

دراسة تأثير السمي لانزيم البروتيتيز المنقى من عزلة محلية لبكتريا *Vibrio cholera* في الحيوانات المختبرية

محمد ابراهيم نادر

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا ، جامعة بغداد.

الخلاصة

أفادت الدراسة الحالية إلى التأثيرات السمية لإنزيم البروتيتيز المنقى من العزلة المحلية لبكتريا *Vibrio cholera* ، إذ أدى حقن 0.250 ملغم من إنزيم البروتيتيز المنقى في الوريد الأذني للأرانب إلى إزالة الشعر من منطقة الحقن وحدوث تخثرات ونزف دموي في موقع الحقن. فضلاً عن تأثيراتها النسيجية في العضلة القلبية إذ أدت إلى تنخر وانتفاخ في العضلة القلبية وفقدانها للتقسيمات العرضية وحدوث احتقان دموي في الأوعية الدموية والشرايين، وكذلك حدوث تخثرات كبيرة في سمك جدران الأوعية الدموية مع حدوث احتقان دموي في أوعية نسيج رئة الفئران ، فضلاً عن حدوث احتقان توزيع عشوائي للخلايا الكبدية حول الأوعية الدموية وفقدانها الشكل السداسي المركزي المنظم وارتشاح سايتوبلازم الخلايا الكبدية وتحببها ووجود التخثرات البروتينية الخارج خلوية تفصل ما بين الخلايا.

المقدمة

الضمات بعد اصابة الامعاء. في حين اكد Finklestein وجماعته (1992) ان انزيم البروتيتيز هو المسؤول عن تماس والتصاق وتجمع بكتريا الكوليرا على اسطح الخلايا الطلائية للامعاء الدقيقة. يلعب هذا الانزيم دوراً مهماً في امراضية بكتريا الكوليرا حيث يملك فعالية تحليلية (proteolytic activity) لكثير من البروتينات منها mucin و fibronectin التي تغطي اسطح الخلايا الطلائية للامعاء بالاضافة لتحليله لبروتين Lactoferrin، كما ويحدث تالزن دموي (Hemagglutination) والتي تعد من الوظائف الاخرى التي يقوم بها البروتيتيز (Barbara et al., 1983; Finklestein et al., 1983).

تمتلك بكتريا الكوليرا العديد من عوامل الضراوة التي تؤهلها للاصابة المعوية واحداث المرض ، منها قابليتها على الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنه للامعاء الدقيقة، ونتاجها للعديد من الذايفانات منها الذايفانات الداخلية Endotoxins والذايفانات الخارجية Exotoxins والتي تتضمن انواع عديدة الحساسة للحرارة والمقاومة للحرارة وكذلك الذايفانات المعوية المرتبطة بامراضية هذه البكتريا ومن هذه الذايفانات enterotoxin، cytotoxin، cytolysin وانزيمات عديدة اهمها انزيم البروتيتيز (Howard et al., 1987; Baron et al., 1994) الذايفانات المعوية enterotoxins المتمثلة بذايفان الكوليرا

يعد مرض الكوليرا من الأمراض الوبائية والمتوطنة في كثير من دول العالم ولاسيما الدول النامية ويعد جنس *Vibrio* اهم الاجناس امراضية للانسان حيث تتصف البكتريا التابعة له بكونها عصيات قصيرة منحنية ومتحركة غير مكونة للابواغ والمحفظة (Tilton et al., 1992). فضلاً عن ذلك يتميز هذا الجنس بانتاجه لانزيم الاوكسيديز (Oxidase) الذي يعد من الصفات التشخيصية للضمات. تصيب هذه البكتريا الانسان وتسبب له الالتهابات المعوية- المعوية (Gastroenteritis) والمصحوبة باسهال مائي وتقيء وآم في البطن وجفاف حاد واحياناً حمى (Collee et al., 1996; Forbes et al., 1998) تفرز بكتريا الكوليرا العديد من الانزيمات الضرورية لاحداث المرض مثل انزيم البروتيتيز protease الضروري لاختراق الجدار الخلوي المبطن للامعاء الدقيقة كما ويقوم بتنشيط ذيفان الكوليرا (CT) (Davis et al., 1980; Mims et al., 1998; Dalsgaard et al., 1998; Dennis et al., 1998) وجماعته (1982) ان فعل انزيم البروتيتيز هو تحطيم Intestinal mucin والذي يساعد الضمات على اختراق الحاجز المخاطي mucous barrier لتصل الى سطح الخلايا الطلائية المبطنه للامعاء وتلتصق بها حال الاصابة بالكوليرا، وان تحطيم المخاط (mucous) يساعد على تغذية

