تأثير الكولسين الخام المستخلص من بكتريا *Escherichia coli* على عملية البلعمة في الزجاج

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

الخلاصة

درست تأثير مستخلص الكولسين الخام المعزول من بكتريا *E. coli* المعزولة من مرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية على عملية البلعمة خارج الجسم الحي (in vitro) وقد بينت النتائج إن تأثير الكوولسين الخام على الخلايا البلعمية وفعاليتها يعتمد بصورة رئيسة على التركيز المستخدم منه، فالتراكيز الواطئة (حسب هذه الدراسة) والتي بلغت (50 مكغم/ مل) لم تؤثر على حجم وشكل الخلايا البلعمة وعلى هجرة تلك الخلايا وقدرتها على إلتهام خميرة الكانديدا المقتولة، بينما حفزت التراكيز (50،100 مكغم/مل) قدرة البلاعم على قتل الخميرة الحية وانتاج آيون السوبر أوكسايد ($\overline{O}_2$)، وعلى العكس من ذلك كان التركيز المرتفع من الكولسين الخام (500مكغم/ مل) قد سبب تثبيطاً واضحاً لفعاليات الخلايا البلعمية التي إختبرت ضمن هذا البحث ومن ثم فهو يسبب تثبيط الاستجابة المناعية.

المقدمة:

الكولسينات مضادات بروتينية تنتج من بعض سلالات بكتريا *E. coli* والانواع الاخرى القريبة من الكتريا المعوية، ذات فعل قاتل (Bactericidal) للسلالات الاخرى من هذه البكتريا والاجناس الاخرى(1). ان آليات عمل الكولسينات تختلف حسب نوع الكولسين وعموماً تشابه عمل المضادات الحياتية (2،3،4،5).

يحتاج البكتريوسين بصورة عامة الى وجود مستقبلات على سطح الخلية الهدف لكي يستطيع أن يعمل وهذا تم إثباته في خلايا بدائية النواة ولكن لا يوجد ما يثبت ذلك في خلايا حقيقية النواة (6). وقد ذكر(7) ان كولسين له تأثيرا" ساماً على خلايا حقيقية النواة، من ناحية اخرى توصل (8) الى أن البكتريوسين *Actinobacillicin* ليس له تأثير علىحيوية الخلايا البيضاء. أما الباحث(9) فذكر ان كولسين E_2 يسبب بتثبيط تكاثر الخلايا الحيوانية *Euglena gracilis* لانه يحطم المادة الوراثية الـ(DNA) لتلك الخلايا، أما حول تأثير البكريوسينات على الخلايا المناعية وبالاخص الخلايا البلعمية فلم نجد الإ القليل جداً المتيسر منها وفيمايخص هذا الموضوع فقد أشارت (10) في دراسة حول تأثير ال pyocin المنتج من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* على الخلايا البلعمية ان لتركيز البايوسين المستخدم في التأثير على تلك الخلايا اهمية كبيرة فالتراكيز العالية منه تسبب تثبيطاً لوظائف الخلايا البلعمية، بينما وجدت(11) في دراسة حول ال Staphyllococcin انه يسبب تثبيط هجيرة البلاعم الفعالة وقلة نسبة البلاعم الفعالة والملتهمة لكن هذا الانخفاض لم يكن معنوياً. ولأجل التعرف على تأثير الكولسين الخام المستخلص من عزلة *E. coli* محلية على عملية البلعمة جاءت هذه الدراسة.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص البكتريا:

جمعت العينات من مرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية، عزلت وشخصت البكتريا وفقاً لما جاء في(12،13).

إستخلاص الكولسين الخام:

تم التحري عن العزلات المنتجة للكولسين من بين عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة بعدها تم إنتخاب عزلة منتجة كفوءة وثم استخلص الكولسين الخام منها وفق طريقة(14) وحسب ما موضح في المخطط (1) وتم قياس فعالية الكولسين بطريقة التنقيط المباشر (Directly spotting method)(15) وحسب تركيز البروتين الكلي فيه حسب طريقة(16)

تحديد سمية الكولسين الخام على الخلايا البلعمية:

إعتمدت طريقة(17) في تحديد سمية الكولسين على الخلايا البلعمية

تأثير الكولسين الخام على شكل وحجم البلاعم:

اعتمدت هذه الطريقة على حضن خلايا البلاعم مع المستخلص بتراكيز عدة ولفترات مختلفة وكما يأتي:

حضر عالق الخلايا البلعمية من صفاق الفئران بتركيز (2×10^6 خلية/ مل) وحسب طريقة (18) المحورة، ثم حضرت تراكيز مختلفة من الكولسين الخام(صفر،50 ،100،300، 500 مكغم/ مل) بوسط RPMI-1640 في انابيب بلاستيكية معقمة، بعدها اضيف (0,5 مل) من عالق الخلايا المحضر الى كل انبوب يحوي (0,5 مل) من الكولسين بالتركيز النهائي المطلوب، حضنت الانابيب بدرجة حرارة (37م) ولفترات زمنية (صفر، 2،4،24،48 ساعة)، بعدها مزجت محتويات الانبوبة بهدوء بوساطة الماصة الدقيقة واخذ (40 مايكروليتر) وفرشت على شرائح زجاجية نظيفة ثم ثبتت بوساطة الميثانول (5-10دقائق) بعدها صبغت بصبغة كمزا (20 دقيقة)، غسلت وتركت لتجف ثم فحصت بعدها بالعدسة الزيتية(×100) لملاحظة تغيير الأشكال والأحجام بالرجوع الى (19). في تثبيط أشكال البلاعم.

