها قابلية الارتباط بـ MBL منها *Listeria monocytogenes* ، *Haemophilus influenza* ، *N. meningitidis* نوع *A* ، *. cinera* ، *N .sub flava* ، *E. coli* ، *Streptoccus suis* ، *Streptococcus pneumonia* ، لذلك فأن وجود الكبسولة تؤثر في ارتباط MBL بسطح الجراثيم وبالتالي تعد الكبسولة من عوامل ضراوة الجراثيم [6] و[7] .

ان وجود Lipoteichoic acid على الجدار الخلوي للبكتيريا الموجبة لصبغة غرام يمكن MBL من الارتباط بها اذ لاحظ Polotsky [8] ان وجود Lipoteichoic acid في الجراثيم المعوية *Enterococcus* و *Micrococcus* الحاوية على Oligoglucosyl الاحادي والثنائي يزيد من قوة ارتباط MBL بها .

المواد وطرائق العمل

اختبرت طبيعة تاثير MBL في تلازن الخلايا الجرثومية لسبع عزلات مختلفة معزولة ومشخصة محليا وهي :

1. *Salmonella choleraesuis*
2. *Shigella dysenteriae*
3. *Klebsiella pneumonia*
4. Enteropathogenic *Escherichia coli*
5. *Pseudomonas aeruginosa*
6. *Serratia marcescens*
7. *Staphylococcus aureus*

استخدمت طريقتان لاختبار هذا التاثير [9] وهما:

ا- طريقة التلازن باستخدام الشريحة الزجاجية :

1- المحاليل والمواد المستخدمة

ا-المرق المغذي السائل Nutrient broth (N.B)

ب-المحلول الملحي الفسلجي Normal saline (N.S)

جـ- محلول النموذج (MBL)

استخدم محلول MBL الذي تم تنقيته باستخدام طريقة كروموتوغرافيا الالفة على عمود السيفاروز – 4B المرتبط بالمانن والمنشط ببروميد السيانوجين وفق الطريقة التي ذكرها Al-Jumaily [10].

2- طريقة العمل :

نميت العزلات الجراثيمة المنتخبة على الوسط الغذائي N.B. ، وحضنت بدرجة حرارة 37 ° م لمدة 18 ساعة ، ثم غسلت الخلايا الجرثومية المترسبة باضافة 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم الى الانبوب الحاوي على كل عزلة وتمت عملية النبذ المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة وكررت العملية مرتين مع اهمال الرائق في كل مرة . علقت الخلايا المغسولة بالمحلول الملحي نفسه بحيث تكون الامتصاصية نفسها باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 600 نانوميتر الذي تم تصفيره بأستخدام المحلول الملحي الفسلجي . اجري فحص التلازن على سطح شريحة زجاجية وذلك بمزج 20 مايكروليتر من عالق الخلايا الجرثومي مع 20 مايكروليتر من محلول MBL وملاحظة سرعة تلازن الخلايا وشدتها خلال دقيقتين من بدء التفاعل، ومقارنة النتيجة مع فحص السيطرة (Control) ، إذ مزج 20 مايكروليتر من عالق الخلايا الجراثيم مع 20 مايكروليتر من محلول الملحي الفسلجي .

ب- طريقة التلازن باستخدام الطيف الضوئي Spectrophotometric assay

بعد تنمية العزلات الجراثيمة المنتخبة على المرق المغذي السائل وغسلها كما جاء في طريقة الشريحة الزجاجية ، اخذت العزلة الجراثيمة التي اعطت أفضل قوة تلازنية مع MBL ، وعملت منها تخافيف مضاعفة الى حد تخفيف 32/1 بأستخدام المحلول الملحي الفسلجي المحضر . اخذ 1.5 مليلتر من كل تخفيف واضيف له 0.5 مليلتر من محلول MBL . حضنت جميع الانابيب ومن ضمنها انبوب السيطرة لكل تخفيف والحاوي على الجراثيم بدون MBL أذ استبدل بالمحلول الملحي الفسلجي وكان

الحضن بدرجة حرارة 37 °م لمدة 1.5 ساعة ، قرئت امتصاصية الجزء العلوي للمحلول لكل انبوب على الطول الموجي 600 نانوميتر، واستخدم المحلول الملحي الفسلجي كمحلول كفء (Blank) .