درست التغيرات المرضية والنسجية الناتجة من تأثير البروتيتيز المحقون في الحيوانات المختبرية، اذ أكد Kellner and Robertson, (1954) حدوث علامات تنخر في عضلة القلب بشكل بؤري في الأرناب المحقونة بالبروتيتيز في الوريد الاذني، وكذلك أظهرت الفئران وخنازير غينيا تنخرا في عضلة القلب مشابها لما وجد في الأرناب، ولم تظهر ببقية الأعضاء أي تغيرات نسيجية اخرى. وتميزت التنخرات بكونها صغيرة ومنتشرة بشكل عشوائي، وظهرت الخلايا العضلية القلبية فاقدة للخطوط العرضية ومنتفخة ومحبية (Granular). بينما أشار (Balebona et al., 1998) الى ان البروتيتيز المفرز من بكتريا *V.alginolyticus* المحقون تحت الجلد يعمل على استطالة الخلايا الجلدية وتمزقها محدثة حويصلات (Vesicles) نسيجية عديدة مؤدية الى انسلاخ وموت النسيج، وحدث نزف دموي موقعي وظهور تقرحات جلدية في الأجزاء المحيطة بموقع الحقن. ان ظهور أعراض نقص الأوكسجين في الدم (Anorexia) وانسلاخ خلايا الأمعاء وحركتها في التجويف المعوي وانكماش وتنخر في خلايا الكبد والطحال عند حقن البروتيتيز في العضلة (ramuscular). وفيما يخص الأعراض الناشئة عن حقن البروتيتيز المعدني تحت الجلد فقد أشار Miyoshi et al., (1998) الى حدوث نزف دموي تحت الجلد وتحطم الأدمة والشعيرات الدموية تحت الجلد بعد 30 دقيقة من حقن خنازير غينيا بالبروتيتيز المفرز من قبل بكتريا *V.vulnificus*. فضلا على الدراسات السابقة أشار Ramos-Costa and Rowley (2004) الى التغيرات السلوكية والنسجية لسرطان البحر بعد حقنها بتركيز 2 ملغم/مليتر من الدم، اذ أدى الى زيادة عمليات الاستنشاق بسرعة متزايدة بعد الحقن مباشرة وانخفضت عملية الاستنشاق بعد 30 دقيقة من الحقن. وظهرت التغيرات السلوكية للكائن مثل انسحاب مجسات العين (Eystalks) الى الداخل، وتصلب وثبات قرون الاستشعار وفشل الاستجابة للتحفيزات الضوئية والميكانيكية. وازدادت التأثيرات المرضية مع استمرار الوقت اذ فقد السرطان الحركة بعد 60 دقيقة وهلك بعد 74 ساعة من الحقن. درس تأثير الجرعة المخففة من البروتيتيز 0.4 ملغم/مليتر الى ظهور الأعراض المرضية نفسها ولكن بشكل متباعد نسبيا، اذ هلك 40% منها بعد 100 دقيقة من

Cholera toxin (Cholera) والذي يعد من اهم عوامل ضراوة بكتريا الكوليرا، وكذلك ذيفانات cytotoxin و hemolysin ، اضافة لاناوع اخرى من الذيفانات. كما وتقوم بكتريا الكوليرا بافراز العديد من الانزيمات الضرورية لاحداث المرض مثل انزيم البروتيتيز الذي يلعب دورا مهما في امراضية الضمات بعد اصابة واختراق الجدار الخلوي المبطن للامعاء الدقيقة، اذ يملك فعالية تحليلية لكثير من البروتينات منها mucine و fibronectin و lactoferine ، كما ويعد شرارة قدح (Triggers) وعوامل تحفيزية لذيفانات الكوليرا (CT).