كما فحصت الخلايا مباشرةً بعد نهاية مدة الحضن من خلال عمل شرائح زجاجية، حيث اخذ (20) مايكروليتر من كل تركيز ومزج مع حجم مساوي له من صبغة التريبان الزرقاء(0,2%) ثم حضنت (3) دقائق بدرجة حرارة (37 م)، بعدها إخذت قطرة ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وغطيت بغطاء الشريحة (cover) وفحصت بالعدسة (×40) مباشرة لملاحظة أشكال واحجام الخلايا.

وأيضاً وضعت قطرة على شريحة عد خلايا الدم وغطيت بغطاء الشريحة لتحديد عيوشية الخلايا.

عمل مكررات لكل تركيز وبواقع (5) شرائح زجاجية ثابتة للتركيز الواحد.

تأثير الكولسين الخام على هجرة الخلايا البلعمية:

- تحضير وسط الهجرة:- حضر (1,5%) من الاكاروز وأضيف اليه حجم مساو من محلول هانكس الملحي المتوازن ثم إضيف مصل الارنب غير المنشط بتركيز نهائي (10%).

- حضر الكولسين الخام بالتراكيز (50، 100، 300، 500 مكغم/ مل) بوسط (RPMI-1640) بواقع (1 مل) لكل تركيز في انابيب معقمة، ثم إضيفت محتويات كل أنبوب الى (9 مل) من وسط الهجرة المحضر في أطباق بلاستيكية، حرك الطبق بلطف لمجانسة محتوياته، كما أضيف (1 مل) من PBS الى وسط الهجرة كسيطرة سالبة بينما إضيف (1 مل) من المستضد اللانوعي (Phyto heagglutinin,PHA) تركيزه (10 مكغم/ مل) الى وسط الهجرة كسيطرة موجبة.

-تقبت أطباق الاكاروز بعد أن بردت الاطباق في درجة (4 م) وجفت تماماً. وضع (200 مايكروليتر) من عالق خلايا صفاق الفئران (5×10^8 خلية/ مل) في كل حفرة بأطباق الاختبار وبأطباق السيطرة الموجبة والسالبة. بعدها حضنت الاطباق بوجود (5-10%) من غاز CO_2 لمدة (32 ساعة) بعد أنتهاء مدة الحضن ثبتت الخلايا باستعمال الكحول المثيلي لمدة (10 دقائق) ثم رفعت طبقة الاكاروز وأهملت. صبغت الاطباق بصبغة كمزا لمدة (20 دقيقة). فحصت الاطباق بمجهر ضوئي بالقوة (×40) وبمساعدة المسطرة (ocular) لحساب المسافة التي تحركتها الخلايا حيث قيس قطر دائرة المجهر، ثم استخرج عامل منع الهجرة (Migration Inhibition Factor) (MIF) تبعاً لطريقة (20) وحسب القانون الاتي:-

$$MIF = \frac{\text{قطر دائرة الهجرة (ملم) في معاملة الاختبار}}{\text{قطر دائرة الهجرة (ملم) في معاملة السيطرة}}$$

(*) تم معايرة المجهر مسبقاً بوساطة المسطرة العينية ومسطرة المسرح (ocular and stage micrometer)

(*) كررت التجربة مرتان بمعدل طبقين لكل تركيز.

تاثير الكولسين الخام على عملية التهام الخميرة المقتولة في الزجاج:

أعتمدت طريقة (21) المحورة لإجراء هذا الاختبار:

تم تحضير عالق خلايا صفاق الفئران بتركيز (2×10^6 خلية/ مل) كما حضر عالق الخميرة المقتولة بتركيز (8×10^6 خلية/ مل). حضر الكولسين الخام بتراكيز نهائية

قدارها (صفر، 50، 100، 300،500 مكغم/ مل) في أنابيب بلاستيكية معقمة بحجم (0,25 مل) حسب التركيز المطلوب مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج.

اضيف الى كل انبوبة (0,25 مل) من عالق الخلايا البلعمية و(0,25 مل) من عالق الخميرة بنسبة(1: 4)على التوالي و(0,25 مل) من مصل فصيلية دم AB.

حضنت الأنابيب بدرجة حرارة (37 م) في حمام مائي هزاز بسرعة (15 دورة/ دقيقة) لفترات زمنية مختلفة (صفر، 30، 60، 90، 120 دقيقة).

بعد إنتهاء كل مدة زمنية تم تحضير مسحات من كل تركيز على شرائح زجاجية نظيفة بواقع (5) مكررات للتركيز الواحد، تركت لتجف ثم ثبتت بالكحول المثيلي (5-10 دقائق) وصبغت بصبغة كمزا (20 دقيقة) ثم فحصت بالعدسة الزيتية (×100).

