Iraqi Journal of Science

ISSN: 0067-2904
GIF: 0.851

تأثير بعض المواد في إنتاجية وفعالية ذيفان ألفا- هيمولايسين المنتج من المكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد المثيسيلين

خولة جبر خلف*، زينب فرحان علي

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق

الخلاصة

تناولت الدراسة 77 عزلة بكتيرية من المكورات العنقودية الذهبية(*Staphylococcus aureus*) والمعزولة من مصادر سريرية مختلفة . أظهرت النتائج أن نسبة العزلات المنتجة لذيفان الفا -هيمولايسين كانت 32 عزلة (41.55%) اما العزلات غير المنتجة للذيفان ، فقد كانت 45عزلة (58.45%) اختيرت العزلة الكفوءة ،وحدد التركيز المثبط الادنى لمضاد المثيسلين والذي كان تركيزه 32 مايكروغرام / مل. اختبر تأثير مادة CD-Cholesterol، وCholesterol ، و Cyclodextran(CD) ، وMethicillin ، Phosphate Buffer Saline(PBS) في فعالية الذيفان وكان معيار التحلل Hemolytic Titer هو: 8 ، 32.768 ، 65.536 ، 140.737.488.355.32 ، 4.961408E+25 على التوالي. واختبر تأثير المواد نفسها في انتاجية الذيفان وكانت النتائج على النحو الاتي : 67.108.864، 549.755.813.888، 274.877.906.944، 576.460.752.303.360، 3.96140812E+25 على التوالي وقد نقي الذيفان جزئيا بطريقة الترسيب باستخدام كبريتات الامونيوم، واختبرت فعالية الذيفان المنقى جزئيا داخل الجسم الحي في قرنية عين الارانب المختبرية إذ تكونت مناطق تآكل في القرنية بقطر 8 ملم بعد 8 ساعات من الحقن و ثبطت فعالية هذا الذيفان داخل الجسم الحي باستخدام مادة CD-Cholesterol مع الذيفان حيث تناقص و اصبح قطر تآكل القرنية 4 ملم.

Effect of Some Materials on Productivity and Activity of α-Hemolysin which Produced by Methicillin Ressistant *Staphylococcus Aureus*

Khawlah Jebur Khalaf*, Zainab Farhan Ali

Department of Biology, College of Science, Al- Mustansiriya University, Baghdad, Iraq

Abstract

In this study 77 human isolates of *Staphylococcus aureus* were obtain from different clinical sources. The results showed that the number of isolates producing α-hemolysin was 32 isolates (41.55%) , while non- hemolysin producing was 45 isolates (58.45%) .The minimum inhibitory concentration (MIC) of methicillin which were 32 micrograms \ ml. The effect of CD-Cholesterol ,Cholesterol ,Cyclodextran(CD) ,Methicillin and Phosphate Buffer Saline(PBS) on α- hemolysin activity was study and the hemolytic Titer was:8 ، 32.768 ,65.536 , 140.737.488.355.32 , 4.961408E + 25 respectively, while the effect of the same effect with Titer 67.108.864 and low Titer with PBS 3.96140812E + 25. The α – hemolysin toxin was partialy purified by ammonium sulfate precipitation. partial purified toxin was injected inside the cornea of rabbit's eye and the erosion of cornea formed with diameter: 8 mm after 8 hours of injection while the erosion of cornea which injected with CD-Cholesterol that mixed with partial purified toxin

*Email: khawlah.juber@yahoo.com

was 4 mm. CD-Cholesterol was used in treatment as a drops which added to the affected eye and led to a decrease in corneal erosion area from 8 mm to 4 mm.

Keywords: α-hemolysin, Methicillin- ressistant *Staphylococcus aureus*, CD-Cholesterol, Cholesterol, Cyclodextran (CD), Methicillin and PBS

