استخلاص البكتريوسين الخام المنتج من *Lactobacillus acidophilus* وتأثيره في عملية التحول اللمفاوي

سهام جاسم محسن / مدرس مساعد عاليه عيسى بشبوش / مدرس مساعد ازهار جاسم محسن / مدرس مساعد
كلية التربيه للبنات – جامعة الكوفه كلية الطب – جامعة الكوفه كلية الصيدله – جامعة الكوفه

الخلاصة

استخلص البكتريوسين الخام المنتج من عزله محليه لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* , حضرت تراكيز مختلفه من البكتريوسين الخام شملت (1000,500,250,100,50 مكغم / مل) ، اجري اختبار تأثير هذه التراكيز من البكتريوسين الخام على عيوشية الخلايا اللمفاوية المعزولة من الدم المحيطي للانسان , حيث لم يلاحظ أي تأثير سام للبكتريوسين الخام المستخدم على هذه الخلايا المناعية , اختيرت التراكيز (1000,500,250 مكغم / مل) لمعرفة تأثير البكتريوسين الخام على عملية التحول اللمفاوي حيث كان لجميع التراكيز المستخدمه دورا مهما في تحفيز الخلايا اللمفاويه على الانقسام والتكاثر .

المقدمه :-

تعد بكتريا *L. acidophilus* عصيات موجبه لصبغة غرام غير مكونه للسبورات وهي متجانسة التخمر مجبره Obligate Homofermentative ذات نهايات مستديره تتواجد بشكل مفرد او مزدوج او بشكل سلاسل قصيره , عزلت سلالاتها من القناة الهضميه للانسان والحيوان وتعد من الفلورا الطبيعيه normal flora التي تعيش في الفم والمهبل(Jawetz *etal*,1995).لوحظ التأثير المثبط لبكتريا *L. acidophilus* على البكتريا المرضيه من قبل Polonkaya عام 1952 , بعدها اجريت ابحاث اخرى على التأثير المضاد لهذه البكتريا على الممرضات المعويه والاحياء المجهريه اللاهوائيه المسببه للتلف الغذائي مثل *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* (Fernandes *et al.*,1987) , ان الفعاليه المايكروبيه لهذه البكتريا متأتيه من انتاجها لحامض اللبنيك وبيروكسيد الهيدروجين والمواد المضاده المعروفه بالمبيدات الجرثوميه Bacteriocins وهي مركبات بروتينيه مضاده لحياء المجهريه

Antimicrobial تنتج من قبل مختلف انواع البكتريا وتثبط الانواع الاخرى المتقاربه وغير المتقاربه لها , وهي نواتج ايضيه اوليه (Klaenhammer, 1988. Rammelsberg *et al.*,1990) .

اقترح Perdigon *وجماعته (1990)* استخدام بكتريا . *Lactobacillus spp* كمعدلات مناعيه Immunmodulators

في منع الاصابات المعويه وعلاجها , وقد تبين في السنوات الاخيره بأن البكتريوسينات تساهم في الحفاظ على توازن الفلورا الداخليه الطبيعيه normal endogenous flora . حيث تمث احدلى الميكانيكيات المهمه لحصول التداخل بين الانواع البكتيريه الموجوده اصلا وبين الممرضات التي تصيب الجهاز التنفسي والتناسلي والقناة الهضميه والتأثير عليها ومنعها من احداث الاصابه (Brook, 1999) . و توالت الدراسات و لازالت مستمرة حول البكتريوسينات المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك بشكل عام و تنقيتها و معرفة خواصها و طبيعتها الكيمياوية . حتى وجد أن السلالة الواحدة تنتج أكثر من نوع واحد من البكتريوسينات التي تختلف في طبيعتها و طيف فاعليتها (Mackay *etal* ., 1997). لذلك فقد جاءت هذه الدراسة لتهدف الى معرفة دور البكتريوسين المنتج من بكتريا *L. acidophilus* في التأثير على عملية التحول اللمفاوي لما لهذه العمليه من دور في الاستجابه المناعيه .