النتائج والمناقشة

اعطت عينات اللكتين MBL المنقى من مصل دم الانسان وبتركيز (3 مايكروغرام / مل) ، قدرتها على ملازنة الخلايا الجرثومية مع تفاوت ملحوظ في القوة التلازنية . وفي ضوء الجدول (1) يمكن تقسيم العزلات الجرثومية تبعاً لشدة او قوة التلازن الى اربع فئات ، الفئة الاولى تضم عزلتين هما *Salmonella choleraesuis* و *Shigella dysenteriae* ، وهذه تتلازن بقوة وبدرجة متكافئة عند تعرضها للكتين MBL . في حين تتلازن عناصر الفئة الثانية والتي تضم *Klebsiella pneumonia* و Enteropathogenic *Escherichia coli* بدرجة اقل . اما عناصر الفئة الثالثة والتي تشمل *Serratia marcescens* و *Pseudomonas aeruginosa* فتتلازن خلاياهما بصورة واضحة ولكنها بدرجة اقل عن الفئة الثانية ، اما الفئة الرابعة والتي تضم *Staphylococcus aureus* فلم تظهر أي تلازن ملحوظ. يمكن الاستدلال من خلال النتائج المستحصلة على وجود مستقبلات تمتلك ثمالات لسكر المانوز على سطوح خلايا العزلات الجرثومية المختبره في هذه الدراسة، ألا أن اختلاف شدة التلازن من فئة لاخرى ربما يشير الى اختلاف عدد هذه المستقبلات وطريقة انتشارها على السطوح الخارجية للخلايا الجراثيمة من جهة ، كما يشير الى تقارب اعدادها وتوزيعها على السطوح الخارجية لخلايا افراد الفئة الواحدة من جهة آخرى. وهذا يتفق مع ماذكره Barondes [11] عن انتشار ثمالات سكرية Polysaccharides على سطح العديد من انواع الجراثيم تستطيع الارتباط بالـ MBL ، كما ان عدم قابلية MBL في تلازن *Staphylococcus aureus* ، فانه يعود الى عدم توافر ثمالات متخصصة للارتباط بالـ MBL على سطح الجراثيم [11].

جدول (1) : شدة الملازنة اللكتين MBL المعزول من مصل الانسان لبعض العزلات الجرثومية

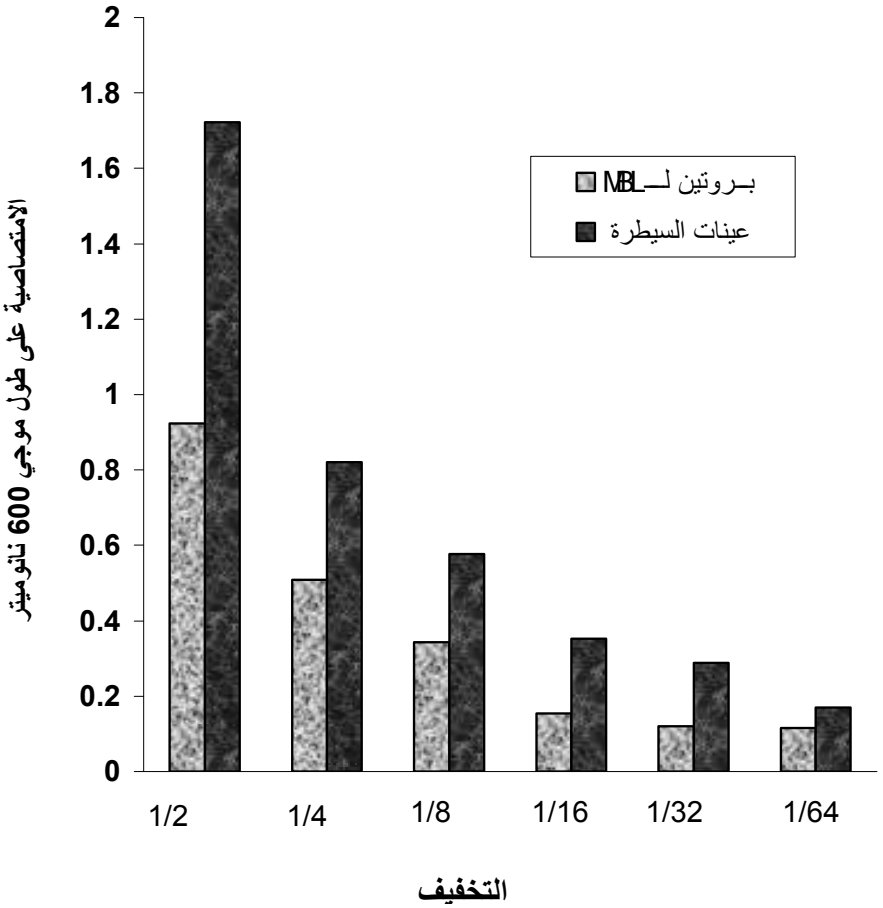
الجراثيم المستخدمة	التلازن وشدته
Salmonella choleraesuis	موجب (++++)
Shegilla dysenteriae	موجب(++++)
Kelbsiella pneumonia	موجب (+++)
Enteropathogenic E. coli	موجب (+++)
Pseudomonas aeruginosa	موجب (++)
Serratia marcescens	موجب (++)
Staphylococcus aureus	سالب (-)

استخدمت العزلة الجرثومية *Salmonella choleraesuis* ، والتي اظهرت قوة تلازنية عالية مع لكتين MBL عند استخدام طريقة التلازن بطريقة الشريحة الزجاجية ولكن بطريقة الطيف الضوئي، يوضح الشكل (1) قدرة لكتين MBL على ملازنة بكتريا *Salmonella choleraesuis* في جميع التخافيف المستخدمة ولكن لوحظ اعلى قدرة تلازنية في التخافيف (1/2، 1/4، 1/8) ، ان الفعالية التلازنية لـ MBL تجاه انواع مختلفة من العزلات الجراثيمة يعود الى عدد مواقع الارتباط بالسكريات على سطح العزلات السكرية [4].