المقدمة

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) من اكثر الانواع اهمية من الناحية السريرية، وعلى الرغم من انها تمثل 30% من النبيت الطبيعي في جسم الانسان اذ تتواجد في مناطق مختلفة منه مثل الجلد والمجاري التنفسية الا انها تعد عاملا ممرضا انتهازيا للإنسان [1]. بلغت نسبة امراضية المكورات العنقودية الذهبية ما يقارب 80% من الامراض القيحية المسجلة في المراكز الطبية المنتشرة في انحاء العالم كافة سيما المرضى الراقدين في المستشفيات ممن يعانون ضعفا في ميكانيكية دفاعات الجسم [2]. تتدرج الاصابات القيحية التي تسببها بكتريا *S. aureus* في شدتها، فمنها السطحية ،ومن ابرزها الامراض الجلدية مثل الحصف(Impetigo) والدمامل(Boiles) واصابات العين، الى امراض جهازية واصابات عميقة مهددة للحياة مثل انتان الدم (Septicemia) فضلا عن الالتهابات المعوية الحادة [3]. تعود امراضية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الى قدرتها على التضاعف السريع، وامتلاكها العديد من عوامل الضراوة مثل انتاج الذيفانات والانزيمات التي تؤدي دورا مهما في غزو انسجة المضيف وانتشار البكتيريا، ومن اهم تلك الذيفانات هو الذيفان الحال لكريات الدم الحمر α–Hemolysin الذي يعد من اهم عوامل ضراوة البكتيريا إذ يمتاز بقدرته على احداث الثقوب في الجدران الخلوية للخلايا مما يسهل انتشار البكتيريا في انسجة المضيف ويزيد من امراضيتها، وتسهم انزيمات البيتالاكتاميز (β–Lactamase) التي تملكها بكتيريا المكورات العنقودية في مقاومة البكتيريا للعديد من المضادات الحياتية [4] . نظرا لأهمية هذه البكتيريا من الناحية الطبية ومقاومتها للعديد من المضادات الحيوية وضرورة ايجاد طرائق فعالة لعلاجها لجأت هذه الدراسة الى استخدام الطرق والوسائل للتقليل من عوامل ضراوة البكتيريا وخاصة ذيفان الفا– هيمولايسين الذي له دور مهم في امراضيتها لذلك هدفت هذه الدراسة الى التعرف على تأثير بعض المواد على انتاجية وفعالية الذيفان.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات وتشخيصها

جمعت 150عينة من مستشفيات بغداد ومن مصادر سريرية مختلفة وزرعت على الاوساط nutrient agar ووسط اكار الدم Blood agar وحضنت بدرجة 37 م ولمدة 24 ساعة. شخصت العزلات البكتيرية باتباع الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية الواردة في المصدر [5] اضافة الى استخدام نظام Vitek 2 كما واختبرت حساسية العزلات لمضاد المثيسيلين وانتخبت العزلة الكفوءة والمقاومة لهذا المضاد.

التحري عن قدرة عزلات المكورات العنقودية على انتاج ذيفان الفا –هيمولايسين

لقح الوسط الزرعي Blood Agar (Himedia) بالعزلات البكتيرية المراد التحري عن قدرتها على انتاج الذيفان.ثم حضنت الاوساط الزرعية بدرجة 37م لمدة 24–48 ساعة وسجلت النتائج من ملاحظة المنطقة الشفافة المحيطة بالمستعمرات النامية [6] كما وتم الكشف عن فعالية الراشح في احداث التحلل لكريات الدم الحمراء وذلك باستخدام اطباق المعايرة الدقيقة (Microtitration plates) .

تحديد التركيز المثبط الادنى للمثيسلين Minimum Inhibitory Concentration

استخدمت طريقة التخفيف بالأنابيب (Tube Dilution Method) لحساب التركيز المثبط الادنى للمثيسلين للعزلة الكفوءة وحسب ما ورد في Tregan *et. al* [6] وذلك باستعمال وسط مولر هنتون السائل وبتخافيف متسلسلة من المضاد الحياتي المثيسيلين تراوحت بين(2 – 1024) مايكروغرام / مل .

التحري عن تأثير المواد CD–Cholesterol و Cyclodextrin وCholesterol و PBS في نمو بكتريا *S. aureus*

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Wells diffusion method التي وصفها Gupta وجماعته [8] لغرض التحري عن تأثير المواد المستخدمة في نمو بكتريا *S.aureus* ، اذ تم عمل حفر في وسط Tryptic soya agarالصلب باستخدام ثاقب الفلين المعقم وبقطر 5 ملم (بواقع 4–5 حفر لكل طبق) تحت ظروف معقمة. ثم نقل 50 مايكروليتر من مادة CD، Cholesterol، CD–

PBS ،Cholesterol كلا على حدة وبتركيز 0.0001 و 0.001 و0.001 و0.1 غم امل على التوالي الى الحفر مع وجود السيطرة السالبة (المحلول الملحي الفسلجي)، وحضنت عند درجة 37 م ولمدة 24 ساعة، وقرئت النتائج بالعين المجردة بملاحظة المناطق المحيطة بالحفر فيما اذا حصل فيها تثبيط للنمو.

التحري عن تأثير المواد Cholesterol و Cyclodextrin والمثيسيلين و PBS و CD-Cholesterol في فعالية ذيفان α-hemolysin

