دراسة الفعالية البلعمية وفعالية المصل القاتلة للجراثيم لدى مرضى داء السكر ومقارنتها بالأصحاء

زياد ذنون الرسام
قسم علوم الحياة
كلية العلوم – جامعة الموصل

أديبة يونس شريف
قسم علوم الحياة
كلية العلوم – جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2005/12/19
تاريخ القبول 2006/3/7

Summary

This study which included (45) diabetic patients at age groups (11-71) years, fifteen male and thirty females compared with normal control, 5 male and 10 females showed a significant decrease in the bactericidal activity of the serum using diabetic sera containing high glucose concentration while those containing low glucose concentration showed a clear bactericidal activity. The results also showed a significant a decrease in the phagocytic activity of neutrophiles among the diabetic patients compared with the control group. The isolates of *Alcaligenes* showed sensitivity toward non·immunized human serum, *A. faecalis* showed high sensitivity toward the serum while the subsp *A. Xylosoxidans. denitrificans* and *A. Xylosoxidans xylosoxidans* are showed different sensitivity toward non –immune serum after (3) hours of incubation.

Key words: phagocytic activity, serum bactericidal activity

الخلاصة

أظهرت نتائج الدراسة التي شملت (45) مريضاً مصاباً بداء السكر وبأعمار تراوحت بين (11-71) عاماً، توزعوا على (15) ذكراً و(30) أنثى، وعينة سيطرة من أصحاء شملت (5) ذكور و(10) إناث، انخفاض فعالية المصل في قتل البكتريا انخفاضاً معنوياً عند استخدام المصول المأخوذة من مرضى داء السكر بتراكيز الكلوكوز العالية، في حين أظهرت المصول

ذات التراكيز الواطئة من الكلوكوز فعالية واضحة في قتل البكتريا. كما بينت النتائج انخفاض الفعالية البلعمية للخلايا العدلة انخفاضاً معنوياً لدى مرضى داء السكر مقارنـــة بالأصـــحاء. أظهرت النتائج حساسية عزلات البكتريا *Alcaligenes* تجاه المصل البشري غير الممنع، إذ أبدى أفراد النوع *A. faecalis* حساسية عالية تجاه المصل، في حين اظهر أفراد تحت النوع *A. Xylosoxidans. Denitrificans* و *A. Xylosoxidans xylosoxidans* حـــساسية متباينة تجاه المصل الطبيعي غير الممنع بعد (3) ساعات من التحضين مع المصل.

كلمات المفتاح : الفعالية البلعمية، فعالية المصل القاتلة للبكتريا.

المقدمة

تؤدي المناعة غير المتخصصة دورا مهما في الحد من الإصابة ومن تكـــاثر الجـــراثيم المختلفة داخل الجسم، وتعد الفعالية البلعمية إحدى الآليات الدفاعية غير المتخصصة للمضيف وقد اكتشفها العالم Metchnekoff عام (1887) (Bernard ,1978 ; Benjamini *et al* 2000,). يشترك في هذه الوظيفة نوعان مـــن الخلايـــا، همـــا الخلايـــا البلعميـــة الكبيـــرة Macrophage ، والخلايا البلعمية الصغيرة Microphage ، تنجذب الخلايا البلعمية إلـــى منطقة الإصابة جراء تحفيزها بوساطة العديد من السايتوكينات منها IL-6 وIL-8 و IF-α وعدد من مكونات المتمم استجابة للحالة الالتهابية (Peterson *et al.*,1977 ; Cooper ,1982; Wilson & Reeves, 1986). يبتلع الجسم الغازي بعد التصاقه بالخلية البلعميـــة عن طريق مستقبلات الجزء Fc للكلوبيولين الممنع أو مستقبلات الجزء C_{3b} للمتمم، بعد ذلك تتعرض الجرثومة المبتلعة للتحلل الإنزيمي والقتل بالية القتل المعتمد وغير المعتمـــد علـــى الأوكـــسجين (Miller *et al.*,1991 ; Janeway *et al.*,1997 ; Play fair & Chain ,2001) .

يعد المتمم أحدى الآليات المناعية غير المتخصصة ضد الجراثيم الغازية وقـــد اكتـــشفها Bordet في عام (1895) بحسب ما أشار إليه Gupte وجماعته في عـــام (1979). يمثـــل نظام المتمم أساس هذه الآلية إذ يؤدي دوراً مهماً في الدفاع الأولي والحماية ضد الإصـــابات الجرثومية في المضائف غير الممنعـــة (Barrett,1976 ; Stites *et al.*,1982 ; Taylor., 1983; Williams *et al.*, 1983 ; Merino *et al.*,1992; Roitt *et al.*,1998). وهو عبارة عن مجموعة من البروتينات غير المقاومة للحـــرارة تـــشكل (10%) مـــن مجمـــوع بروتينات المصل، اذ يتكون من أكثر من (20) جزءاً تقريباً و يؤدي دوراً في تطور الاستجابة المناعية والسيطرة على التفاعلات الالتهابية وعملية الانجذاب الكيميائي والفعالية البلعمية، كما

يؤدي هذا النظام دوراً في تطور استجابة الأجسام المضادة ودوراً رئيساً في التأثير في أمراض الدم المناعية، تعمل مكونات الجدران الخلوية لعدد من أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام او سمومها دوراً في تنشيط المتمم وتحفيزه من خلال مسارات عديدة تؤدي إلى تكوين المعقد المناعي الذي يعمل على تحليل الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام (Golub ,1987; Benjamini *et al.*,2000; Playfair & Chian,2001).