وتم عد (200) خلية لحساب معامل الإلتهام (phagocytic Index) وكالأتي:-

$$\text{معامل الالتهام (PI)} = \frac{\text{عدد الخلايا البلعمية الملتهمة}}{\text{عدد الخلايا الكلي (ملتهمة+ غير ملتهمة)}} \times$$

تأثير الكولسين الخام على عملية قتل الخميرة الحية في الزجاج من قبل البلاعم:

إجرى الاختبار وفق طريقة (21) المحورة:

مزج (0,25 مل) من عالق خلايا الصفاق المحضرة مع (0,25 مل) من عالق الخميرة الحية المحضرة مع (0,25 مل) من مصل فصيلة دم AB مع (0,25 مل) من الكولسين الخام المحضر بتراكيز نهائية (صفر، 50، 100، 300، 500 مكغم/ مل) في أنابيب بلاستيكية معقمة، مزجت محتويات كل أنبوب بهدوء وحضنت بدرجة حرارة (37م) في حمام مائي هزاز بسرعة (15) دورة/ دقيقة ولفترات زمنية مختلفة (صفر، 30، 60، 90، 120)دقيقة.

بعد أنتهاء كل مدة زمنية إخذ (200 مايكروليتر) من كل انبوب ووضع في انابيب معقمة (Ependorf tubes) وطرد مركزياً بسرعة (2000) دورة / دقيقة لمدة (10) دقائق (لغرض ترسيب الخلايا البلعمية الحاوية على الخميرة)، وأهمل الراشح الحاوي

على الخميرة غير المبتلعة. ثم أضيف للراسب (0,25 مـل) مـن محلـول ديوكسـلات الصوديوم (2,5%) (لغرض تفجير الخلايا البلعمية والابقاء على خلايـا الخميـرة)، ثـم أضيف (1 مل) من صبغة المثلين الازرق (0,01%) وبعد المزج طرد مركزيـاً بجهـاز (Biophuge) بسرعة (3000) دورة/ دقيقة لمدة (10) دقائق ثم أهمل الراشح مع الابقاء على قطرات منه لتعليق الراسب فيها.

إستخدم عداد خلايا الدم (Haemocytometer) لحساب (200) خلية خميـرة وحـددت الملونة منها وغير الملونة وحسب معامل القتل وفق القانون الآتي:-

$$\text{معامل القتل} = \frac{\text{عدد خلايا الخميرة المقتولة (ملونة)}}{\text{عدد خلايا الخميرة الكلي (ملونة+ غير ملونة)}} \times 1000$$

(*) اعيدت التجربة مرتان بمعدل مكررات لكل تركيز، كما تم تقسيم العمل ليكون تركيز واحد لكل يوم.

تأثير الكولسين الخام في أختزال صبغة النتروبلوتترازوليم (NBT- Test)

استعملت طريقة (22) و كالأتي:-

وضع (0,75 مل) من عالق الخلايا متعددة أشـكال النـوى (PMNS) فـي أنابيـب زجاجية مطلية بالسليكون ثم أضيف اليها (0,75 مل) من الكولسين الخام بتراكيز نهائيـة (صفر، 50،100، 200، 300، 500 مكغم/ مل) (مراعاة الحجم النهائي للمـزيج)، ثـم أضيف الى كل أنبوب (1,5مل) من محلول صبغة (NBT) وعـدت الانبوبـة الاولـى (تركيز صفر) إنبوبة سيطرة كما وحضر مكرران لكل تركيز ثم رجت الانابيب بهـدوء ورفق بين أصبع اليد لمزج محتويات الانبوب مع مراعاة غلقها بأحكام.

حضنت الانابيب بدرجة حرارة (37 م) لمدة (25) دقيقة، بعد انتهاء مدة الحضن نقلت قطرة من كل إنبوبة ونشرت على شريحة زجاجية وثبتت وصبغت بصبغة كمـزا لمـدة (15)دقيقة. حسبت (200) خلية لاستخراج النسبة للخلايا الموجبة للفحص الحاوية علـى حبيبات الفورمازات الزرقاء الداكنة.

التحليل الاحصائي:

حللت نتائج الاختبارات إحصائياً باستعمال (T-test) وتم تحليل التباين باتجاه واحد (Anova- test) فضلاً عن أستخدام (LSD) للتحري عن وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة عند مستوى معنوي (5%).

النتائج والمناقشة

تأثير الكولسين الخام على أشكال وأحجام البلاعم:

يظهر من النتائج الموضحة في الجدول (1) عدم امتلاك الكولسين الخام أي تأثير ايجابي في تغيير شكل وحجم البلاعم المعرضة له، وتوصلنا كذلك الى ان المدة الزمنية التي تتعرض فيها الخلايا البلعمية للكولسين الخام لها أثراً واضحاً في عيوشية تلك الخلايا.

