دراسة تأثير البروتينات الذائبة(Sp2,Sp1) المستخلصة من الجرثومة المتقلبة*Proteus mirabilis* على فعالية انظيم سوبر اوكسايددزميوتيزفي مصل الأرانب البيض

لمى صلاح الدين العبد الواحد
قسم علوم الحياة ،كلية التربية –ابن الهيثم ، جامعة بغداد

الخلاصة

هدف البحث الى دراسة تأثير جزء من الخلية الجرثومية في الاستجابة المناعية الذاتية،اذ تم استخلاص البروتنات الذائبة لجرثومة جنس المتقلبة*Proteus mirabilis* وهي(Sp2,Sp1) بأستخدام انظيم اللايسوزايم.قسمت الارانب على ثلاث مجاميع :المجموعة الاولى حقنت ب(Sp1) والثانية ب(Sp2) اما الثالثة فحقنت بمحلول الملح الفسلجي وكانت تمثل مجموعة السيطرة، لمدة اربع اسابيع بمعدل جرعة واحدة كل اسبوع.قيس مستوى انظيم سوبر اوكسايد دزميوتيز في امصال الارانب ابتداء من الاسبوع الثاني من الحقن وحتى الاسبوع السادس،وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود زيادة معنوية عند مقارنة مجموعة الارانب المحقونة ب(Sp1)مع مجموعة السيطرة وبلغ أعلى ارتفاع في المعدل عند الأسبوع الخامس من الحقن(42.828±4.761) (وحدة عالمية/لتر بروتين)مقارنة مع معدل مجموعة السيطرة(6.25±0.405) (وحدة عالمية/لتر بروتين).كما نوحظ وجود ارتفاعا معنويا في معدل فعالية انظيم سوبر اوكسايد دزميوتيزفي أمصال الأرانب المحقونة ب(Sp2) مقارنة بمجموعة السيطرة، اذبلغ اعلى معدل لها في الاسبوع الرابع من الحقن(45.801±2.721) (وحدة عالمية/لتر بروتين).

مناعية ذاتية (AutoimuneAutoimmune response)(1)،تتوسطها بعض الحركيات الخلوية(Cytokine) والتي تأثرت مورثات (genes) الخلايا المنتجة لها نتيجة زيادة سمية ايض الأوكسجين(2).أن الشد الاوكسجيني في تلك الخلايا يؤثر في انتاجها لأنظيم السوبر اوكساید دز میوتیز (Superoxidedesmutase;SOD) ،.وضحت الفعالية الأنظيمية للسوبر اوكساید دزميوتيز لاول مرة في عام 969افي كريات الدم الحمر للأغنام من قبل Mc-Cord وFridovich الذي أعطوه هذا الاسم3 اذ يؤدي هذا الانظيم دورا مهما في السيطرة على فعالية الجذور الحرة ([Free radical) (5,4)و تحول جذر الاوكسجين الحر الى بيروكسيدالهيدروجين من خلال دوره كعامل مساعد في هذا التفاعل(7) ،فضلاً عن دوره في تعزيز فعالية القتل الخلوي للجراثيم السالبة لملون غرام داخل الخلايا البلعمية(Macrophage)(8,6) لذلك صممت الدراسة الحالية بهدف تسليط الضوءعلى فعالية الأنظيم (SOD) في امصال الأرانب بعد حقنها بأثنين من البروتينات الذائبة(Spland,SP1,SP2; Soluble proteins)المستخلصة من الجرثومة المتقلبة *Proteus mirabilis*.

المواد طرائق العمل

-عزل جرثومة *P.mirabilis*

عزلت الجرثومة من احد حالات التهاب المجاري البولية(Urinary Tract Infection) باستخدام الأوساط الغذائي حيث شخصت العزلة في مختبر الصحة المركزي /وزارة الصحة العراقية،وقد اكد التشخيص بوساطة طريقة (Api-20E)(9).