طرائق العمل

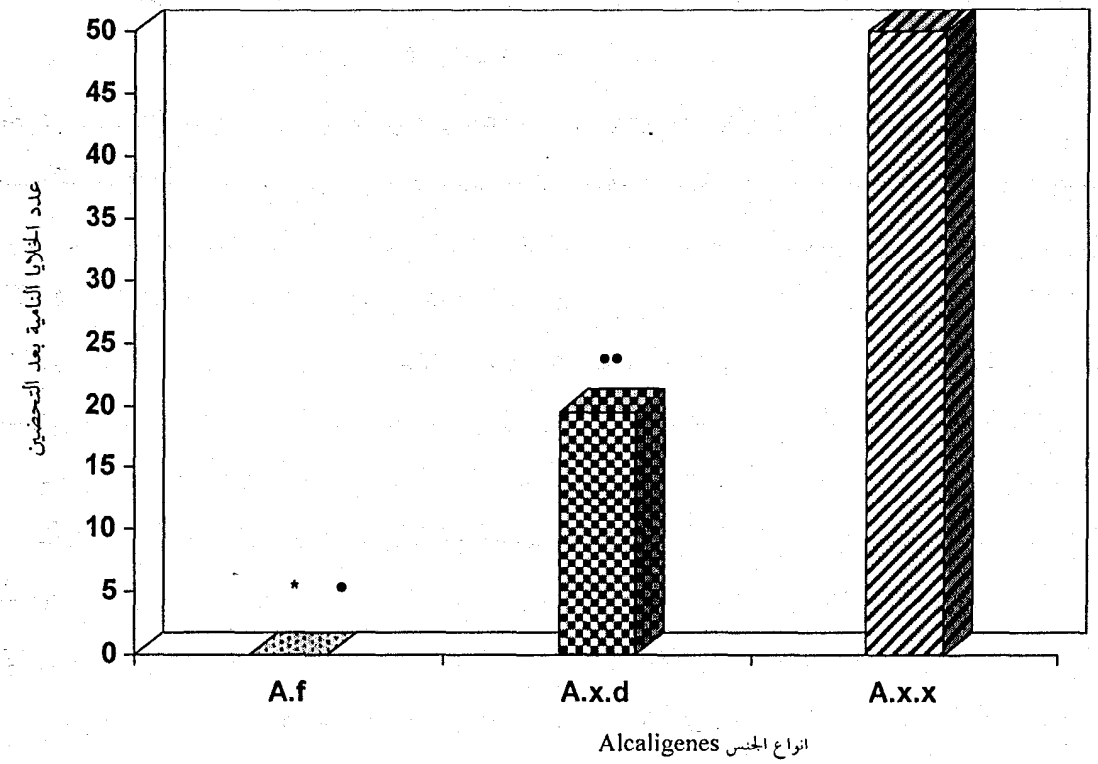
جُمعت عينات دم من (45) مريضاً مصاباً بداء السكر وبأعمار تراوحت بين (11-71) عاماً، توزعت على (15) ذكراً و (30) أنثى وهم من المرضى المراجعين للعيادات الاستشارية في كل من مستشفى السلام، ابن سينا ومركز الوفاء لأبحاث وعلاج داء السكر في مدينة الموصل، للمدة مابين تموز 2002 وآذار 2003، كما أخذت (15) عينة دم لأشخاص أصحاء شملت (5) ذكور و (10) إناث عينة للسيطرة، مع الأخذ بالحسبان عدم استخدام المرضى للمضادات الحيوية خلال مدة (48) ساعة قبل جمع العينات، وضعت عينة الدم الوريدي في حاويتين معقمتين، احتوت الأولى على مادة مانعة للتخثر (EDTA) استخدمت لاختبار عملية البلعمة، أما الثانية فقد استخدمت لتحضير المصل وذلك بتعريضها للطرد المركزي بسرعة (3000 xg) مدة (10) دقائق بعد تخثر الدم، واستخدمت في قياس تركيز السكر في الدم والاختبارات المناعية (Talib ., 1996).