ان عيوشية تلك الخلايا البلعمية بلغت (95%) بعد مرور (4:2) ساعات من تعرضها للكولسين الخام بتراكيز (50مكغم/ مل) وبفروق غير معنوية مقارنة مع معاملة السيطرة، وان الخلايا ذات الشكل وحجم طبيعي بعد ساعتان نجدها (5%) منها كبيرة الحجم و(2%) ممتدة بعد (4) ساعات أما بعد (48,24) ساعة فقد يحصل إنخفاضاً معنوياً في العيوشة مع بقاء شكل الخلايا طبيعية.

بدأت العيوشة تنخفض بصورة معنوية ($P<0.05$) عند أرتفاع تركيز الكولسين الخام لتصل الى (55%) عند التركيز (55مكغم/ مل) بعد مرور ساعتين ويظهر تغير حجم الخلايا فتبدو أصغر حجماً، وتزداد هذه التأثيرات عند زيادة المدة الزمنية كما يوضح الجدول(1).

ونستنتج من ذلك إن هناك علاقة طردية بين كل من التركيز والوقت حيث يزداد التأثير السلبي عند زيادة التركيز والوقت. أما الانخفاض الكبير في العيوشية وانكماش الخلايا وتحطمها عند أرتفاع التركيز (500مكغم/مل) وطول المدة الزمنية (48) ساعة التي تتعرض فيها الخلايا للكولسين، فقد يكون بسبب حدوث صدمة أزموزية للخلايا او إنه قد أثر على عملية صنع البروتين فيها أو حطم مادتها الوراثية مما نتج عنه ذلك التأثير.

تأثير الكولسين الخام على هجيرة الخلايا البلعمية:-

يوضح الجدول (2) تأثير الكولسين الخام على هجرة الخلايا البلعمية وعامل تثبيط الهجرة (MIF) تم بعد ذلك مقارنة قيم الـ (MIF) مع القيم القياسية المعتمدة حسب ما ورد في (23) وهي كالأتي:-

(صفر ← 0,8) تثبيط الهجرة

(0,8 ← 1,2) ضمن المعدل الطبيعي للهجرة

(1,2 ← 2) تحفير الهجرة

تظهر النتائج في الجدول (2) إن التركيز (50، 100مكغم/ مل) من الكولسين الخام أدت الى زيادة في قطر دائرة الهجرة حيث بلغت (20,05 ، 21,3 ملم) على التوالي لكن مع ذلك لم تكن هذه الزيادة معنوية ($P>0.05$) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (19,5 ملم) ، أما عند أستعمال التراكيز (300-500مكغم/ مل) فانها سببت إنخفاضاً معنوياً في قطر دائرة الهجرة (16,12 ، 13ملم) على الترتيب. والآن لو لاحظنا قيم عامل تثبيط الهجرة فسنجد ان معاملة الخلايا بالتراكيز (50 ، 100 ، 300 مكغم/ مل) من الكولسين الخام أبقت قيم الـ (MIF) ضمن الحدود الطبيعية (1,058، 1,092، 0,826) على الترتيب بالمقارنة مع القيم القياسية بالرغم من ان بعضها رفع قيمة قطر دائرة الهجرة والاخرى قللت من هذه القيمة، اما التركيز (500مكغم/ مل) فقد بلغت قيمة الـ (MIF) له (0,666) أي انه ثبط قدرة الخلايا على الهجرة.

نستنتج ان تأثير الكولسين الخام اعتمد بصورة أساسية على التركيز المستخدم كما وأن الخلايا البلعمية (غير المعاملة) لها القدرة على الهجرة بصورة عشوائية تحت إنعدام المؤثرات الجانبية سواء كانت محفزات او مثبطات، كما إن الـ (PHA) له القدرة على تثبيط هجرة البلاعم من خلال تحفيزه أفراز الـ (MIF) من الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة (TH).

وكما هو معروف ان السائل البريتوني للفئران لا يحوي خلايا(M ∅) فقط وأنما نسبتها تكون (84- 91%) فضلاً عن وجود الخلايا اللمفاوية بنسبة (9-16%) والخلايا المحببة (1%)[24]، لذا فأن الكولسين الخام المستعمل يؤثر على الخلايا اللمفاوية التائية بصورة رئيسة ثم ينعكس ذلك على هجرة البلاعم.

وعند مقارنة النتائج مع الدراسات الاخرى وجدنا إنها توافقت بصورة عامة مع ما توصلت اليه(15) أما (11) فوجدت إن الـ Staphyllococcin الخام سبب تثبطاً واضحاً لهجرة البلاعم الصفاقية.

كما ويمكن ان نأخذ بنظر الاعتبار إحتمالية إن الكولسين الخام المستعمل قد حفز على أفراز نواتج اخرى في الوسط قد تكون تداخلت مع عمل الخلايا اللمفاوية أو أثرت في هجرة البلاعم.

تأثير الكولسين الخام على عملية التهام الخميرة المقتولة في الزجاج.

من خلال التحليل الاحصائي لنتائج هذا الاختبار وجد إن هناك ترابطاً بين كل من معاملات الوقت وتراكيز الكولسين الخام المستعمل فلزيادة تركيز الكولسين الخام تأثير معنوي على عملية التهام الخميرة مع مرور الوقت وكما هو موضح في الجدول(3).

