التأثير المظهري لمضاد Ceftriaxone على جرثوميّ *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis*

د. محمود زكي الحسّو

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام ٢٠٠٨ / ٠٣ / ١٢ **القبول** ٢٠٠٨ / ٠٥ / ٠٧

ABSTRACT

The effect of ceftriaxone on the morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* was investigated by incubating the bacterial suspensions with serial doubled concentrations of the antibiotics for (4) hrs. The results showed that ceftriaxone induces obvious morphological changes in the tested bacteria. Cell elongation and filamentation, with various levels, were the most frequent changes observed. The study also found that these morphological changes depend on the antibiotic concentration.

الخلاصة

تم دراسة تأثير مضاد الـCeftriaxone على جرثومتي *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis* من الناحية المظهرية، من خلال تحضين المعلقات الجرثومية مع تراكيز مضاعفة متسلسلة من المضاد مدة (4) ساعات. أظهرت النتائج أن المضاد يحفز إنتاج تغييرات شكلية واضحة في المظهر الخارجي الجرثومي، كان من أبرزها استطالة الخلايا بمستويات متباينة وتكوين ظاهرة التخيط. ووجدت الدراسة إن هذه التغييرات المظهرية تعتمد على تركيز المضاد .

المقدمة

تؤثر المضادات الحيوية على الخلايا الجرثومية بطرق متنوعة ومتباينة، إذ إن لكل مجموعة من المضادات مواقع معينة تستهدفها في الخلية الجرثومية و يظهر تأثيرها عليها مما يؤدي إلى قتل أو تثبيط نمو الخلية حسب نوع التأثير وشدته والموقع الهدف، فب عض المضادات تستهدف عملية بناء البروتين الجرثومي وتثبطها وأخرى تستهدف وظيفة الغشاء البلازمي، وغيرها تستهدف الأحماض النووية ومكوناتها مما يؤدي إلى منع بناء هذه الأحماض الضرورية لحيوية الخلية وبقائها (3,2,1). ومن المضادات ما يستهدف بناء الجدار الخلوي الجرثومي وبالتحديد طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan Layer المميزة للجدر الجرثومية مما يعطيها سمية انتقائية عالية ، وتعد مضادات البيتا–لاكتام β-lactams من أهم هذه المضادات إذ تستهدف الجدر الجرثومية النامية وبالتحديد عملية بناء الجسور المستعرضة Transpeptidation بين مكونات طبقة الببتيدوكلايكان مؤدية إلى تخلخل الطبقة وتحطيمها (5,4). إن تأثير مضادات البيتا–لاكتام ومنها مضاد Ceftriaxone على الخلية الجرثومية يبدأ بارتباطها مع مستقبلات خلوية خاصة تعرف بالبروتينات الرابطة للبنسلين Penicillin Binding Proteins (PBPs) التي يعمل بعضها بوصفها أنزيمات تشترك في عملية بناء الجسور المستعرضة، هذا الارتباط يؤدي إلى حدوث تداخل مع بناء الج سور المستعرضة و من ثم توقف بناء الجدار الخلوي، يعقب ذلك تنشيط أنزيمات التحلل الذاتي Autolysins التي تعمل على تحلل الجدار الخلوي وتعريض الغشاء البلازمي لفرق الضغط الأوزموزي الذي يؤدي بالنهاية إلى انفجار الخلية وموتها (6,2).

تعد التغيرات المظهرية أو الش كلية أحد أهم العلامات الأولية على تأثير المضاد الحيوي لاسيما في حالة المضادات التي تستهدف شكل الخلية والجدار الخلوي مثل مضادات البيتا– لاكتام (8,7)، إذ إن تعريض الخلايا لمضادات البيتا– لاكتام يؤدي إلى إحداث تغييرات وتحويرات مهمة وملحوظة في شكلها من أهمها استطالة الخلايا أو ظهورها بشكل سلاسل وبروز بعض النتوءات على سطحها الخارجي، وفي بعض الحالات تزداد الاستطالة لتظهر الخلايا بشكل خيوط طويلة في ظاهرة تعرف بالتخيط Filamentation ، وهذه عادة ما تسبق تحلل الجدار لينتج خلايا فاقدة للجدر تعرف بالسفيروبلاست Spheroplast في حالة الجراثيم السالبة لصبغة كرام التي لا تلبث أن تنفجر بتأثير فرق الضغط واندفاع الماء إلى داخل الخلية ما لم توضع في وسط متعادل التركيز Isotonic medium (11,10,9).