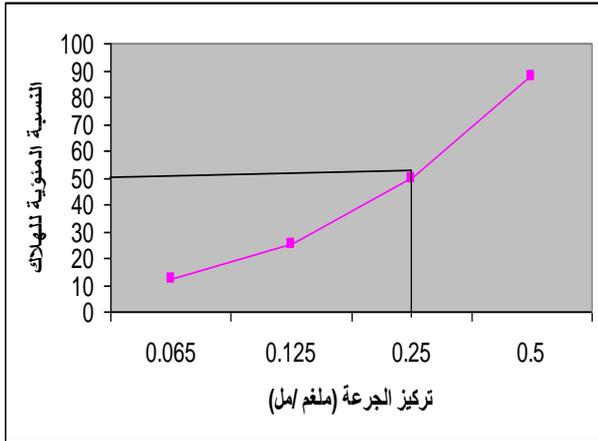
يمتلك انزيم البروتيتيز فعالية مميتة (lethal activity) فضلاً عن فعالية التحليلية الاخرى. اذ اشير Kellner and Robertson (1954) الى سمية انزيم البروتيتيز من خلال حقن الارانب بوزن 2.5-3 كلغم بالانزيم بتركيز 5 و 14 و 20 ملغم/ كلغم وكانت نسبة الهلاكات في الارانب المحقونة 23% ، 100% ، 100% على التوالي بعد مدة 92 ساعة و 20 ساعة و 24 دقيقة. ان انزيم البروتيتيز مميت للفئران بتركيز 1.5 ملغم فما فوق (Kellner and Robertson, 1954). اشار Khalil and Mansour, (1997) الى تأثير انزيم البروتيتيز المفرز من قبل *Aeromonas hydrophila* وتحديد سميته تحت درجات حرارية مختلفة، اذ حقنت الاسماك بالانزيم مباشرة مما ادى الى هلاك الاسماك جميعا بعد 24 ساعة من حقنها. في حين ادى تعريض الانزيم الى درجات حرارية مختلفة (60,80,100) م ثم حقن الاسماك به، ادى الى هلاك الاسماك بنسبة (60,20,0)% بعد 72 ساعة على التوالي.

يؤدي السيرين بروتيتيز المنتج من قبل البكتريا *Streptococcus pyogenes* على هلاك الفئران بعد حقنها به في الصفاق وكانت نسبة الهلاك 90% منها مقارنة مع العزلة الطافرة (فاقدة لانتاج الانزيم) (Ashbaugh . 1998; Lukomski et al., 1998) ان الجرعة المميتة لنصف العدد الكلي LD₅₀ لانزيم السيرين بروتيتيز المنتج من قبل *Vibrio spp.* بلغت 0.3 مايكروغرام لكل ملغم من الروبيان (Liu and Lee, 1999).

ملييلتر من المحلول الانزيمي لتحديد الجرعة القاتلة، اما مجموعة السيطرة حققت بدارئ الفوسفات.

النتائج والمناقشة:

اظهرت النتائج ان قيمة LD50 لانزيم المنقى كانت 250 ملغم / فأر. (الشكل 1)



الشكل (1) تأثير الجرعة القاتلة لنصف العدد الكلي (LD50)

لانزيم البروتيز المنقى من بكتريا *Vibrio cholera*

بينت المقاطع النسيجية لقلب الفئران المحقونة بانزيم البروتيز بتركيز 0.250 ملغم/ملييلتر وجود نتخرات في العضلة القلبية (Myocardium necrosis) منتشرة بصورة عشوائية في مناطق متعددة، فضلا عن انتفاخ الخلايا العضلية وفقدانها للخطوط العرضية، وتحبيبها، وحدوث الاحتقان الدموي في الاوعية الدموية والشرايين فضلا عن تحطم نواة الخلايا العضلية (Nuclear Karyorhysis) وارتشاح الخلايا المناعية كوسيلة دفاعية ضد انزيم البروتيز (الشكل 2) في حين لم تظهر أي تأثيرات في الصمامات القلبية.