- استخلاص البروتينات الذائبة

علقت خلايا الجرثومة بعد تجميدها في محلول السكروز (0.75مولاري)10:1،كسرت الخلايا بوساطة جهاز الذبذبات فوق الصوتية،ثم نبذت مركزيا(6000دورة/دقيقة) لمدة 60دقيقة،بعد ذلك اهمل الراسب،ونبذ المحلول الطافي مرة ثانيةبسرعة(20000دورة/دقيقة)ولمدة 120دقيقة،جمع المحلول الطافي حيث أنه يمثل

البروتين Sp1 .أما الراسب فقدعلق في 50مل من محلول الانظيم الحال(Lysozyme)وحضن العالق(37م)لمدة18ساعة.بعد ذلك نبذالعالق(20000دورة/دقيقة) ولمدة 20 ادقيقة،وجمع المحلول الطافي و الذي يمثل البروتين (SP2) (10).

-الحيوانات المختبرية وطريقة التمنيع

استخدمت ارانب بيضاء (*Oryctolagus cuniculus*)بعمر 6-8 أشهر،جهزت هذه الحيوانات من الكلية الطبية العراقية/جامعةالنهرين.

قسمت الحيوانات على ثلاث مجاميع وكل مجموعة ضمت ثلاث ارانب.حقنت المجموعة الأولى بالمستضد SP1ممزوجا مع معامل الفروند الكامل(C.F.A ;CompleteFreundsAdjuvant)،اما المجموعة الثانية من الارانب فحقنت(SP2+C.F.A) ،اما المجموعة الثالثة فكانت مجموعة السيطرة حيث حقنت بدارئ الفوسفات الفسلجي .حقنت الارانب تحت الجلد (subcutaneous) وبمعدل جرعة واحدة (1ملغم/مل)اسبوعيا ولمدة اربعة اسابيع.

سحب الدم (2مل)من الارانب عن طريق طعنة القلب في الاسابيع(6,5,4,2).بعد تجلط الدم، نبذت العينات للحصول على المصل والذي حفظ في المجمدة(-20م).

-قياس فعاليةالأنظيمSOD

قيست فعاليةالانظيم (وحدة عالمية/لتر بروتين)في مصل الدم باستخدام الطريقة الكيموضوئية المعتمدة على اختزال مادة (Nitroblue tetrazolium) حيث الامتصاصية تحت طول موجي 560نانوميتر (11).حددت الفعالية الانظيميةلSODبدلالة الفرق بين الكثافة البصرية قبل وبعدالاضاءة بالمقارنة مع قيمة السيطرة .وقد أخذت ثلاث قراءات لكل حيوان.

التحليل الاحصائي

عرضت النتائج بهيئة معدل ±الخطأ القياسي،ثم أجريت المقارنة مابين المعدلات باستخدام اختبار (t-test)لتحديد مستوى معنوية الفروقات ما بين معدلات الحيوانات المعاملة وحيوانات السيطرة.

النتائج

قيست فعالية انظيمSODفي مصل الارانب المحقونة ب(1ملغم /مل) تحت غشاء البريتون بمستضد مستخلص البروتينات الذائبة(SP1) من جرثومة *P.mirabilis* بمعدل جرعة واحدة اسبوعيا.واخذت القراءات من الاسبوع الثاني وقد اظهرت النتائج ارتفاعا معنويا في الاسبوع الثاني من مدة الحقن اذ بلغ (10.3±0.67) وحدةعالمية/لتر مقارنة مع مجموعة السيطرة والتي بلغت (6.25 ±0.405)وحدة عالمية /لتر وقد اخذت هذه الزيادة بالارتفاع وبلغت اعلى قيمة لها في الاسبوع الخامس (42.828±4.761) وحدة عالمية /لتروكما موضح في الجدول (1).اما بالنسبة للمجاميع التي حقنت بالمستضد(SP2) من جرثومة *P.mirabilis* وبنفس مستوى الجرعات التي حقنت، فقد لوحظ أن الزيادة المعنوية لمستوى انظيم SOD في مصل الارانب في الاسبوع الثاني بلغت (20.78 5 ± 0.753) وحدة عالمية /لتر مقارنة بعينة السيطرة، بلغت اعلى قيمة لها في الاسبوع الرابع من الحقن (45.801±2.721).