ونظراً لكون مضاد Ceftriaxone أحد مضادات البيتا– لاكتام وبالتحديد سيفالوسبورينات الجيل الثالث التي لها فعالية واسعة ضد العديد من الأنواع الجرثومية بما فيها المعروفة بمقاومتها للمضادات الحيوية فقد جاء البحث الحالي بهدف تقييم ودراسة تأثيراته على نوعين من الجراثيم السالبة لصبغة كرام من الناحية المظهرية وملاحظة نوعية التغييرات المظهرية التي يسببها وطبيعتها وعلاقة ذلك بالتركيز المستخدم.

المواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية

استخدمت في الدراسة عزلتان جرثوميتان أحدهما تابعة للنوع *Ps.aeruginosa* والأخرى للنوع *Pr. mirabilis* ، كلتاهما معزولة من إصابات الجهاز التنفسي السفلي ومشخصة في كلية العلوم/ قسم علوم الحياة (13,12,2).

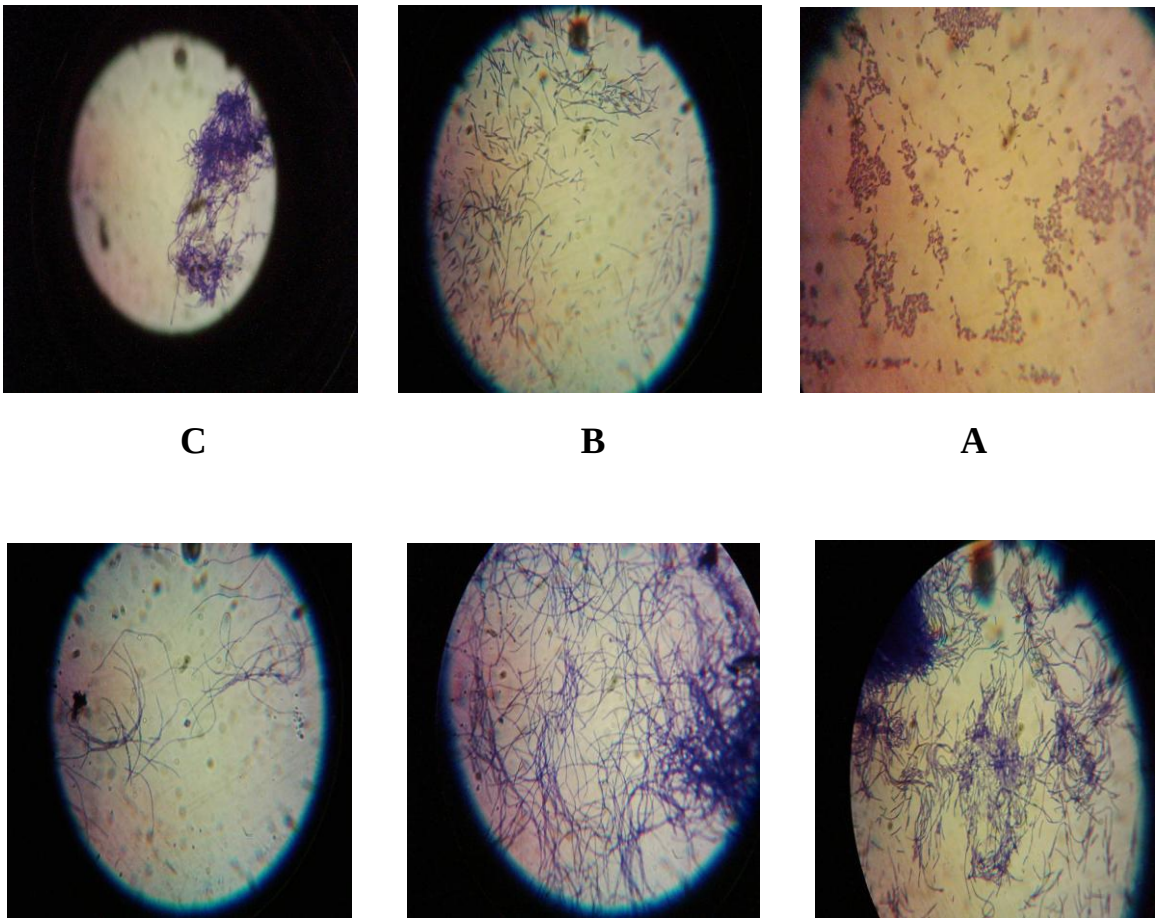
الدراسة المظهرية (الشكلية)