اظهرت المقاطع النسيجية لرئة الفئران المحقونة بالبروتيز وجود نتخانات كبيرة في سمك جدران الاوعية الدموية مع حدوث احتقان دموي في الاوعية الدموية (الشكل 3). بينما اظهرت الشرائح النسيجية لكبد الفئران توزيعاً عشوائياً للخلايا الكبدية حول الاوعية الدموية، وفقدانها الشكل السداسي المركزي المنتظم (Centrilobular vessels) وارتشاح السابتوبلازم الخلايا الكبدية وتحبيبها (Granulation)، فضلا عن وجود النتخانات البروتينية

الحقن. اما فيما يخص التأثيرات الخلوية والنسيجية فقد لوحظ انخفاض واضح في أعداد الخلايا الدموية بعد الحقن مباشرة اذ تبقى حوالي 4.8% منها فقط متحركة في الدورة الدموية بعد 90 دقيقة من الحقن والباقي متجمع بشكل تجمعات دموية في الغلاصم والخياشيم والفسح الجانبية للخياشيم، وانطمار الخلايا الدموية في منطقة الدم الليمفاوية (Hemolymph) فضلا عن ظهور حواجز بروتينية بين الغلاصم وتحطم انابيب الكبد البنكرياسي (Hepatopancreas) اعتماداً على شدة الإصابة (Vogan et al , 2001; Ramos-Costa and Rowley , 2004).

طرائق العمل

العزلات البكتيرية

تم الحصول على عزلات البكتريا من الدراسة السابقة والمعزولة من الاشخاص المصابين بالاسهال المائي وشخصت اعتماداً على المصادر العلمية المعتمدة في الدراسة السابقة.

تنقية الانزيم

نقى الانزيم باستخدام تقنيات التبادل الايوني والترشيح الهلامي اعتماداً على الدراسة السابقة وحدد نقاوة الانزيم باستخدام الترحيل الكهربائي.

محلول دارئ الفوسفات الملحي Phosphate buffer . pH 7.5 (saline)

استخدم الدارئ لغرض تخفيف انزيم عند الحقن.

العينات النسيجية

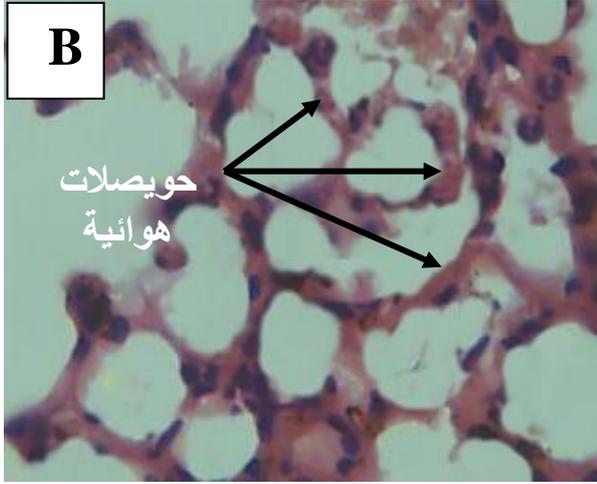
تم تحضير الشرائح النسيجية اعتماداً على (الخليفة والصالح، 1987).

تم الحصول على انزيم البروتيز النقي من الدراسة السابقة وتم تحديد صفاته الكيميوحيوية.

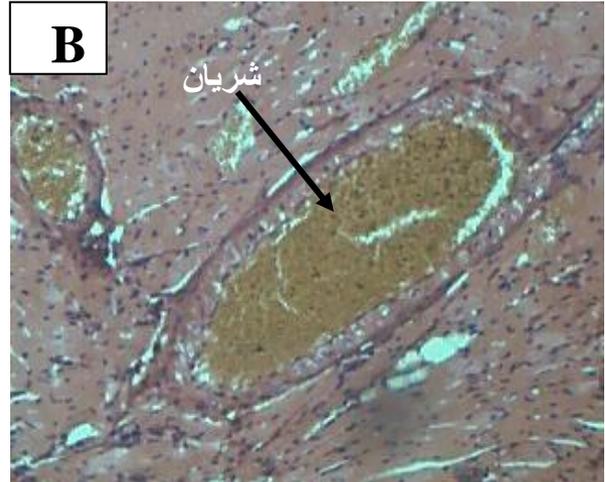
تحديد الجرعة القاتلة لنصف عدد الحيوانات.