نلحظ من النتائج إن استعمال التركيز (50مكغم/ مل) من الكولسين الخام أظهر ان هناك أنخفاضاً طفيفاً في معامل الالتهام لكنه غير معنوي ($P>0.05$)، أما عند زيادة التركيز الى (100، 300، 500مكغم/ مل) فوجد إن له أثراً ملحوظاً في خفض (PI) وبفروق معنوية ($P<0.05$) مقارنةً مع معاملات السيطرة وبأختلاف الفترات الزمنية.

كما وأظهرت النتائج وجود فروق معنوي عند مقارنة المعاملات مع بعضها (50، 100، 300، 500مكغم/ مل) حيث ترتبط بعلاقة عكسية، فكلما زاد تركيز الكولسين الخام المستعمل كلما قل (PI) باختلاف المدة الزمنية.

جاءت هذه النتائج متوافقة في إطارها العام مع ما توصلت اليه (10) حول تأثير البايوسين النقي على عملية الالتهام، بينما تعارضت النتائج مع دراسة (11) حيث أن الـ Staphyllococcin ليس له تأثيراً معنوياً على عملية الالتهام في الزجاج. بينما ذكر(25)، (26) إن كولسين (7) ربما يثبط عملية بلعمة بكتريا *E.coli* بوساطة البلاعم الصفاقية للفئران في الزجاج وكذلك بين (27) بان البكتريا المنتجة للكولسين تستطيع مقاومة عوامل المصل القاتلة وكذلك تقاوم البلعمة. أما الباحث (28) أوضح إن تأثير الكولسين على عملية البلعمة غير معروف، ومن المحتمل انه يعتمد على نوع الكولسين.

ومن خلال ما سبق ذكره، يمكن أن يعزى سبب إنخفاض النسبة المئوية للخلايا البلعمية

الملتهمة للخميرة بوجود التراكيز المرتفعة من الكولسين الخام الى عدد من التفسيرات المحتملة:

فالكولسين قد لا يسبب كبحاً في فعالية وكفاءة الخلية البلعمية وانما قد يكون لإلتصاق الكولسين بالخلية دوراً غير مباشر في منعها من أحاطة الجرثومة وابتلاعها، أو ربما يرتبط بمستقبلات البلاعم (Fc,C_3d,C_3b) ويحدد عملها واحتمال آخر إنه يثبط عملية الطهي (opsonization) من خلال ارتباطه مع العوامل الطاهية في المصل ومن ثم بمنع من ارتباط تلك العوامل بمستقبلاتها على سطح الخلية البلعمية(7). فربما أحد هذه الاحتمالات أو مجموعها هو السبب في حصولنا على أنخفاض في معامل البلعمة، أو وجود اسباب اخرى لازالت غير معروفة.

تأثير الكولسين الخام على عملية قتل الخميرة الحية في الزجاج.

في دراستنا هذه تم تقصي قدرة البلاعم على قتل الخميرة الحية تحت تأثير تراكيز مختلفة من الكولسين الخام ولفترات زمنية متعددة ومنها توصلنا الى النتائج الموضحة في جدول (4).

ظهر من النتائج إن هناك أرتفاعاً معنوياً ($P>0.05$) في معامل القتل عند المعاملة بالتراكيز (50-100مكغم/ مل) من الكولسين الخام مقارنةً مع معاملات السيطرة وبعد مرور (30، 60، 90، 120) دقيقة، أما التركيز (500مكغم/ مل) فانه سجل إنخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) بمعامل القتل مقارنة مع السيطرة، كما وجدت فروقاً معنويةً مسجله بمعامل القتل عند مقارنة التراكيز المختلفة مع بعضها وبمرور المدة الزمنية.

وجد (29) في دراسته ان الكولسين الخام يتمكن من تحفيز وزيادة الفعاليات التأكسيدية للخلايا البيضاء في الزجاج وتوصل كل من (23)، (28) الى النتائج نفسها.

تدل النتائج التي توصلنا اليها على ان الكولسين في تراكيز معينة حفز فعالية البلاعم في قتل الخميرة الحية ولهذه العملية أهمية بالغة في حماية الجسم حيث تعتبر عملية قتل الجراثيم عن طريق الخلايا البلعمية خطوة أساسية كخط دفاعي أولي غير متخصص ضد المسببات المرضية، فاذا ماتغلبت عليها انتهت الاصابة واذا تم العكس فسوف يؤدي الى غزو وإنتشار الممرضات للجسم.

تأثير الكولسين الخام على أختزال صبغة النتروبلوتترازوليم (N.B.T):

إشارت النتائج الموضحة في جدول رقم (5) الى وجود ارتفاع في النسبة المئوية للخلايا المكونة لجبيبات الفورمازون والمعاملة بالكولسين الخام بالتركيز (50، 100، 300 مكغم/مل) حيث بلغت (26,4، 29,1، 31،8) على التوالي مقارنة" مع معاملة السيطرة (23,8). أما المعاملة بالتراكيز (500 مكغم/مل) فسببت أنخفاضاً معنوياً كبيراً في النسبة المئوية للخلايا المكونة لحبيبات الفورمازان (17,5) مقارنةً مع السيطرة.