تم تحضير تراكيز مضاعفة متسلسلة (4--256 مايكروغرام/مل) من مضاد Ceftriaxone في وسط مرق مولر– هنتون المعقم وبحجم نهائي (1) مل لكل أنبوب مع عمل أنبوب سيطرة خال من المضاد . لقحت الأنابيب من المعلق الجرثومي الفتي الحاوي على ($10x3^8$) خلية/مل بعد مقارنته مع الأنبوب رقم (1) من أنابيب ماكفرلاند القياسية، وبواقع (0.1) مل لكل أنبوب . حضنت الأنابيب لمدة (4) ساعات بدرجة حرارة (35)م°، بعد انتهاء فترة التحضين أخذت نماذج من كل أنبوب وتم عمل مسحات منها على شرائح زجاجية نظيفة . بعد تثبيت المسحات صبغت بأزرق المثلين ثم فحصت تحت المجهر الضوئي باستخدام العدسة الزيتية ، لوحظت التغييرات المظهرية التي طرأت على الخلايا الجرثومية المعاملة مع المضاد وقورنت مع مثيلاتها في حالة السيطرة (14,7).

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج البحث الحالي أن للمضاد Ceftriaxone تأثيرات مظهرية واضحة على الشكل الخلوي الخارجي لكلا النوعين المدروسين (الشكل ٢،١)، وشملت هذه التغييرات استطالة الخلايا بدرجات متفاوتة اعتمادا على التركيز المستخدم من المضاد، إذ لوحظ إن الخلايا تأخذ بالاستطالة عند المعاملة مع المضاد مقارنة بالسيطرة التي ظهرت فيها الخلايا بشكل عصيات قصيرة (الشكل 2A,1A)، كما لوحظ في حالة التراكيز المرتفعة من المضاد إن هذه الاستطالة تأخذ

بالازدياد بشكل كبير بحيث أن الخلايا تأخذ شكل الخي وط الطويلة وهذه الظاه رة تعرف بالتخيط Filamentation ، وفي بعض الأحيان ظهرت هذه الخيوط بشكل تجمعات أو لفيف من الخيوط المتشابكة بكثافة وهي تشابه الغزل الفطري في ذلك (الشكل 2C,1C).



C **B** **A**

F **E** **D**

الشكل (1): تأثير مضاد Ceftriaxone على الشكل المظهري لجرثومة *Ps.aeruginosa*

A: معاملة السيطرة (بدون مضاد)، ظهور الخلايا بشكل عصيات قصيرة.