تم تحديد الفعالية السمية لانزيم البروتيز النقي بتحديد الجرعة القاتلة لنصف عدد الحيوانات LD50 باستخدام الفئران البيض ويواقع اربعة فئران لكل مجموعة، اذ قسمت الفئران الى اربعة مجاميع لكل مجموعة جرعة محددة (0.5 و 0.25 و 0.125 و 0.065 ملغم/ ملييلتر) من الانزيم النقي بالاضافة الى مجموعة السيطرة. حقنت الفئران بجرعة 0.5

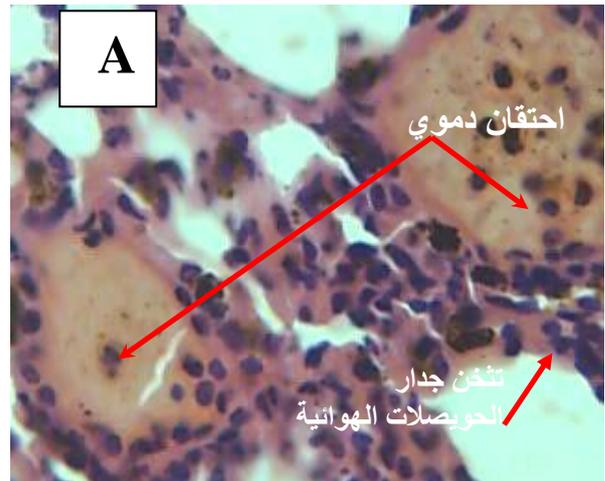
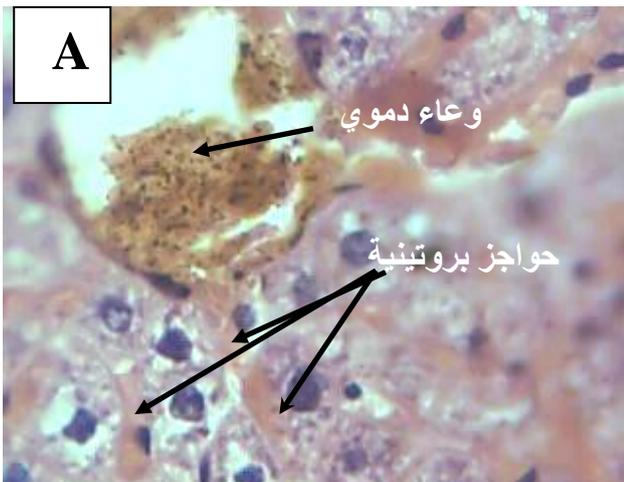
الخارج خلوية تفصل الخلايا بعضها عن بعض (الشكل 4).
بينما ادت فعالية انزيم البروتيتيز المنقى الى نزف دموي
موقعي مع ظهور تقرحات جلدية في أجزاء المحيطة بموقع
حقن الأرناب باضافة الى تآكل النسيج الأذني للأرناب (الشكل
5,6).



الشكل (3) مقطع في رئة فأر محقون بانزيم البروتيتيز
بتركيز 350 مايكروغرام/فأر (A) المعامل (B) السيطرة



الشكل (2) مقطع في قلب فأر محقون بانزيم البروتيتيز
بتركيز 350 مايكروغرام/فأر. (A) المعامل
(B) السيطرة



الشكل (6) تأثير انزيم البروتيتيز المنقى المحقون على تأكل وإزالة الشعر من أذن الأرنب