اتفقت نتائجنا من نتائج (10) وكذلك مع ما توصل اليه (30) حول كولسين E_3 الذي وجد إنه يحفز البلاعم على إختزال صبغة (NBT) وهذا التأثير يعتمد بصورة مباشرة على التركيز المستعمل من الكولسين.

جاءت هذه النتائج لتدعم نتائج فحص قتل الخميرة الحية جدول(4) فالسبب في زيادة معامل القتل هو إرتفاع كفاءة الخلايا عن أنتاج العوامل القاتلة وبالاخص ($\overline{O}_2$ المتحرى عنه) عن طريق الفعاليات التأكسدية عند إستعمال التراكيز (50، 100، 300 مكغم/ مل) من الكولسين الخام.

المصادر

1. Smajs, D.; Pilsl, H. and Braun, V.(1997). J. of Bacteriol., 179: 4919-4928.
2. Wiener, M.; Freymann, D.; Ghosh, P. and Straud, R.M. (1997).. Nature, 385: 461-4.
3. Riley, M.(1993). Mol. Biol. Evol., 10: 1380-1395.
4. Masaki, H.; Ogawa, T.; Tomita, K.; Ueda, T.; Watanabe, K. and Uozumi, T. (1997). Nucleic- Acids-symp-ser, 37:287-8.
5. Braun, V.; Gaisser, S.; Glaser, C.; Harkness, R.; Ölschäger, T. and Mende, J. (1992). Import and Export of colicin M. Nato ASIseries H_{65}: 226-242.
6. Saito, H. and Watanabe, T. (1979). Cancer Res., 39: 5114-7.
7. Waters, V.L. and Crosa, T.H. (1991). Microb. Rev., 55: 437-450.
8. Hammond, B. F.; Lillard, S. E. and Steuens, R.H. (1987). Inf. And Imm., 55: 686-691.
9. Smarda, J. ;Ebringer, L. and Mach, J. (1975). J. Gen Microbiol., 86: 363-6.

10. عيسى، رجوة حسن (1986)، دراسات كيميائية حياتية وراثية على البايوسين (R) وتأثيراته على عملية البلعمة. رسالة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد.

11. بهجت، شبابة عبد اللطيف (1983). أنتاج البكتريوسين الخام في بكتريا *staphyllococus aureus* وتأثيره على عملية البلعمة في الزجاج. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

12. 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.

13. Mahon, C.R. and Mannselis, G.J. (1995). Textbook of diagnostic microbiology. W.B. Saunders Company.

14. Herschman, H.R. and Helinski, D.R. (1967). The J. of Biological chemistry, 242: 5360-8.

15. Pilsl, H. and Braun, V. (1995). J. of Bacteriol., 177: 6966-6972.

16. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chemical., 193: 265-275.

17. Nonoyama, S.; Kojo, H.; Mine, Y.; Nishida, M.; Gota, S. and Kuwahara, S. (1979). Infect. Immun., 24:399-403.

18. Weber, B.; Nickol, M.M.; Tagger, K.S. and Saelinger, C. B. (1982). Cells. Can. J. Microb., 28: 679-685.

19. Crowle, A. J. and May, M. (1978). J. of the Reti Cuioendothelial Society, 24: 169-185.

20. Federlin, k.; Maini, R. N.; Russell, A.S. and Dumonda, D. C. (1971). J. Clin. Path., 24: 533-6.

21. Cech, P. and Lehrir, R. I. (1984). Blood, 64:146-151.

22. Metcalf, J.; Nauseef, W. and Root, A. (1986). Transduction mechanisms receptor expression. In Laboraory Manual of Neutrophil Function. Raven Press. New yourk pp: 78-79.

23. Bures, J.; Horak, V.; Buresova, E.; Fixa, B., Komarkova, O. and Hartman, M. (1986). Colicinogeny in chronic Inflammatory Bowel Disease. Scand. J. Gastroenterol., 21: 819-823.

24. Rosseau, S.; Guenther, A; Seeger, W. and Lohmeyer., J. (1997). J. of Infect. Disease., 175: 421-8.

25. Quackenbush, R.L. and Falkow, S.(1979). Relation-ship between colicin V Activity and virulence in *Escherichia coli*. 24:562-4.

26. Darken, J. and Savage, D.C. (1987). Infec. and Immu.; 55: 2483-9.
27. Bounous, D.I.; Wooley, R. E. and Brown, J. (1994). Avian Disease; 38: 135-140.
28. Lingwood, (1998). Personal communication.
29. Hardy, K. G. (1982). Bacteriocins. In "Experimental Microbial Ecology". 1st ed. By Burns and Slater, chapter 21. (368-377).
30.Lokaj, J.; Smarda. and Mach, J. (1982). Exp., 38: 1352-3.