اخذ 100 مايكروليتر من المادة المراد التحري عن تاثيرها في فعالية الذيفان وبتركيز (0.001) غم /مل اما المثيسيلين فاخذ من محلول المضاد بتركيز 16 مايكروغرام / مل (وهو التركيز ماقبل التركيز المثبط الادنى)، ثم اضيف اليها 25 مايكروليتر من كريات دم الارنب الحمراء وحضنت في الثلاجة لمدة 30 دقيقة . خفف الذيفان الخام (الراشح) في اطباق المعايرة الدقيقة وذلك باخذ 100 مايكروليتر الى الحفرة الاولى والحاوية على 100مايكروليتر من المحلول الملحي الفسلجي ومزجها جيدا ثم ينقل 100 مايكروليتر من المزيج الى الحفرة الثانية والحاوية ايضا على 100 مايكروليتر من المحلول الملحي الفسلجي وهكذا الى نهاية الطبق بعدها اضيف 125 مايكروليتر من خليط احدى المواد وخلايا دم الارنب الى كل حفرة من اطباق المعايرة الحاوية على الذيفان المخفف(كلا على حدى) ثم حضنت عند درجة 37 لمدة 30 دقيقة وقرئت النتائج بعدها بالعين المجردة بملاحظة توقف التحلل في الحفر والتي تدل على تأثير المادة على فعالية الذيفان في تحلل خلايا الدم الحمراء للأرنب[9] .

التحري عن تأثير المثيسيلين وال PBS وCD-Cholesterol وCyclodextrin في انتاجية ذيفان α-hemolysin

اتبعت الطريقة الواردة في المصدر [10] حيث لقح 5 مل من وسط Tryptic Soya broth ب 50 مايكروليتر من المزروع البكتيري 10^8 واضيف له 0.5 مل من محاليل المواد اعلاه كلا على انفراد (وبنفس التراكيز المستخدمة في دراسة التاثير على الفعالية) وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ، نبذت الانابيب بسرعة 6000 دورة بالدقيقة واخذ الراشح وامررعبر مرشحات دقيقة ذات قطر 0.22 مايكروليتر ، اخذ 100 مايكروليتر من الراشح واضيف الى الحفرة الاولى من طبق المعايرة الدقيقة والحاوية على 100مايكروليتر من المحلول الملحي الفسلجي ومزج جيدا ثم نقل 100 مايكروليتر الى الحفرة الثانية والحاوية ايضا على 100 مايكروليتر من المحلول الفسلجي (لغرض تخفيف الراشح) وهكذا الى اخر حفرة من الطبق بعدها اضيف 25 مايكلروليتر من كريات الدم الحمراء للارنب وقرأت النتيجة بعد ان حضنت بدرجة 37 م ولمدة 30 دقيقة ودل توقف تحلل الكريات الحمر على تثبيط المادة للذيفان مقارنة مع السيطرة (الراشح لوحده بدون اضافة).

استخلاص ذيفان الفا-هيمولايسين extraction of α- Hemolysin

استخدم الترسيب بكبريتات الامونيوم كخطوة اولية لتنقية البروتين تنقية جزئية [11] وذلك باضافة كبريتات الامونيوم الصلبة الى راشح العزلة الكفوءة مع التحريك المستمر وصولا الى نسبة اشباع (60%) حفظ بعدها هذا المحلول بدرجة 4م لمدة 24 ساعة للسماح بترسيب البروتين بشكل كامل . نبذ مركزيا بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم اختبرت الفعالية التحللية للراسب بعد تعليقه بمحلول phosphate Buffer Saline المعقم وديلزته للتخلص من الاملاح باستعمال طريقة الانتشار بالحفر وحفظ الذيفان الناتج بدرجة -15م لحين الاستعمال.

تثبيط فعالية الذيفان المنقى جزئيا داخل الجسم الحي

اختيرت المادة الاكثر فعالية في تثبيط الذيفان خارج الجسم الحي وهي CD-Cholesterol وبتركيز 0.001 غم \ مل ومزجت مع الذيفان المنقى جزئيا لمدة 30 دقيقة ثم حقن 0.1 مل في قرنية عين مجموعة من الارانب (intrastromal injection) ذات عمر6-10 اشهر وفي العينين كلتيهما في حين حقنت مادة CD-Cholesterol لوحدها في عين ارانب اخر للمقارنة ومجموعة اخرى تم حقنها بالذيفان المنقى جزئيا لوحده ، وقرئت النتيجة بعد مرور (2، 4، 6، 8) ساعة وقرأت النتيجة بقياس قطر منطقة التاكل [12] .

معاملة الاصابة بذيفان α-hemolysin باستعمال مادة CD-Cholesterol

استخدمت مادة CD-Cholesterol في علاج العين المحقونة بالذيفان المنقى جزئيا بعد مرور 8 ساعات على الحقن وبواقع قطرتين في كل عين من مادة CD-Cholesterol بتركيز0.001 غم امل كل 15 دقيقة وبعد الساعة التاسعة من الحقن كانت القطرات كل 30 دقيقة لحين 13 ساعة بعد الحقن وتم بعدها مقارنة العين المعالجة بمادة CD-Cholesterol بالعين المحقونة بالذيفان التي لم تعالج [13].