اشارت العديد من الدراسات الى ان انزيم البروتيتيز يسبب تنخراً في عضلة القلب، وتكون هذه التخرات صغيرة وموزعة توزيعاً عشوائياً وبشكل كثيف في مواقع تحت الشغاف وتحت النخاب (Sub epicardial) في الفئران المحقونة (Kellner and Robertson,1954; Hynes and Tagg,1985; Lukomski et al.,1998) بينما اشار *Balebona et al.* (1998) الى ان البروتيتيز المفرزة من

بكتريا *V.alginolyticus* والمحقونة تحت الجلد تعمل على استئصال الخلايا الجلدية وتمزقها محدثة حويصلات (Vesicles) نسيجية عديدة مؤدية الى انسلاخ وموت النسيج، وحدوث نزف دموي موقعي، وظهور تقرحات جلدية في الأجزاء المحيطة بموقع الحقن. لوحظ ظهور أعراض نقص الأوكسجين في الدم (Anorexia) وانسلاخ خلايا الأمعاء وحركتها في التجويف المعوي، وانكماش وتنخر في الكبد والطحال عند حقن البروتيتيز في العضلة (Intramuscular). وفيما يخص الأعراض الناشئة عن حقن البروتيتيز المعدني تحت الجلد، فقد أشار *Miyoshi et al.* (1998) الى حدوث عملية نزف دموي تحت الجلد وتحطم الأدمة والشعيرات الدموية تحت الجلد بعد 30 دقيقة من حقن خنازير غينيا بالبروتيتيز المفرز من قبل بكتريا *V.vulnificus*.

فضلاً عن الدراسات السابقة أشار *Ramos-Costa and Rowley*, (2004) الى التأثيرات النسيجية الناتجة عند حقن سرطان البحر بانزيم البروتيتيز المنتج من بكتريا *Pseudoalteromonas atlantica* الذي أدى الى تجمع الخلايا الدموية في الغلاصم والخياشيم وخصوصاً في الفسح الجانبية للخياشيم، فضلاً عن انطمار الخلايا الدموية في منطقة الدم الليمفاوية (Hemolymph) وظهور الحواجز البروتينية الفاصلة بين الغلاصم وتحطم الكبد البنكرياسي (Hepatopancreas).



الشكل(4) مقطع في كبد فأر محقون بانزيم البروتيتيز بتركيز 350 مايكروغرام/ فأر (A) المعامل (B) السيطرة