طرائق العمل :

المزارع البكتيرية:

جمعت(25) عزلة من *L.acidophilus* من مسحات مهبلية من النساء و عينات الغائط لأطفال معافين حديثي الولادة . و استعملت ثلاثة عزلات كعزلات منتجة للبكتريوسين ,نميت العزلات على وسط روكوزا المحور Modified Man-Rogosa-Sharpe(MRS) الصلب المصنع من قبل شركة Oxoid بطريقة الطعنة و التخطيط وبحرارة (37) مْ لمدة (24) ساعة ثم حفظت بحرارة

(4)مْ مع تجديدها كل عشرين يوماً(Kandler and Weiss,1986) , و عند الحاجة لهذه العزلات تم تنشيطها في وسط MRS السائل و تنميتها تحت ظروف لا هوائية بحرارة (37)ْم لمدة (24-48) ساعة.

اختيرت العزلة البكتيرية المنتجة اعتماداً على طريقة الأنتشار بالحفرWells diffusion method حيث اجريت وفق ما ورد في (1993) Vignolo *etal.*, مع عزله *Escherichia coli* داله لها على اساس حساسية هذه العزله للبكتريوسين المنتج مع ثبات هذه الصفه بتكرار الاختبارات.

استخلاص البكتريوسين الخام:-

استخدمت الطريقه الوارده في Kanatani وجماعته (1995) وكالأتي :-

أ-نميت العزلة المنتجة في انبوبة اختبار حاوية على (10) مل من الوسط الزرعي السائل MRS عند درجة حرارة (37) مْ لمدة (24) ساعة .

ب- بانتهاء فترة الحضن نقلت المزرعة السائلة بعد الحضانه الى دورق حاوي على 250 مل من الوسط الزرعي MRS السائل ذو pH مساوي لـ 6.5 و حضنت عند درجة حرارة 37 م ْ لمدة 48 ساعة .

ج- بانتهاء فترة الحضن نبذ المزروع مركزياً بالمنبذ المبرد عند درجة حرارة 4 مْ و بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق .جمع الراشح و ضبط الـpH الى7 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم 1عياري المعقم .

د- تم التاكد من عقمة الراشح الحاوي على البكتريوسين الخام حيث استخدمت لهذا الغرض مرشحات دقيقه (0.22 مايكروميتر). بعدها نقل 0.1 مل من الرااشح المعقم وزرع في اطباق حاويه على وسط MRS-Agar ووسط Nutrient Agar وحضن عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 48-24 ساعة للتأكد من خلو البكتريوسين الخام من الملوثات .

تقدير كمية البروتين الكلي في المستخلص المحضر

اعتمدت طريقة Lowry وجماعته (1950) في تقدير تركيز البروتين الكلي في المستخلص المحضر وحضرت تراكيز مختلفه منه شملت 1000,500,250,100,50 مكغم / مل وبأستخدام دارىء الفوسفات الملحي .

عزل الخلايا اللمفاويه :-

عزلت الخلايا اللمفاويه وفقا لما جاء في طريقة Boyum (1968) وكالآتي :-

جمع الدم من متبرعين اصحاء ووضع في انبوبة اختبار بلاستيكيه معقمه حاويه على الهيبارين بتركيز 50 وحده عالميه كمانع للتخثر ثم خفف بدارىء الفوسفات الملحي بنسبة 1:1 . بعدها نقل الدم المخفف بوساطة ماصة باستور معقمه الى انبوبة اخرى حاويه على محلول الفصل متدرج الكثافه 1.077 Lymphoprep والمجهز من شركة . Flow lab الانكليزيه , بحيث تكون نسبة الدم الى محلول الفصل هي 2:3 مع مراعاة ان تتم الاضافه بحذر شديد وعلى جدران الانبوبه . ثم نبذت الانبوبه بسرعة 2000 دوره / دقيقه لمدة 20 دقيقه .وبأنتهاء عملية النبذ المركزي تكونت ثلاث طبقات العليا حاويه على البلازما ودارىء الفوسفات الملحي و الوسطى وهي طبقه مضببه بشكل غشاء رقيق يضم الخلايا اللمفاويه اما الطبقه السفلى فقد احتوت على مكونات الدم الاخرى , فصلت بعدها الطبقة الوسطى بعناية بوساطة ماصة باستور معقمه ونقلت اى انبوبة اختبار حاويه على الوسط الزرعي النسيجي RPMI-1640 والمجهز من شركة . Flow lab الانكليزيه ثم غسلت الخلايا بالوسط نفسه ثلاث مرات 1500 دوره / دقيقه لمدة 10 دقائق . علقت بالوسط ذاته وحسبت اعداد الخلايا حسب طريقة Hudsun وHay (1980) .