جدول (1) تأثير الكولسين الخام على شكل وحجم البلاعم المعرضة له بفتـــرات زمنيـــة مختلفة:

تركيز الكولسين مكغم/ مل	تأثير الكولسين الناتج باختلاف الفترة الزمنية/ (ساعة)			
	2	4	24	48
صفر	ع= 97,4 ± 1,8 خلايا ذات حجم وشكل طبيعي a A	ع= 97 ± 1 خلايا ذات حجم وشكل طبيعي a A	ع= 93,5 ± 1,5 (5%) خلايا ذات حجم كبير وشكل طبيعي a B	ع= 87,91 ± 2,12 خلايا ذات حجم وشكل طبيعي a C
50	ع= 95 ± 2 خلايا ذات حجم وشكل طبيعي a A	ع= 95,3 ± 1,3 (5%) خلايا ذات حجم كبير مجعدة السطح ومحببة a A	ع= 91 ± 1,72 (7%) خلايا كبيرة الحجم a B	ع= 87 ± 1,32 خلايا ذات حجم وشكل طبيعي a C
100	ع= 84,5 ± 1,5 (7%) ذات حجم كبير 2% ممتدة b A	ع= 81,23 ± 2 5% ذات حجم كبير 2% ممتدة محببة b A	ع= 75,31 ± 1,24 لا يوجد تغير بالشكل b B	ع= 63,2 ± 1,86 حصل تغير بحجم الخلايا فظهرت اصغر حجما b C
300	ع= 72,15 ± 1,07 (1%) ذات حجم كبير (0,5)% ممتدة c A	ع= 67,3 ± 1,13 خلايا صغيرة الحجم c B	ع= 61,2 ± 2,0 خلايا صغيرة الحجم c C	ع= 51,35 ± 1,16 خلايا صغيرة الحجم مع وجود بقايا خلايا c D
500	ع= 55 ± 1 خلايا صغيرة الحجم d A	ع= 51,72 ± 1,24 خلايا صغيرة الحجم d B	ع= 22,19 ± 1,81 انكماش حجم الخلايا مع وجود بقايا خلايا d C	ع= 7,69 ± 1,13 انكماش حجم الخلايا مع وجود بقايا خلايا d D

ع= النسبة المئوية للعيوشية (المعدل ± الانحراف المعياري)

- الاحرف الانكليزية الصغيرة المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنويـــة ($P>0.05$)/ مقارنـــة بـــين المعاملات المختلفة لكل عمود

- الاحرف الانكليزية الكبيرة المتشابهة دلالة على عدم وجود فـــروق معنويـــة ($P>0.05$)/ مقارنـــة بـــين الاوقات المختلفة لكل صف بتأثير تركيز الكولسين المستعمل.

جدول (2) تأثير الكولسين الخام على هجرة الخلايا البلعمية تحت الاكاروز وMIf

تركيز الكولسين مكغم/ مل	قطر منطقة الهجرة (ملم) المعدل ± الانحراف المعياري	عامل تثبيط الهجرة (Mif)
صفر (السيطرة السالبة) (N.S)	a 1,93 ± 19,5	1
50	a 2,16 ± 20,65	1,058
100	a 1,77 ± 21,3	1,092
300	b 1,24 ± 16,12	0,826
500	C 2,31 ± 13	0,666
PHA (السيطرة الموجبة)	C 2,66 ± 12	0,615

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية (P>0.05)

جدول (3) تأثير الكولسين الخام على عملية التهام الخميرة المقتولة في الزجاج

تركيز الكولسين مكغم/ مل	معامل البلعمة (المعدل ± الانحراف المعياري) بفترات زمنية مختلفة (دقيقة)				
	صفر	30	60	90	120
صفر	1,3 ± 68,8 a	1,3 ± 68,8 A	1,3 ± 68.8 a	1,3 ± 68,8 a	1,3 ± 68,8 a
50	1,8 ± 67,13 a	1,35 ± 74,1 A	1,5 ± 75,9 a	1 ± 80.43 a	0.36 ± 64.8 a
100	2 ± 67 a	0.78 ± 70.5 B	2.16 ± 73.5 a	0.75 ± 77.9 b	0.81 ± 61.06 b
300	1.8 ± 59.9 b	1.4 ± 61.7 C	1 ± 59 b	1.05 ± 54.2 c	0.62 ± 38.3 c
500	1.11 ± 40 c	1.67 ± 35.8 D	1.73 ± 29 c	0.8 ± 23.86 d	1 ± 25 d

جدول (4) تأثير الكولسين الخام على عملية قتل الخميرة الحية في الزجاج

تركيز الكولسين مكغم/ مل	معامل القتل (المعدل ± الانحراف المعياري) بفترات زمنية مختلفة (دقيقة)				
	صفر	30	60	90	120
صفر	1,25 ± 15.3 a	2 ± 25 A	2.13 ± 34 a	1.04 ± 45.3 a	0.75 ± 29.23 a
50	1.32 ± 15.5 a	1 ± 27 A	0.5 ± 37.5 b	1.85 ± 49.1 b	1.73 ± 33 b
100	1.04 ± 16.1 a	1.44 ± 31.4 B	1.67 ± 40.3 b	2.3 ± 5 c	2 ± 36 b
300	1.73 ± 14 a	2 ± 30 B	1.74 ± 37.53 b	1.56 ± 50 b	1.73 ± 25 c
500	1.65 ± 11.1 b	1 ± 20 C	2 ± 29 c	1 ± 25 d	2.05 ± 19 d