الشكل(5) تأثير انزيم البروتيتيز على النسيج الاذني للارانب المحقونة



- Hemagglutinin/ protease, colonial variation, virulence, and detachment. J. Infet. Immun. (2): 472–488.
- [12] R. A. Finklestein; D.F. Boesman; P. Holt, *Vibrio cholerae* Hemagglutinin/ Lectin/ Protease hydrolyzes fibronectin and ovomucin. J. Microbiol. No.80, (1983), pp.1092–1095.
- [13] D. Gill; G. Kokko; P. Mandell, Text Book of Medicine. 21st ed. W. B. Saunders Company Philadelphia. (2000), pp.1690–1693.
- [14] B. Howard; J. Klaas; A.S. Weissfeld; S. Jorubin, Clinical and Pathogenic Microbiology. The C.V. Mosby. St. Louis, Washington., (1987).
- [15] W.L. Hynes, and J.R. Tagg, Protienase-related broad spectrum inhibitory activity among group A streptococci. J. Med. Microbiol. No.22, (1986), pp. 257-264 .
- [16] A. Kellner, and T. Robertson, Myocardial necrosis produced in animals by means of crystalline *streptococcal* proteinase. J. Exp. Med. 99 (1954), pp. 495-503.
- [17] A.H. Khalil, and E.H. Mansour, Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in *Tilapia nilotica*. Appl., microbiol. 25(4), (1997), pp.269-273.
- [18] P.C. Liu, and K.K. Lee, Protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus* London. J. Applied. Microbiol. No5, (1999), pp.1365-1372.
- [19] S. Lukomski; E.H. Burns; P.R. Wyde; A.Podbielski; J. Rurangirwa; D.K. Morre-Poveda, & J.M. Musser, Genetic inactivation of an extracellular cysteine protease (SpeB) expressed by *Streptococcus pyogenes* decreases resistance to phagocytosis and dissemination of organs. Infect. Immun. 66, (1998), pp.111-116.
- [20] C. Mims; J. Playfair; I. Roitt; D.Wakeliu, and R. Williams, Medical Microbiology. 2nd ed. by. London. (1998).
- [21] S.Miyoshi; N.Hiromi; K. Koji; T. Ken-ichi and T. Sumio, Characterization of Hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. Infect. Immun. Vol 66(10), (1998), pp. 4851-4855.
- [22] C. Ramos–Costa and A. Rowley, Effect of extracellular products of
- [1] الخليفة، محمد بن صالح وعبد العزيز بن عبد الرحمن الصالح (1987). المجاهر وتقنياتها، عمادة شؤون المكتبات، مطابع جامعة الملك سعود.
- [2] C.D. Ashbaugh; H.B. Warren; VJ. Carey, and M.R. Wessels, Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, Hyaluronic acid capsule and M protein in a murine model of human invasive soft tissue infection. J. Clin. Invest. 102(1998), pp 550-560.
- [3] M. Balebona; J.A. Manuel; M .B Angeles.; Irene ,Zorrilla; A. Miguel. Morinigo; and J.B .J.B .Guan, Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured Gilt-Head sea bream (*Sparus aurata* L). Appli.and Environ. Microbiol. Vol 64 (11).(1998), pp. 4269 -4275.
- [4] A. Barbara; Booth, Mary boesman–Finkelstein, and A. F. Richard, *Vibrio cholerae* Soluble Hemagglutinin/ Protease is a Metalloenzyme. Infection and Immunity. 11. (1983), pp 639–644.
- [5] E. J .Baron; L.R. Peterson, and S.M.Finegold. Baily and Scott's, diagnostic Microbiology. 9th. ed Mosby st. Louis, Baltimore. (1994), P:429-430.
- [6] B.A .Forbes; D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed. Mosby. st. Louis, Baltemore, Baston and New York. (1998).
- [7] J. G. Colle; A. G. Fraser; B. P .Marmion; and A. Simmons, Mackie and McCartney, Pratical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill Living stone Philadelphia., (1996). pp 425.
- [8] A.Dalsgaard; A. Forstand; H.F. Mortensen and T. Shimada, Ribotypes of Clinical *Vibrio cholerae* Non–O1, O139 strains in relation to O– serotypes. Epidemiol. Infect. No 121, (1998),pp 535–545.
- [9] D. B .Davis; R .Dulbecco; H.N. Eisen, and H. Guisberg, Microbiology 3rd ed. Harber and Row. Publisher. New York. (1980).
- [10] V.Dennis; M.Schnaider, and D. Charlotte, Purification and Characterization of Mucinase of *Vibrio cholerae* . J. of Infectious Diseases. No 145, (1982), pp.474 – 481.
- [11] Finklestein; Boesman, M.; Chang, Y.; Hase, C. (1992). *Vibrio cholerae*

pseudoalteromonas atlantica on the edible Crab *Cancer pagurus*. Appli.and Envire. Microbiolo .vol 70 No2, (2004), pp. 729-735.

- [23] R.C. Tilton; A. Balows, D. C. Hohnadel and R. F.Reiss, Clinical Labortory Medicine. (2nd ed). Vol. 2. London. (1992).
- [24] C. L.Vogan; C. Costa-Ramos and A. F. Rowley, A histological study of shell disease syndrome in the edible crab *Cancerpagurus*. Dis. Aquat. Org.No, 47, (2001), pp. 209-217. [Medline].

Abstracted

This study revealed the toxic effects of protease enzymes that purified from local isolates *Vibrio cholera* bacteria, injection of 0.250 mg of enzymes into Rabbit ear vein lead to hair loss, necrosis and bleeding at site of injection. However, protease has visible effects on the heart muscle ranging from necrosis,swelling ,loss of striation and visible engorgement of blood vessels .

Whereas mouse lung tissue suffered from obvious thickening concurrently with vascular engorgement .Virtually liver tissue shows random cellular distribution around blood vessels with loss of intact hexagonal arrangement followed by exudation with prominent protein layers that separate between adjacent cells.