تأثير البكتريوسين الخام على عيوشية الخلايا اللمفاويه :-

اعتمدت طريقة Nonoyama وجماعته (1979) وفق الخطوات الاتيه :-

حضر عالق الخلايا اللمفاويه بتركيز 10^6 ×4 خليه / مل وحضرالبكتريوسين الخام بتراكيز 1000, 500, 250,100,50 مكغم / مل في الوسط الزرعي النسيجي RPMI-1640 في انابيب بلاستيكيه معقمه ثم اضيف 0.5 مل من عالق الخلايا الى كل انبوب حاوي على0.5 مل من البكتريوسين الخام بالتركيز المطلوبه

(مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج) بالاضافه الى انبوبة سيطره احتوت على 0.5 مل من الوسط الزرعي النسيجي RPMI-1640 دون وجود البكتريوسين بعدها وضعت الانابيب في الحاضنه لمدة ساعه واحده بحرارة 37 ° م .وبأنتهاء فترة الحضن حسبت اعداد الخلايا بأستعمال صبغة التريبان الزرقاء 0.2% لاستخراج النسبه المئويه لعيوشية الخلايا وحسب القانون الأتي :-

$$\text{النسبه المئويه لعيوشية الخلايا} = \frac{\text{عدد الخلايا الحيه}}{\text{العدد الكلي}} \times 100$$

تأثير البكتريوسين الخام على تحول الخلايا اللمفاويه المعزوله من دم الاشخاص الاصحاء :-

اعتمدت طريقة Gerlier and Thomassei (1986) وكما يلي :

حضر البكتريوسين الخام بتراكيز 250 ,500 ,1000 مكغم / مل في وسط RPMI-1640 بحجم 0.4 مل في كل انبوب (مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج) وحضرت انبوبتا سيطره احداهما سيطره سالبه احتوت 0.4 مل من وسط RPMI-1640 بينما الانبوبه الاخرى فهي سيطره موجبه احتوت 0.4 مل من المشطر اللانوعي Phytohamagglutinin (PHA) المجهز من شركة Difco الاميركيه بتركيز نهائي 10 مكغم / مل ثم اضيف الى كل انبوبه 0.4 مل من عالق الخلايا اللمفاويه المحضره مسبقا بتركيز 1×10^6 خليه / مل وحضنت الانابيب عند درجة حراره 37 ° م بوجود 5% من CO2 لمدة 6 ايام لانابيب الاختبار والسيطره السالبه , في حين حضنت انبيب السيطره الموجبه لمدة 3 ايام , وبأنتهاء مدة الحضن اضيف 40 مايكرليتر من صبغة 2-(4,5-dimehyl thiazol-2-cetyl)2-5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) الى كل أنبوبه وأعيدت الأنابيب للحاضنة بنفس الظروف المذكور هـ لمدة 4 ساعات وبعد نهاية فترة الحضن أضيف 300 مايكروليتر من ألماده ألمذيبه HCL-Isopropanol 0.04 N الى جميع الانابيب ثم قرأ طيف الامتصاص بأستخدام جهاز المطياف الضوئي(المجهز من شركة Hitachi اليابانيه) بطول موجي مقداره 578 نانوميتر بعدها تم حساب التحسس بتحوير طريقة Rosenberg and Levy (1972) لتصبح :-

$$\text{نسبة التحسس} = \frac{\text{طيف الامتصاص للأنابيب ألحاويه على المستضد أو المشطر}}{\text{طيف الامتصاص للأنابيب ألخاليه من المستضد أو المشطر}}$$