النتائج والمناقشة

قدرة العزلات البكتيرية على انتاج الذيفان الفا- هيمولايسين

اظهرت نتائج الدراسة الحالية قدرة العزلات البكتيرية التابعة لجنس المكورات العنقودية الذهبية على انتاج ذيفان الهيمولايسين حيث كانت نسبة العزلات المنتجة 41.55% إذ استطاعت 32 عزلة أن تنتج الهيمولايسين من أصل 77 عزلة وقد بينت الباحثة تركي، [14] أن نسبة العزلات المنتجة لذيفان الهيمولايسين في عزلاتها كانت 69% فيما كانت نسبة العزلات المنتجة للهيمولايسين في دراسة الشويخ، [15] هي 100%، ويعد ذيفان الهيمولايسين من أهم عوامل ضراوة بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية حيث استعمل كدليل على إمراضية البكتريا[16].

كانت تراكيز المثيسلين المستعملة في هذه التجربة تتراوح بين 1028 -2µg \ ml، وكان التركيز المثبط الادنى هو(32) µg\ml ، وتعطي مثل هذه القراءة فكرة واضحة عن القدرة الشديدة للعزلة المحلية على مقاومة المضاد و على وجود penicillin – binding protein في جدار الخلية،وقد تختلف هذه القيمة بحسب اختلاف موقع العمل، المستشفى،و نوع المرضى من الراقدين أومن الخارجين، ومحل الاصابة، وكذلك طرق العلاج المستعملة، واشار Girard *et.al* [17] الى استعمال التركيز المثبط الادنى لكل من البنسيلينات والسيفالوسبورينات التي كانت قيمتها 22 و20 µg\ml على التوالي لتثبيط بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المسببة للعديد من الالتهابات وعدوى المستشفيات.

تحديد قدرة الذيفان الخام (الراشح) على تحلل كريات الدم الحمراء

حددت قدرة الذيفان الخام على تحلل كريات الدم الحمراء باستعمال اطباق المعايرة الدقيقة وقد لوحظ استمرار التحلل الى اخر حفرة من طبق المعايرة مما يدل على قابلية ذيفان الفا – هيمولايسين على تحلل كريات الدم الحمراء وبخاصة خلايا دم الارنب بسبب قدرة الذيفان على احداث الثقوب في جدران الخلايا [18].

التحري عن تأثير المثيسلين وال PBS وCD-Cholesterol و Cyclodextrin و cholesterol في فعالية ذيفان α- hemolysine

لوحظ عدم ظهور أية مناطق تثبيط حول أية مادة من المواد المذكورة اعلاه وقد نمت البكتيريا على نحومعتاد حول الحفر الحاوية على تلك المواد. بينت النتائج وكما في الجدول-1 ان معيار التحلل لمادة المثيسلين Titer: 140.737.488.355.32 ، 56.536 بوجود مادة السايكلودكسترين(CD) ، 32.768 بوجود مادة الكوليستيرول (Cholesterol) ، و مادة PBS بمعيار 4.72236648E+18، و اما بوجود CD-cholesterol فتوقف تحلل الدم وبمعيار تحلل Titer= 8 مقارنة بالسيطرة الموجبة المتمثلة بالراشح (السم الخام) لوحده .

ويمكن تفسير هذه النتائج بان جميع هذه المواد تؤثر على قابلية الذيفان التحللية (Hemolytic Activity) من خلال التنافس على المستقبلات الخاصة التي يرتبط بها الذيفان على سطح الخلايا الحساسة لهذا الذيفان (خلايا دم الارنب)، وقد استخدم الباحث Pany وجماعته [19] بعض المواد الكيميائية والطبيعية التي كان لها تأثير في قدرة الذيفان التحللية من خلال الارتباط بالمستقبلات الخاصة على سطح الخلايا، مثل مادة الكولسترول ومادة السايكلودكسترين. وقد أوضح الباحث vijayvargia وجماعته [20] أن الارتباط التنافسي على مستقبلات الذيفان تؤدي إلى تقليل الفعالية التحللية للذيفان ومن ثم تثبيط قدرته على احداث الثقوب في جدران الخلايا. وقد أشار الباحث Suárez وجماعته [21] الى ان استخدام مادة CD-cholesterol ادى إلى تثبيط فعالية α- hemolysinمن خلال تغليف المستقبلات الخاصة بالذيفان والالتصاق بجدار الخلية ومنع وصول الذيفان إليها من دون أن تؤدي إلى قتل البكتريا (Not bacteriocidal). وكما اوضح الباحث Ragle وجماعته [22] ان مادة CD تثبط عمل الذيفان بسبب تناسب حجم مادة CD مع حجم جزيئة الذيفان وكما اشار الباحث نفسه الى أن تأثير PBS أقل من تأثير بقية المواد التي تم استخدامها في دراسته لتثبيط فعالية ذيفان الهيمولايسين بسبب تعادل المادة وعدم تأثيرها في الخلايا.