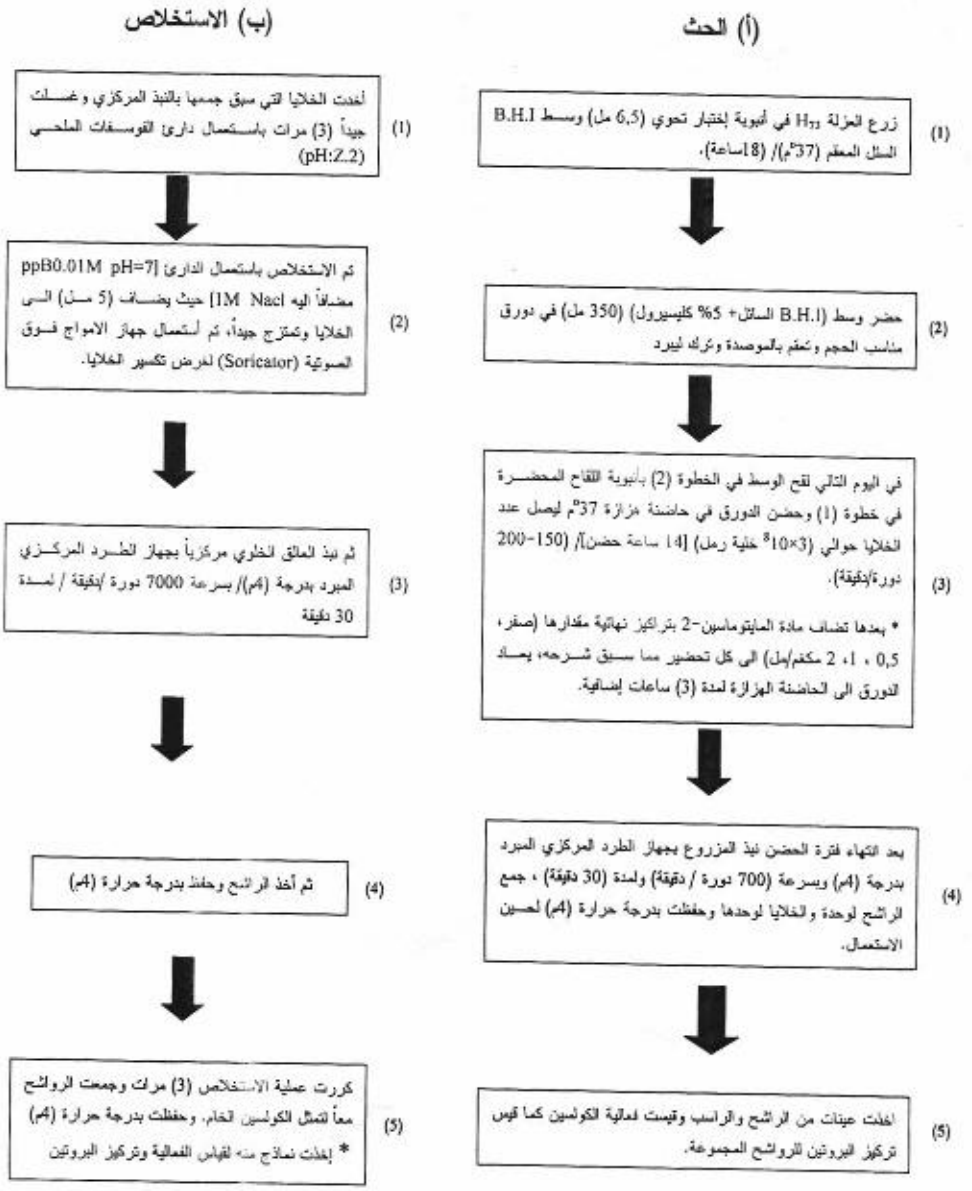
الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية (P>0.05)/(مقارنة بين المعاملات المختلفة لكل عمود).

جدول (5) تأثير الكولسين الخام على أختزال صبغة (NBT)

تركيز الكولسين مكغم/ مل	النسبة المئوية للخلايا المكونة للفورمازان (المعدل ± الانحراف المعياري)
صفر	3.85 ± 23.8 a
50	3.3 ± 26.4 ab
100	2.69 ± 29.1 bc
300	2.84 ± 31.8 c
500	3.5 ± 17.5 d

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية (P>0.05)

مخطط (1) حث وأستخلاص الكولسين الخام



IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI. VOL.19 (2) 2006

Effect of Crud Colicin Extracted From *Escherichia coli* on Phagocytosis in Uitro

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

Abstract

The effect of crude colicin extracted from *E. coli* isolated from urinary tract infection patients on phagocytosis in vitro was studied . Results showed that the effect of crude colicin on phagocytic cells and their activities were concentration dependent. Low concentration (50 Mg/ml) have no significant effect ($p>0.05$) on shape, size, migration and engulfment activity of phagocytic cells, while (50, 100 Mg/ml) enhanced killing activity and increase superoxide ($\overline{O}_2$) production as indicated by (NBT) test. But high concentration (500 mg/ml) of crude colicin caused inhibition of phagocytic cells activities, that leads to inhibition in non-spesfic immunity.