المناقشة

اهتم البحث بدراسة جانبين وهما الجانب الجرثومي وتمثل بعزل واستخلاص جرثومة المنقلبة *P.mirabilis* (9) لاجل الحصول على نوعين من البروتينات الذائبة ،و الجانب الاخر تمثل بالدراسة المناعية عن طريق قياس مستوى انظيم SOD في مصل الارانب.ويمثل انظيمSOD دورا" كبيرا" خلال الأستجابة المناعيةاذ يتولى عملية قتل الجراثيم وتنظيم ازالة جذور السوبراوكساید السمية من محيط الانسجة(12).وقد لوحظ وجود تأثير لمستضد البروتينات الذائبة (SP1) على مستوى انظيم SOD في مصل الارانب واخذ هذا التأثير الشكل التصاعدي مع زيادة الجرعات خلال الاسابيع منذ بداية الاسبوع الثاني (10.3±0.76) وحدة عالمية/لتر ليصل الى اعلى معدل له في الاسبوع الخامس من الحقن(42.858 ±4.761) وحدة عالمية/لتر مقارنة مع السيطرة (6.25±0.405) وحدة عالمية/لتر .اي ان زيادة مدة التعرض للمسبب المرضي قد تؤدي الى زيادة فعالية الانظيم في مصل الدم لانه يعجل من اكسدة الدنا المتحطم عن طريق تصفية الحديد من البروتينات والانزيمات المخزونة في الخلايا المتحطمة نتيجة عمليات

البلعمة وغيرها وهذا يتفق مع ما اشار اليه(13) . كما اشار De-Grootوجماعته(7) الى مستوى انظيم SODارتفع في مصل دم المصابين بالتهاب الكبيبات الكلوية المزمن مقارنة مع مجموعة المصابين بالتهاب الكبيبات الكلوية الحاد،ولايتأثر هذا الانظيم بالعمر او بالجنس(14). وبالنسبة لمجموعة الارانب المحقونة بالمستضد(SP2) فقد شملها هذه الزيادة في مستوى الانظيم مقارنة مع السيطرة وقد بلغ اعلى ارتفاع له عند الاسبوع الرابع من الحقن(2.721±45.801) وحدة عالمية/لتر،وهذا يفسر ان مستوى الانظيم في الجسم في الحالة الطبيعية يكون بكميات واطئة(12)، فقد لوحظ في دراسة سابقة ان معدل مستوى انظيم SODفي مصل الارانب غير المعاملة قد بلغ (0.5±5.5)(15).ولكن نتيجة الاصابة والمرض مما يعزى له حدوث شد اوكسجيني عالي في خلايا الألتهاب (17,16).

المصادر

1-Evans,T.;Carpenter,A.;Silva,A.andCohen,J.(1992).Infect .Immun.60:4133-4139.

2-Parmely,M.J.;Wang,F.andWright,D.(2001).Infect.Immun.69:2621-2629.

3-McCord,J.M.and Fridovich.I. (1969).J.Biol.Chem.,244:244-249.

4.Zhang,G.;Nichols,R.;Taniguchi,M.;Nakayama, TandParmely,M.J.(2003).Infect.Immun.71(5):2468 -2477.

5-Sourthron.P.A.and Powis,G. (1988).Mayo.Clin.Proc., 63:381-389.

6-Fridovich.I(1983).Ann.Rev.Pharmacol.Toxacal.23:239-238.

7-DeGroot,M.A.;Ochsrer,U.A.;Shiloh,M.V.;Nathan,C.;McCord,J;and Fang,F.C.(1997).Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:13997-14001.

8-Davis,G.R.;Bantavala,C.F.;Sheaff,M.T.;Abdi,Y;Clements,L.and Rampton,D.S.(1994).Scand.J.Gastroenterol.29:419-424.