تختلف انواع جنس السالمونيلا في كمية سكر المانوز التي تظهر ضمن متعدد السكريد الشحمي في الجدار الخلوي اذ وجد ان كل وحدة متكرره من بكتيريا *Salmonella montevideo* تحوي على اربع جزيئات من سكر المانوز [4] . لذلك فأن اللكتين الـ MBL غير قادر على ملازنة الجراثيم المعوية الفاقدة لمتعدد السكريات [3] . أكد Kuhlman [9] بأن وجود سكر المانوز بنسبة عالية على سطح بعض انواع جنس *Salmonella* يمكن اللكتين MBL من ملازنة هذه انواع بصورة واضحة.

كما وجد بان اللكتين MBL له القدرة على ملازنة انواع آخرى من الجراثيم المرضية بسبب انتشار ثمالات سكرية على سطحها ملائمة لهذا البروتين ومنها *Haemophilus influenza* و *Listeria monocytogenes* [8] . و *Niesseria maningitdis* نوع B و C [6] و *Proteus mirobilis* [10]. يمكن الاستدلال من النتائج المستحصلة من هذه الدراسة، ومما تقدم ذكره في المراجع المختلفة على اهمية

استخدام لكتين لـ MBL المعزول من مصل دم الانسان في المجال الطبي من خلال المجال التشخيصي للجراثيم المرضية.



الشكل (1) : تاثير لكتين MBL المعزول من مصل دم الانسان في ملازنة جراثيم *Salmonella choleraesuis* باستخدام طريقة الطيف الضوئي.

References

1. Ikeda, K.; Sannoh, T.; Kawazaki, N.; Kawazaki, T. and Yamashina, I. (**1987**). *Serum lectin with known structure activiate complement through classical pathway*. J. Biol. Chem. 262(16): 7451-7454.
2. Kawazaki, N.; Kawazaki, T. and Yamashina, I. (**1989**). *A serum lectin (mannan-binding protein) has complement-depandent bactericidal activity*. J. Biochem. (Tokyo). 106:483.
3. Devyatyarova, M.J.; Rees, I.H.; Robertson, B.D.; Turner, M.W.; Klein, N.J. and Jack, D.L. (**2000**). *The lipopolysaccharide structure of Salmonella typhimurium and Neisseria gonorrhoeae determine the attachment of human mannose-binding lectin to intact organism. Infect*. Immun. 68(7): 3894-3899.
4. Kuhlman, M.; Joiner, K. and Ezekowitz, R.A. (**1989**). *The human mannose – binding protein functions as an opsonin*. J. Exp. Med. 169: 1733-1745.
5. VanEmmerik, L.C.; Kuijper, E.J.; Fijen, C.A.; Dankert, J. and Thiel, S. (**1994**). *Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis*. Clin. Exp. Immunol. 97:411.
6. Dominic, L.J.; Jarvis, G.A.; Booth, C.L.; Tunner, M.W. and Klein, N.J. (**2001a**).

Mannose-binding lectin accelerates complement activation and increases serum killing of Neisseria meningitidis serogroup C. J. Infect. Dis. 184: 836-845.

7. Dominic, L.J.; Read, R.C.; Tenner, A.J.; Frosch, M.; Tunner, M.W. and Klein, N.J. (**2001b**). *Mannose-binding lectin regulates the inflammatary response of human professional phagocytes to Neisseria meningitidis serogroup* B. J. Infect. Dis. 184:1152-1162.
8. Polotsky, V.Y.; Fischer, W.; Ezekowitz, R.A. and Joiner, K.A. (**1996**). *Interactions of human mannose-binding protein with lopteichoic acid.Infect*. Immun. 64: 380.
9. Al-Jumaily, EF.; Al-Doori, E.M.; Al-Safar, M.A. and Al-Biaty, S.M. (**2001**). *Antibacterial activity of serum mannan-binding protein (SMBP) from human serum*. Iraqi .J.Commun. Med. 14 (2):292-295.
10. Al-Jumaily, E.F.; Alaubaidi, R.M. and Abd al-Karrem, F. (**2004**) *Purification and characterization of mannan binding lectin from human serum*. Al-Mustansiriya J. of Science. Vol.2.No.2.77-90.
11. Barondes, S.H. (**1986**). *Lectin in cellulose slime molds. In: The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (eds. Liener, I.E.; Sharon, N. and Goldstein, I.J.) P. 486-490. Academic press, INC. New York.