التحري عن تأثير المثيسلين وال PBS وCD-Cholesterol وCyclodextrin و cholesterol في انتاجية ذيفان α- hemolysin

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول-1 ان تاثير المواد الكيميائية اعلاه ابدت تاثيرا واضحا في انتاجية الذيفان حيث كانت مادة CD-Cholesterol لها القدرة على التاثير في انتاجية الذيفان حيث توقف التحلل لكريات الدم الحمراء للارنب معيار التحلل Titer = 67.108.864 في حين كان معيار التحلل لمادة الكولسترول Titer = 549.755.813.888 وكان معيار التحلل لمادة CD

Titer = 274.877.906.944 اما مضاد المثيسيلين فقد كان معيار التحلل Titer = 576.460.752.303.360 واخيرا مادة PBS فكان تاثيرها اقل من المواد اعلاه حيث كان معيار التحلل يساوي 3.96140812E+25 ومن النتائج نلاحظ ان مادة PBS تدخل ضمن المسار الايضي للبكتريا ومن ثم فان وجود مادة PBS لاتؤثر في اعداد الخلايا او تكاثرها او على انتاجية الذيفان اي ان الخلية تتصرف بحيوية دون اي تاثير على مسارها الايضي. يمكن تفسير النتائج اعلاه بان الخلية البكتيرية استغلت المادة الغذائية Dextrose الموجودة في الوسط Tryptic Soya Broth ومن ثم لجات الى بعض المواد الموجودة في الوسط (المواد المضافة اعلاه) في مسارها الايضي وبعد 24 ساعة من الحضن عندما اخذ الراشح لغرض التحري عن انتاجية الذيفان فان الراشح كان يحوي على المواد اعلاه (كلا على حدة) والتي عملت على الارتباط بمستقبلات الخلايا على سطح كرات الدم الحمراء للارنب وذلك بسبب قدرة هذه المواد على التنافس مع مستقبلات الذيفان في سطوح الخلايا الهدف كما مر سابقا. أوضح Girard *et.al* [17] ان هناك عزلات قليلة استطاعت أن تنتج ذيفان α–hemolysin ثلاثين مرة اكثر بوجود (10) ml\µg من المثيسلين اكثر من غيابه وقد أشار Karginove وجماعته [23] إلى أن مادة CD تتكون من عدد من وحدات الكلوكوز وهذه المادة تدخل ضمن المسار الأيضي للبكتريا فيما لو استخدم لوحده عند نفاذ المواد الغذائية في الوسط الزرعي. . وهذا يتوافق وما جاء به الباحث Karginov [24] من أن وجود مادة CD في الوسط البكتيري يساعدها في النمو ويدخل ضمن مسارها الأيضي. وقد بين المصدر [25] أهمية الكولسترول Cholesterol ضمن المسار الأيضي للبكتريا فهو يدخل في تكوين الغشاء البلازمي وإن أي نقص في الكولسترول يؤدي إلى حدوث تغير في المسار الأيضي للبكتريا، وعند نقص المواد الغذائية تستخدم البكتريا الكولسترول كمصدر للكاربون والطاقة. وقد أشار المصدر [26] أن مادة الكولسترول تتنافس مع مستقبلات ذيفان α– hemolysin وهي (cavedin) التي تكون موجودة ضمن موقع صغير من الغشاء البلازمي تدعى lipid raft وهي عبارة عن (microdomin) وأن وجود الـ Cholesterol في الوسط الزرعي يجعل التنافس اشد على المستقبلات ومن ثم يؤدي إلى عدم ارتباط الذيفان بهذه المستقبلات والتأثير في فعاليته التحللية للخلايا الحساسة له.