النتائج والمناقشه

يظهر من الجدول 1 نتائج التحليل الاحصائي اذ لم تظهر فروق معنويه بمستوى احتماليه 0.05 < p) بين التراكيز الواطئه من البكتريوسين وبين معاملة السيطره في كل من التراكيز 100,50 ,250 مكغم / مل فقد تسبب التركيز 500 مكغم / مل من البكتريوسين الى انخفاض في العيوشيه لتصل الى 93.5% وبفروق معنويه عند مستوى دلاله (p<0.05) اما عند زيادة تركيز البكتريوسين الى 1000 مكغم / مل فقد وصلت نسبة عيوشية الخلايا الى 90.9% . يتضح ان هناك فروق معنوي على مستوى (p<0.05) بين التركيز المستخدمه على الرغم من وجود مثل هذه الفروقات الا ان النسبه المئويه لعيوشيه الخلايا لم تتأثر كثيرا اذ لم تؤدي المعامله حتى بالتركيز العالي من البكتريوسين الى موت ملحوظ للخلايا مما يدل على ان البكتريوسين المستخدم قد لايمتلك سميه للخلايا المناعيه وقد أكد ذلك Hammond وجماعته(1987) عندما لاحظوا وجود تأثير طفيف للبكتريوسين المستخدم على الخلايا المناعيه .

جدول 1 تأثير البكتريوسين الخام على عيوشية الخلايا اللمفاويه

البكتريوسين الخام (مكغم / مل)	النسبه المئويه لعيوشية الخلايا اللمفاويه (المعدل ± الانحراف المعياري)
0	a 0.4± 96.4
50	a 1 ± 96.2
100	a 0.7 ± 95.15
250	a 1.2 ± 95.07
500	b 1.89 ± 93.5
1000	c 1.8 ± 90.9

الاحرف الانكليزيه المتشابهه دلاله على وجود فروق معنويه بمستوى (p> 0.05) بين المعاملات

يبين الجدول 2 ان البكتريوسين الخام وبالتركيز 1000,500,250 مكغم / مل قد استطاع ان يحفز الخلايا اللمفاويه على الانقسام والتحول , وذلك عندما بلغت قيم طيف الامتصاص 1.62,1.66,1.68 وبنسبة تحسس 2.66 ,2.63, 2.57 على التوالي وهي بذلك قيم مقاربه لقيمة طيف الامتصاص للمشطر اللانوعي (PHA) والتي بلغت 1.8 وبنسبة تحسس 2.85 , وهذا يدل على ان للبكتريوسين الخام تأثير مشابه لتأثير المشطر اللانوعي (PHA) على الخلايا اللمفاويه وعملية تحولها , حيث ادى الى حدوث فروق معنويه بمستوى دلاله(p<0.05) مقارنة بمعاملة السيطره السالبه .

تدعم نتائج التحول اللمفاوي من انه يمكن استخدام البكتريوسين الخام وبالتراكيز المستعمله في هذه الدراسه كمشطر لانوعي حيث تمكن من تحفيز الاستجابه المناعيه المتوسطه بالخليه (Cellular Mediated Immune Response) , وبهذه الصفه فأن البكتريوسين الخام قد شابه PHA الذي يعد مشطر لانوعي يحفز انقسام وتكاثر الخلايا اللمفاويه لتتحول الى اورومات لمفيه (Kimball ,1983) .

ان الجدار الخلوي لبكتريا حامض اللبنيك يمتلك نشاط محفز لانقسام الخلايا اللمفاويه وله القدره على تحفيز نظام المناعه الخلويه (Popova *et al*., 1993) فقد اكد Laffineur وجماعته (1996) ان رواشح مزارع عصيات حامض اللبنيك تحتوي مواد محفزه للانقسام وان راشح بكتريا *L. helveticus* قد استخدم كمعدل مناعي لعملية تكاثر الخلايا اللمفاويه لدم الانسان في الزجاج .

جدول 2 : تأثير البكتريوسين الخام على تحول الخلايا اللمفاويه

البكتريوسين الخام (مكغم / مل)	الكثافه الضوئيه (578 نانوميتر) (المعدل ± الانحراف المعياري)	نسبة التحسس
صفر (السيطره السالبه)	a 0.3± .63	1
250	b 2.1 ± 1.68	2.66
500	b 1.2 ± 1.66	2.63
1000	b 1.7 ± 1.62	2.57
PHA *(السيطره الموجبه)	b 0.7 ± 1.8	2.85

الاحرف الانكليزيه المتشابهه دلاله على وجود فروق معنويه بمستوى (p> 0.05) بين المعاملات .

*PHA : المشطر اللانوعي Phytohaemagglutinin .