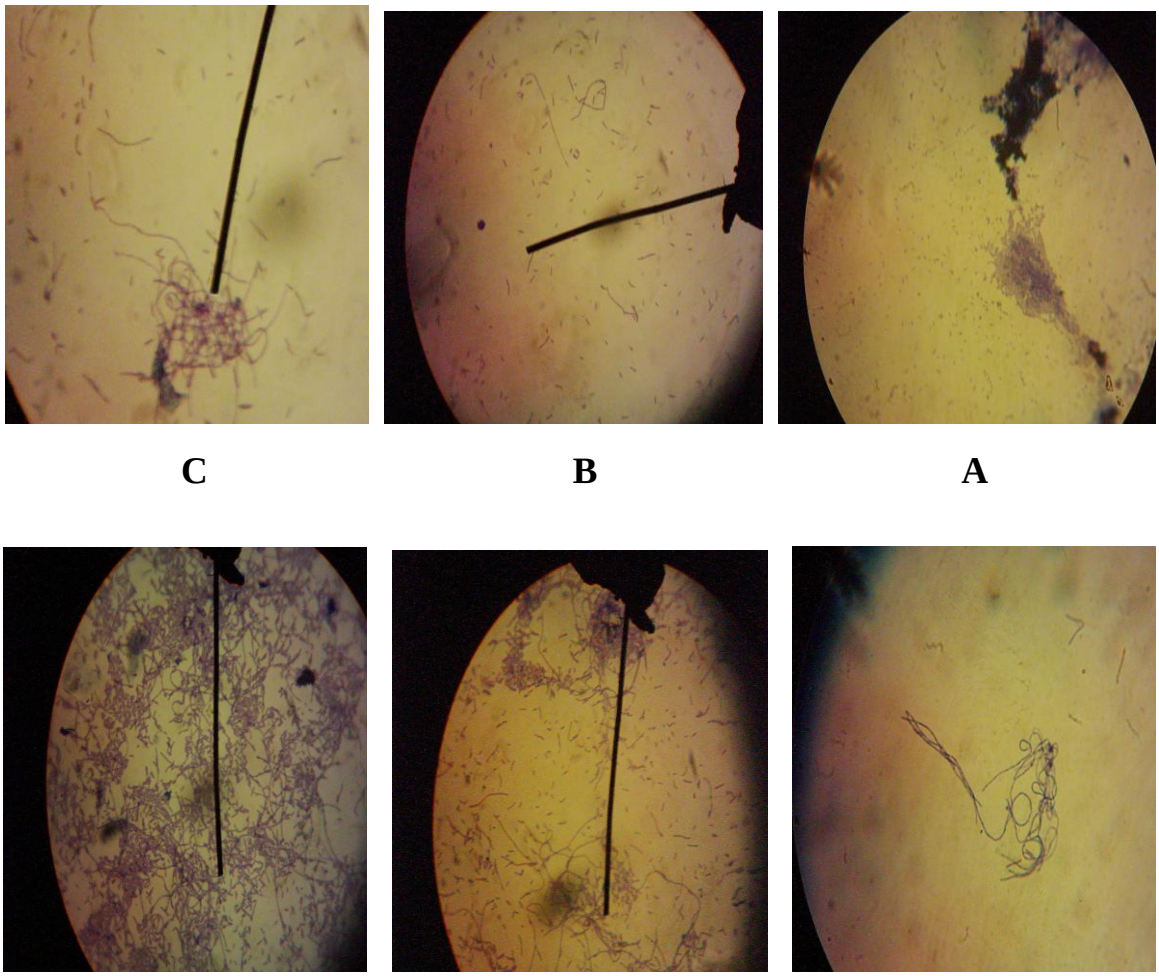
B: التركيز (١٦ مايكروغرام/مل)، بدء الخلايا بالاستطالة.

C: التركيز (٦٤ مايكروغرام/مل)، زيادة الاستطالة والتخيط وظهور ما يشبه الغزل الفطري.

D: التركيز (١٢٨مايكروغرام/مل)، زيادة التخيط الخلوي. **F,E:** التركيز (٢٥٦مايكروغرام/مل)، سيادة ظاهرة التخيط وظهور الخلايا بشكل خيوط طويلة جداً.

إن هذه التغييرات المظهرية الملاحظة على الشكل الخارجي للخلايا الجرثومية هي نتيجة للتأثيرات الناتجة عن المضاد، فكما ذكر سابقاً تعمل مضادات البيتا- لاكتام ومنها الـCeftriaxone

على تثبيط بناء الجدار الخلوي وان نتيجة ذلك تكون طبقة مخلخلة من البيتيدوكلايكان بسبب بقاء بعض المناطق فيها مفتوحة بانتظار المكونات الجديدة من البيتيدوكلايكان التي سيتم إضافتها إلى الطبقة القديمة لغرض حصول النمو في الجدار تمهيداً للانقسام الخلوي



A **B** **C**

D **E** **F**

الشكل (2): تأثير مضاد Ceftriaxone على الشكل المظهري لجرثومة *Pr.mirabilis*

A: معاملة السيطرة (بدون مضاد)، ظهور الخلايا بشكل عصيات كروية قصيرة.

B: التركيز (8 مايكروغرام/مل)، بدء ظهور الاستطالة الخلوية.