الجدول 1– تأثير المواد المستخدمة في فعالية وانتاجية ذيفان α–hemolysin

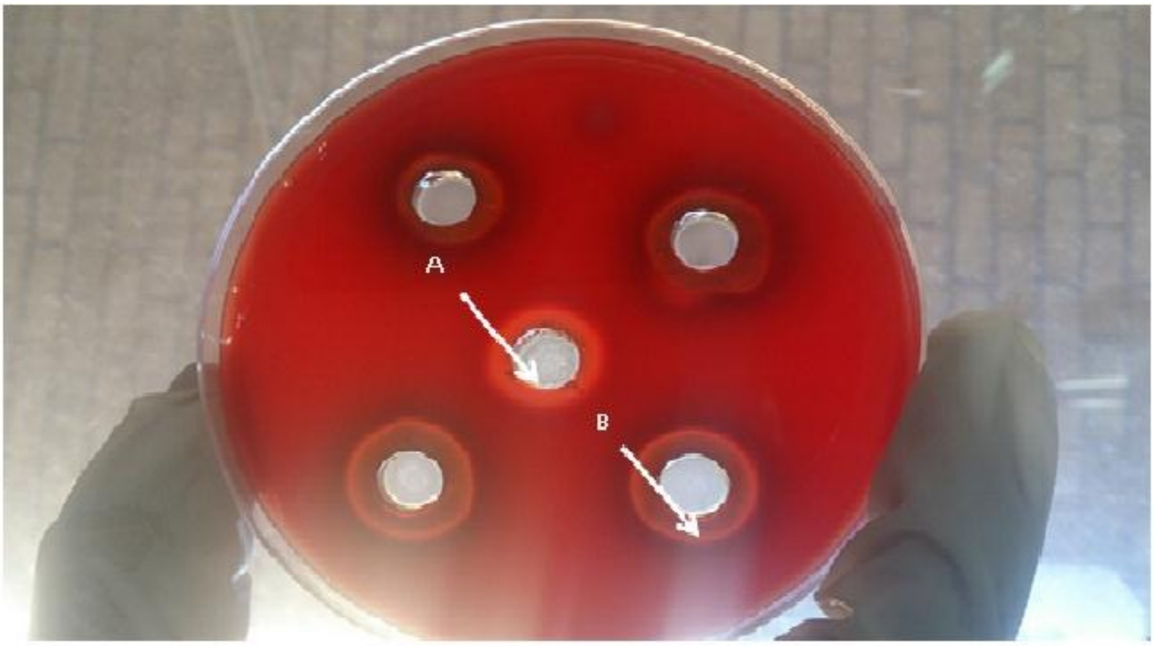
المادة	التأثير في الانتاجية معيار التحلل (Titer)	التأثير في الفعالية معيار التحلل (Titer)
CD-Cholesterol	67.108.864	8
Cholesterol	549.755.813.888	32.768
CD	274.877.906.944	65.536
Methicillin	576.460.752.303.360	140.737.488.355.32
PBS	3.96140812E+25	4.72236648E+18

استخلاص الذيفان

استخدم الترسيب بكبريتات الامونيوم كخطوة أولى في تنقية الذيفان ،إذ أن استخدام كبريتات الامونيوم في عملية الترسيب تعمل على تحويل البروتينات الموجودة ضمن المحلول إلى جزيئات غير ذائبة بسبب معادلة الشحنات المنتشرة على سطح البروتين بفعل ظاهرة التمليح الخارجي للبروتين (Salting out of protein)، إذ تقوم ايونات الملح بسحب جزيئات الماء من البروتينات وينفصل البروتين عند تعادل شحنات ايونات الملح مع شحنات جزيئات البروتينات مما يؤدي إلى انخفاض ذوبان البروتينات وبالتالي ترسيبها. [27] وقد أشار [28] إلى استخدام كبريتات الامونيوم لترسيب البروتينات بنسبة اشباع 60% اذ استخدم كبريتات الامونيوم للترسيب كخطوة أولى في تنقية البروتينات .

فعالية الذيفان (المنقى جزئياً والخام) على تحلل كريات الدم الحمراء

لوحظ حدوث تحلل واضح حول الحفر الحاوية على الذيفان المنقى جزئيا وكانت بقطر (15) ملم كما وتم ملاحظة التحلل حول الحفرة الحاوية على الذيفان الخام وكانت بقطر(13) ملم كما في الشكل-1 ويعزى ظاهرة تحلل الدم إلى قدرة ذيفان α – hemolysin على تحلل الكريات الحمراء.



الشكل 1- قدرة الذيفان على تحلل الدم : (A) الذيفان الخام -(B) الذيفان المنقى جزئيا

تثبيط فعالية الذيفان داخل قرنية عين الارنب

اختيرت قرنية عين الارنب في اختبار فعالية الذيفان لأن الخلايا المكونة لنسيج قرنية العين تتميز بكونها ذات محتوى دهني عال وخاصة في الارانب الصغيرة السن، ومن المعروف ان الذيفان يمتاز بألفته العالية للخلايا ذات المحتوى الدهني العالي حيث يمكن ملاحظة تأثير الذيفان على خلايا القرنية بصورة اوضح إذ يستطيع الذيفان ان يرتبط بهذه الخلايا عن طريق طبقات الدهن lipid raft [26] كما واختيرت المادة الاكثر فعالية في التأثير على فعالية الذيفان في المختبر والتي تمثلت بمادة CD- Cholestrol وذلك من أجل تثبيط فعالية الذيفان في داخل الجسم الحي للتقليل من تآكل القرنية حيث كان قطر التاكل 4 mm وهي اصغر بكثير من المنطقة المتكونة في العين المحقونة بالذيفان المنقى جزئيا والتي كان قطرها 8 mm بعد 8 ساعات من الحقن في قرنية عين الارنب، الجدول-2 يوضح اقطار التآكل الحاصلة في القرنية بعد 2، 4، 8 ساعات من الحقن. اكد McCormik [12] *et.al*أيضاً أهمية مادة CD- Cholestrol في التقليل من فعالية ذيفان الفا-هيمولايسين بعد حقن قرنية عين الارانب بالذيفان وظهور مناطق تآكل القرنية بشكل طبقة بيضاء تغطي القرنية.أوضح [29] قدرة مادة CD- Cholesterol في تثبيط فعالية الذيفان خارج الجسم الحي وداخله عند استخدامها في قرنية عين الارنب وذلك بسبب قدرة هذه المادة على التنافس على الارتباط بمستقبلات الذيفان واحاطة تلك المستقبلات والتقليل من فعالية الذيفان التحللية.