References

-Boyum , A.(1968).Isolation of Mononuclear cell and Granulocytes from Human Blood . Scan . J . CLin. Lab. Invest., *21*: 77-89 .

-Brook ,I. (1999). Bacterial Interference . Critical Rev . Microbiol., *25* : 155-172 (Abs.).

-Fernandes , C. F.;Shahani , K. M. and Amer , M. A. (1987) . Therapeutic role of diatary *Lactobacillus* and Lactobacillic fermented diary products . FEMS. Microbiol . Rev ., *46* : 343- 456 .

-Gerlier , D. and Thomassei , N. (1986) .Use of MTT colorimetric assay measure cell activation . J . of Immuno . Metho., *94* : 57-63 .

-Hammond, B. F. ; Lillard , S. E. and Stevens , R. H. (1987) . A Bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemycoitans* . Inf . and Imm., *55* : 686-691 .

-Hudson , L. and Hay , F. C. (1980). Practical Immunology . 2nd ed . Black Well. Scient . Public. P. 164.

-Jawetz , E.; Melnick , J. L. ;Adeberg, E. A.; Brook, G. F.; Butel , J. S. and Ornston , L. N. (1995). Medical Microbiology , 20th ed . Appleton and Lang, Norwalk , Connecticut . P.216.

-Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* In : Bergey's manual of Systematic bacteriology . (Sneath , P. H. A. ; Mair, N. S. and Holt, J.G. ed.) *vol 2* Williams and Wikins Co., Baltimore. M.D.U.S.A.

-Kimball , J.W.(1983).Introduction to Immunology 2nd ed .Macmillan Puplishing Co. , INC. New York. P. 153.

-Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria . Biochimie, *70*: 337-349 .

-Laffineur ,E. ;Genetet ,N. and Leonil ,J. (1996). Immunomodulatory activity of β-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria , J. Diary Sci., *79 :* 2112-2120 .

-Lowery , O. H.; Rsenberough , N. J.; Farr, A. L. and Randal, R. J. (1951). Proien measurement with the folin phenol reagent . J. Biol. Chmical. *193*: 265-575.

-Mackay , V.; Arendse , G. And Hastings , J. W. (1997). Purification of bacteriocin of lactic acid bacteria : Problems and pointers . Int. J. Food Microbiol., *34:* 1-16.

- Nonoyama , S.;Kojo, H.; Mine, Y.; Nishida, M. ; Goto, S. And Kuwahara, S. (1979). Inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and killing of rabbit polymorphonuclear leukocytes : mechanism of action of a polymrphonuclear leukocyte inhibitor . Infect. Immun.,*24* :399-403 .

-Perdigon , G.; Medici, M. ; Bibas , M. E.; valverde , M . and Pesce, A. (1993). Immunomodulating effect of lactic acid bacteria on mucosal and tumoral immunity . Int .J. Immunoth .*IX(1)* :29-52 .

- Popova , P.; Guencheva , G, ; Bogdanov , E. and Koychwv , C. (1993). Stimulating effect of deoden (an oral preparation from *L.bulgaricus "LB 51"*)on monocyte / macrophage and host resistance to experimental infection . Int. J. Immunoph . *15*:25 (Abs.).

-Rammelsberg , M; Muller, E. and Radler, E. (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei* . Arch. Microbiol, *154:*249-252.

-Rosenberg, S.A. and Leavy , R. (1972). Rapid assay cell mediated immunity to solubale antigens based on the stimulation of proten synthesis . J. Immunol.,*108* :100-187.

- Vignolo, G. M.;Suriani, F.,Halgado, A. P. R.and Oliver, G. (1993). Antibacterial Activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages . J. Appl. Bacteriol, *75* :344-349.

Effect of crude bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* on lymphocyte transformation

Abstract

Crude bacteriocin was extracted from local isolate of *Lactobacillus acidophilus* . Different concentrations 50, 100, 250, 500, 1000 μg /ml of bacteriocin were prepared . The was experimented on viability of human lymphocytes , It was found that there is no toxic effect of bacteriocin on these immune cell.
Three concentrations 250,500,1000 μg /ml were selected to investigate the effect of crude bacteriocin on human lymphocyte transformation . All concentrations of bacteriocin were induced proliferation lymphocytes .