9-Baron,E.J.andFinegold,S.M.(1994).BailyandScott`sdignostic microbiology.LaboratoryManual.(Ed).Mosby-Yearbook,Inc.USApp:203-210.

10-Kumar,S.S.;Sankaran,K.;Hiagh,R.;Williams,P.H.and Balakrishnan,A.(2001).J.Med.Microbiol.,50:602-621.

11-Al-Zamely,A.M.(2001).Toward understanding the ischemicheart disease via oxidative hypothesis. Ph.D.Thesis.Collage of Science.Al-Mustansiriya University.
12-Morais,A.;Mendez,S.L.andMegrand ,F.(1999).Microbial.Mol.Biol.Rev.63(3):642-674.
13-Keyer,K.andImaly,J.A.(1996).Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,93:13635-13640.
14- Rister,M .;Bauermeister,K .;Gravert,U.andGldtke,E .(1979) Eur.padiatr., 130(2):127-136.
15- Hardmeier,R.;Hoeger,H.;Fang-Kircher,S.;Khoschsory,Aand Lubec,G.(1997). Proc.Natl.Acad.Sci.USA.94:7572-7576.
16- Wang,Ge.andMaier,R.J.(2004). Infect.Immun.72(3):1391-1396.
17- Kuner,R.;Groom,A.J.;Bressink,I.(2005). Proc.Natl.Acad.Sci.USA .102 (16):5826-5831.

جدول (1) تأثير مستضد (Sp_1) نجرثومة ***Proteus mirabilis*** في الفعالية الانظيمية لل(SOD) في مصل دم الارانب(المعاملةوالسيطرة)

المجاميع/الجرع	عدد الحيوانات	الجرعة ملغم/ديوان	المعدل ± الانحراف المعياري وحدةعالمية/لتر
السيطرة	3	0.00	0.405±6.25
الاسبوع الثاني	3	1.00	0.67±10.3*
الاسبوع الرابع	3	1.00	0.80±13.31*
الاسبوع الخامس	3	1.00	4.76± 42.86*
الاسبوع السادس	3	1.00	19.77±38.55*

*: زيادة معنوية ($P<0.01$)

جدول (2) تأثير مستضد (Sp_2) لجرثومة *Proteus mirabilis* في الفعالية الانظيمية لل(SOD) في مصل دم الارانب(المعاملةو السيطرة)

المجاميع/الجرع	عدد الحيوانات	الجرعة ملغم/ حيوان	المعدل ± الانحراف المعياري وحدة هالمون/لتر
السيطرة	3	0.00	0.405±6.25
الاسبوع الثاني	3	1.00	0.75±20.75*
الاسبوع الرابع	3	1.00	2.72±45.80*
الاسبوع السادس	3	1.00	1.545±11.26*
الاسبوع السادس	3	1.00	2.02±28.44*

*: زيادة معنوية ($P<0.01$)

A Study of Soluble Proteins(Sp1 and Sp2) Effect of extracted from *Proteus mirabilis* on the Activity of Superoxide Dismutase,SOD in the Sera of albino rabbit

L.S.Al-Abdel waheed
Department of Biology, College of Education,Ibn Al-Haitham,Univeresity of Baghdad.

Abstract

The aim of the present study is to shed some light on the immunological effect of soluble proteins extracted from *Proteus mirabilis* through employing the level of the enzymatic activity of Superoxide Dismutase,SOD.

The Soluble proteins;Sp1 and Sp2,were extracted by using the lysosyme enzyme .The rabbits were divided into three groups ,the first one was injected with Sp1, the second with Sp2 for four weeks and the third one was the control group.

The results revealed that enzymatic activity of Superoxide Dismutase,SOD was significantly increased in the fifth weekes of injection with Sp1 compared with control group.The same effects of the Sp2 were observed in specific enzymatic activity of Superoxide Dismutase,SOD.Therfore,the extracted soluble proteins had an effect on the innate immune response of the rabbits.