الجدول 2- قطر منطقة التآكل في قرنية الارانب المعاملة

CD-cholestrol only	Toxin only	CD-cholesterol + toxin	Time postinjection
-	mm 6	mm 2	2 hours
-	mm 7	mm. 3	5 hours
-	8mm	mm 4	8 hours

علاج اصابة العين بذيفان α- hemolysin باستعمال قطرات CD-Cholesterol

عولجت عين الارنب المصابة بذيفان الالفا -هيمولايسين وذلك من خلال استخدام قطرات من مادة CD-Cholesterol بواقع قطرتين في كل عين بعد مرور(8) ساعات من الحقن بالذيفان وكل 15 دقيقة وفي الساعة التاسعة بعد الحقن تضاف القطرات كل 30 دقيقة الى انتهاء 13 ساعة بعد الحقن وقد لوحظ انحسار المنطقة المتآكلة وقد ظهر ذلك بوضوح من خلال حركة الارانب وانجذابها نحو الطعام بعد ان فقدت هذه الميزة بسبب تآكل القرنية ولم تعد تبصر طريقها او حتى تتحرك من مكانها نتيجة الخلل في الرؤية. وقد تناقصت منطقة تأكل القرنية للعين المحقونة بالذيفان من 8 mm الى 4 mm بعد العلاج بمادة CD-Cholesterol كما في الشكل-2. وهذا يتوافق مع ما توصل اليه الباحث [12] اذ بين اهمية مادة CD-Cholesterol في علاج عين الارانب المصابة

بذيفان الفا- هيمولايسين وانحسار منطقة تاكل القرنية من 7.30 mm الى 3.73 mm وتقليل الاصابة البكتيرية ، كما وبينت هذه الدراسة ان هذه المادة مثبط فعال للذيفان الفا -هيمولايسين من خلال تمكنها من تثبيط التاثير التحللي لكريات الدم الحمراء وكما تبين ان هذه المادة وفرت الحماية لقرنية عين الارنب من خلال احاطة الانسجة وتقليل تاثير السم ، والميكانيكية الممكن حدوثها في فعالية هذه المادة كمثبط للسم هو التنافس على نفس الخلايا الهدف حيث ان هذا التنافس يجعل تناقص في جزيئات السم المرتبطة في الخلايا الهدف وبالتالي تناقص في الخلايا المتحللة من فعل السم .

الشكل 2- العين المصابة قبل وبعد العلاج:(A) قبل العلاج (B) بعد العلاج

المصادر

1. Watkins, R.R., David, M.Z., Salata, R.A.**2012**. Concepts on the virulence mechanisms of methicillin –resistant *Staphylococcus aureus .J Med Microbiol*., 61(9), pp:1179 -1193.
2. Zhu، Y., Fan, X., Zhang, X., Jiang, X., Niu, L., Teng, M., Li, X. **2014.** Structure of Rot, a global regularor of virulence genes in *Staphylococcus aureus. Acta Crystallogr D.Biol Crystallogr.* 70 (9), pp:2467- 2476.
3. Daum, R.S., Spellberg, B. **2012**.Progress towred a *Staphylococcus aureus* vaccine .*Clin. Infect Dis*., 54(4), pp:560 -567.
4. Qiu,J.,Wang,D.,Zhang,Y.,Dong,J.Wang,J.,Niu,X.**2013.**Molcular modeling reveals the novel inhibition mechanism and binding mode of three natural compounds to *staphylococcal* alpha-hemolysin. *Plos one*. 8(11), pp:e80197.
5. Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. **2007**. Baily and Scotts: *Diagnostic Microbiology*.12th edition. Mosby,Inc. Baltimore, USA. , pp: 266-277.
6. Johnson, A.G., Ziegler, R.J., Lukasewyez, O.A., and Hawley, L.B. **2002.** *Board review series microbiology and immunology.* Fourth Edition, Lippincott Williams and Wikins, a Walters Kluwe com., U.S.A. p:88.
7. Tregan, L. and Pulliam, L. **1982.** Staphylococcus, Micrococcus and Aerococcus: *ln Medical Microbiology Laboratory Procedures.* W.B. Saunders Company.
8. Gupta, U., Raderamma, Rati, E.R. and Joseph R**.1998.**Nutritional quality of lactic acid fermented bitter ground and fenugreek leaves.*Int. J. Food Sci. and Nutr.* , 94(2), pp: 101-108.
9. Arana, A. M. , Bierdeman, M .A., Balzli ,C.L., Tang, A., Caballero, A.R., Patel, R., O'Callaghan, R.J.**2014.** Staphylococcus Alpha-Toxin Actionon the Rabbit Iris: Toxic Effects and Their Inhibition. *Curr. Eye Res*. 30, pp:1-9.
10. Rodriguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F., Bille, J, Chryssanthou, E, Cuenca-Estrella, M., Denning, D., & Verweij, P. E. **2003.** Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection.* 9 (8), pp: i-viii.
11. Segel, J.H. **1975**. *Biochemical calculation.* John Wiley and Sons. New York, Chichester, Toronto, Singapore.
12. McCormick ,C.C. , Caballero ,A.R. , Balzli ,C.L. , Tang ,A. ,Ócallaghan ,R. **2009** . Chemical inhibition of alpha – toxin, a key corneal virulence factor of *Staphylococcus aureus. Investigative Optithalmology and Visual Science*, 50 (6), pp: 2848- 2854.