D,C: التركيز (16 مايكروغرام/مل)، زيادة الاستطالة والتخيط وظهور ما يشبه الغزل الفطري.

E: التركيز (32مايكروغرام/مل)، انتشار ظاهرة التخيط بين الخلايا الجرثومية.

F: التركيز (64مايكروغرام/مل)، توسع ظاهرة الاستطالة والتخيط لتشمل معظم الخلايا الجرثومية.

(6,2)، إلا أنه وبسبب تداخل المضاد مع عملية البناء سوف تبقى هذه المناطق مفتوحة ولا تتم إضافة المكونات الجديدة وهذا هو السبب في استطالة الخلايا وظهورها بشكل خيوط إذ إن هذه

الخلايا تكون هشة الجدر وذات ببتيدوكلايكان ضعيف ومخلخل، وهذه المرحلة تمثل تمهيداً للتحلل الذي يسببه تنشيط أنزيمات التحلل الذاتي Autolysins. كما تبين من نتائج البحث في حالة جرثومة *Pr. mirabilis* إن ظاهرة التخيط وظهور الاستطالة ال خلوية كانت أكثر وضوحاً وفي تراكيز أقل من المضاد مقارنة مع جرثومة *Ps.aeruginosa* (الشكل ٢)، وهذا قد يعزى إلى كون جرثومة *Pr.mirabilis* أكثر حساسية للمضادات من جرثومة *Ps.aeruginosa* وان تأثيرات المضاد ظهرت عليها باستخدام تراكيز أقل، في حين إن جرثومة *Ps.aeruginosa* المعروفة بمقاومتها للمضادات الحيوية أعطت نتائج مقاربة ول لكن باستخدام تراكيز أعلى من المضاد وهذا قد يعزى إلى امتلاكها لآليات معينة تمكنها من مقاومة هذا المضاد كأن تكون غير منفذة له أو أنها تنتج أنزيمات قادرة على تحطيمه مثل أنزيمات البيتا- لاكتاميز أو غيرها من الآليات مما يتطلب استخدام تراكيز أعلى من المضاد لغرض التأثير عليها (8,7). إن نتائج البحث الحالي تتفق مع ما وجده الباحثون Fonseca et al.,2004 (8) عندما درسوا تأثير مضاد Piperacillin\Tazobactam على جرثومة *Ps.aeruginosa* إذ لاحظوا أن المعاملة مع المضاد أدت إلى تحفيز ظاهرة التخيط وأشاروا إلى أن هذه التغيرات المظهرية عادة ما تؤدي إلى انخفاض القدرة الامراضية للجرثومة من خلال تأثيرها على عدد من عوامل الضراوة التي تمتلكها حيث سجلوا انخفاضاً ملحوظاً في قدرة الجرثومة على الالتصاق بالخلايا الطلائية وكذلك في حركتها ا لنشطة (السباحة Swimming motility) وتكوين الأغشية الحيوية Biofilms، وقد عزوا ذلك إلى التغيرات التي حصلت في شكل الجرثومة لاسيما ظاهرة التخيط بمستوياتها المختلفة وذكروا أن هناك ارتباطاً وثيقاً بين الحركة والالتصاق إذ إن تثبيط الحركة قد يفسر الانخفاض في عملية الالتصاق ومن ثم يؤدي إلى قلة الاستعمار الجرثومي Colonization وانتشار الإصابة إلى مناطق أخرى من الجسم مما يؤثر بشكل واضح على القدرة الامراضية للجرثومة (15,8).

كما أشارت دراسات أخرى إلى تكون تغييرات مظهرية متعددة في شكل الخلايا الجرثومية بتأثير المعاملة مع المضادات من أهمها ظاهرة التخيط والاستطالة وكذلك ظهور تراكيب شبيهة بالفقاعات أو الفجوات وظهور الانتفاخات والنتوءات السطحية وكذلك تكوين السلاسل وغيرها (11,10,9). وفي دراسة الباحثين Mangoni et al.,2004 (3) على أحد العوامل المضادة للجراثيم وتأثيره على جرثومة *E.coli* وباستخدام المجهر الالكتروني الماسح والنافذ لاحظوا من ضمن التأثيرات العديدة تغييرات وتحويرات شكلية واسعة ومتباينة من أبرزها التخشن العميق Deep roughening لسطح الخلية والمظهر الشبيه بالشبح Ghost-like appearance حيث بدت