13. Arana, A. M., Bierdeman, M. A., Balzli, C. L., Tang, A., Caballero, A.R., Patel, R., O'Callaghan, R.J.**2014.** Staphylococcus Alpha-Toxin Actionon the Rabbit Iris: Toxic Effects and Their Inhibition. *Curr. Eye Res*. 30, pp:1-9.

14. تركي ، زينة زامل. **2008** . النشاط الهيمولايسيني لبكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من حالات مرضية مختلفة ومقاومتها للمضادات الحيوية . رسالة ماجستير. كلية التربية، بغداد، العراق.

15. الشويخ ، رنا مجاهد عبدالله. **2006** . عزل وتشخيص بعض انواع البكتيريا المسببة لالتهاب الاذن الوسطى المزمن مع دراسة جزيئية لبعض انواعها . رسالة ماجستير .كلية العلوم .الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق .

16. Paul,S.M.,Pasquariello,A.,Kacek,O.,Fisher,A.and Thomson,R. **2004** Direct detection of *Staphylococcus aureus* from adult and neonate nasal swab specimens Using real –time polymerase chain reaction.*J.Mol.Diagn*.6(3), pp:191-196.

17. Girard, L.P., Ceri, H., Gibb, A.P., Olson, M., Sepandj, F**.2010.** MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus in peritoneal dialysis peritonitis. *Perit Dial Int*., 30(6), pp:652-6.

18. Otto, M**. 2014.** *Staphylococcus aureus* toxins.*Curr opin Microiol*.(17):32-37.

19. Pany, S., Vijayvargia, R., Krishnasastry, M.V. **2004.** Caveolin-1-binding motif of alpha-hemolysin: Its role in stability and pore formation .*Bio. Chem. Biopbys Res. Commun*. 322(1), pp:29-36.

20. Vijayvargia, R., Suresh, G.G., Krishnasastry, M.V. **2004.** Functional form of caveolin-1 is necessary for the assembly of alpha-hemolysin .*Bio.Chem.Biopbys Res. Commun*. 324(3), pp:1130-1136.

21. Suárez, D.F., Consuegra, J., Trajano, V.C., Gontijo, S.M., Guimarães, P.P., Cortés, M.E., Denadai, Â.L., Sinisterra, R.D**.2014.**Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/β-cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 1(118), pp: 194-201.

22. Ragle, B.E., Karginov, V.A., Wardenburg.J.B. **2010.** Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Pneumonia with a β-Cyclodextrin. *Derivative.American Socity for Microbiology*. 54(1), pp:298-304.

23. Karginov, V. A., Nestorovich, E. M., Schmidtmann, F. **2007.** Inhibition of *S. aureus* alpha-hemolysin and *B. anthracis* lethal toxin by beta – cyclodextrin derivatives. *Bloory Med. Chem*. 15 (16), pp: 5424 -5431.

24. Karginov, V.A. **2013** .Cyclodextrin derivatives as anti-infectives. *Curr. Opin. Pharmacol*. 13(5), pp:717-25.

25. García, J. L., Uhía, I., and Galán, B**. 2012.** Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb. Biotechnol*, 5(6), pp: 679–699.

26. Lafont, F., Abrami, L. and VanderGoot, F.G. **2004.** Bacterial subversion of lipid rafts .*Current Opinion in Microbiology*, 7(1), pp : 4-10.

27. Sattayasai, N. **2012**. Protien purification, *Chemical Biology*, ISBN. 51, pp: 953-978.

28. Stachowiak, R., Łyżniak, M., Grabowska, M., Roeske, K., Jagielski, T., Bielecki, J., Budziszewska, B.K., Hoser, G., Kawiak, J**.2014.** Cytotoxicity of purified listeriolysin O on mouse and human leukocytes and leukaemia cells. *BMC Biotechnol*. 18(14), pp:77.

29. Weeks, A.C., Balzli, C.L., Caballero, A. R., Tang, A., O'callanghan, R.J**.2012.** Identification and potency of cyclodextrin- lipid inhibitors of *Staphylococcus aureus* –toxin .*Current Eye Research*.,37(2), pp: 87-93.