الخلايا شفافة فارغة ومسطحة فضلاً عن حدوث انطواءات واضحة في الغشاء البلازمي، إلا أنهم لم يسجلوا حدوث تحطيم كبير للجدار الخلوي ولا وجود فجوات في سطح الخلية أو ظاهرة التخيط بوصفها أحد التغييرات البارزة في مظهر الخلية . إن هذا الاختلاف مع نتائج البحث الحالي قد يعزى إلى اختلاف المضاد المستخدم الذي وجدوا انه يؤثر بشكل رئيس على وظيفة الغشاء البلازمي وليس الجدار الخلوي (3).

لقد تبين من نتائج البحث الحالي إ ن مضاد Ceftriaxone بوصفه أحد مضادات البيتا– لاكتام يعطي تأثيرات واضحة على شكل الخلية ومظهرها الخارجي خ لال فترة زمنية قصيرة نسبياً، وإن من أهم هذه التغييرات استطالة الخلايا والتخيط، كما وجد إن هذه التغييرات تعتمد على التركيز المستخدم من المضاد وتتناسب معه طردياً . إن هذه التغييرات المظهرية هي بلا شك أحد المراحل المهمة في ظهور تأثير المضاد على الخلايا الجرثومية المختلفة يعقبها عادة التحلل وا لموت الخلوي، إلا أن تحديد الفترة الزمنية اللازمة لذلك يتطلب إجراء مزيد من الدراسة وبفترات زمنية أطول من التعريض للمضاد.

References

1. Garrod, L. P.; Lambert, H. P.; Ogrady, F. and Waterworth, P. M.. "Antibiotic and Chemotherapy".5th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, England, (1981).
2. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology". 5th ed., Lippincott-Raven publisher, Philadelphia, U.S.A., (1997).
3. Mangoni, M. L.; Papo, N.; Barra, D.; Simmaco, M.; Bozz, A.; DiGiulio, A. and Rinaldi, A.. Biochem. J., 380: 859-865, (2004).
4. Laurence, D. R. and Bennett, P. N. "Clinical Pharmacology" .6th ed., Churchill Livingstone, England, (1990) .
5. Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. "Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology". 22nd ed., Lange Medical Books/ McGraw-Hill Inc., U.S.A., (2001).

6. Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. "Microbiology". 3rd ed., Wm. C. Brown Communication, Inc., Iowa, U.S.A., (1996).

7. Sanders, C. C.; Sanders, W. E. and Goering, R. V. Antimicrob. Agents Chemother., 21: 968-975, (1982).

8. Fonseca, A. P.; Extremina,C.; Fonseca, A. F. and Sousa, J. C. J. Med. Microbiol., 53: 903-910, (2004) .

9. Waisbren, S. J.; Hurley, D. J. and Waisbren, B. A. Antmicrob. agents Chemother., 18:969-975, (1980) .

10. Chan, E. L.; Harris, R. C. and Dalton, H. P. J. Med. Microbiol., 23:149-154, (1987).

11. Hanberger, H.; Nilsson, L. E.; Nilsson, M. and Maller, R. Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis., 10: 927- 934, (1991).

١٢. الحسّو، محمود زكي سليمان. استخلاص وتنقية أنزيمات البيتا- لاكتاميز من بعض العصيات السالبة لصبغة كرام المعزولة من إصابات الجهاز التنفسي السفلي ودراسة بعض خصائصها . أطروحة دكتوراه. كلية العلوم، جامعة الموصل، (2006).

13. Mac Faddin, J. F. "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria". 2nd ed., Williams & Wilkins company, Baltimore, U.S.A., (1985).

14. Baron, E. J.; Peterson, L. R. and Finegold, S. M. "Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology" .9th.ed., Mosby-Year Book, Inc., U.S.A., (1994).

15. Labro, M. T.; Babin-Chevaye, C. and Hakim, J. J. Antimicrob. Chemother., 22: 341-352, (1988), Cited by Fonseca et al., J. Med. Microbiol., 53: 903-910, (2004).