1. قياس تركيز السكر في حالة الصيام، أجري الاختبار على وفق الطريقة اللونية الإنزيمية Enzymatic Colorimetric باستخدام عدة الفحص المجهزة من شركة (Biomaghreb).
2. اختبرت الفعالية البلعمية لكريات الدم البيض باستخدام صبغة (NBT) اعتمادا على طريقة (Park *et al.*,1968).
3. اختبار حساسية البكتريا *Alcaligenes* لمصل الدم ، كشف عن حساسية الانواع الثلاثة المعزولة لبكتريا *Alcaligenes* التي شملت *A. faecalis* ، *A. denitrificans* ، *xylosoxidans* *A. xylosoxidan xylosoxidans* تجاه المصل البشري غير الممنع وبإتباع طريقة Merino وجماعته عام (1992) المحورة .
4. قياس تركيز مكونات المتمم C_3 , C_4 ، قيست تراكيز كل من C_3 , C_4 بطريقة الانتشار ألشعاعي المناعي المفرد البسيط (C. R. I. D) وباستخدام أطباق خاصة مجهزة من شركة (Biomaghreb) .

المناقشة

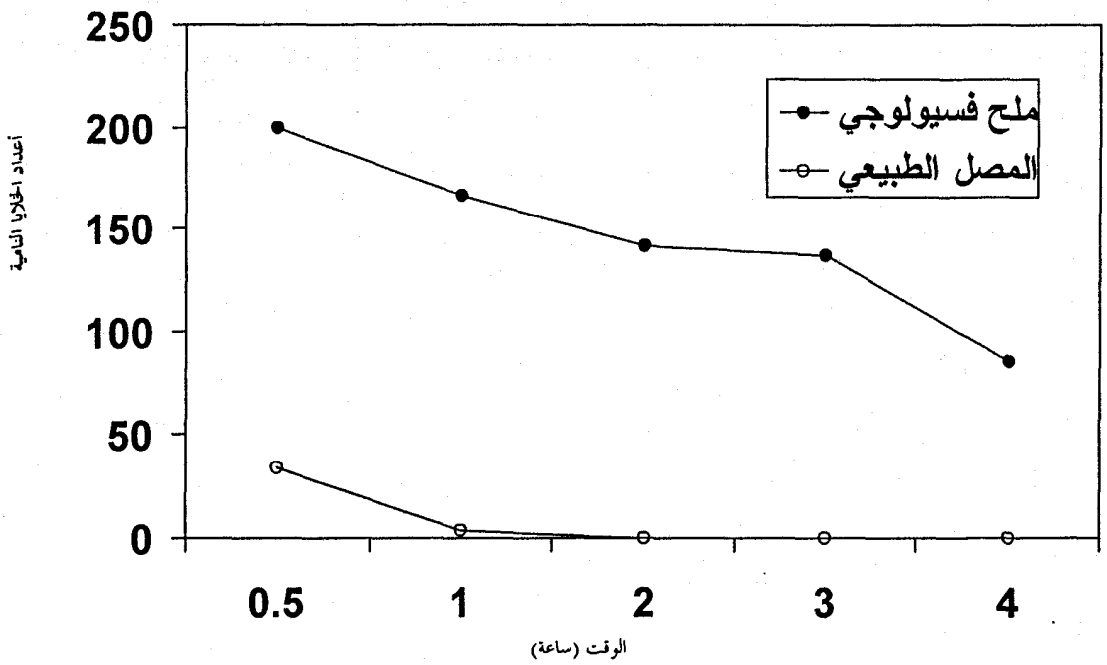
أظهر اختبار تحديد حساسية عزلات البكتريا *Alcaligenes* للمصل البشري غير الممنع التي حسبت بدلالة معدل عدد الخلايا النامية على الوسط الزرعي الصلب وحساسية أفراد النوع *A. faecalis* للمصل، إذ استطاع المصل القضاء على الخلايا البكتيرية جميعا بعد (3) ساعات من التحضين معه، في حين أظهرت أفراد تحت النوع *A. Xylosoxidans. denitrificans* حساسية متوسطة تجاه المصل التي ظهرت من خلال تمكن أعداد قليلة منها النمو بعد مدة (3) ساعات من التحضين مع المصل، وتميزت أفراد تحت النوع *A. Xylosoxidans xylosoxidans* بمقاومتها لتأثير المصل غير الممنع المحضنة معه الذي أتضح من خلال النمو الكثيف على وسط الاكار المغذي مقارنة بمعاملة السيطرة الشكل (1). وهذا يرجع الى احتواء المصل على عوامل مناعية مهمة في إعطاء المقاومة للجسم (Merino *et al.*, 1992)، أما الاختلاف في مقاومة تحت النوع *A. Xylosoxidans xylosoxidans* وتحت النوع *Xylosoxidans denitrificans* فقد يعود إلى الاختلاف في خصائصها الفسلجية.

تظهر نتائج اختبار تحديد المدة اللازمة لقتل البكتريا *A.faecalis* المحضنة مع المصل الطبيعي غير الممنع (الشكل 2) الانخفاض الحاد في اعداد الخلايا البكتيرية النامية بعد مدة (0.5) ساعة من بدء التحضين مع المصل، وتجاوزت نسبة الخلايا المقتولة خلال هذه المدة تجاوزت (80%) من العدد الكلي للخلايا المحضنة، واختفى النمو كلياً بعد (3) ساعات من التحضين مع المصل. وذلك لان المصل الطبيعي يعد غنياً بالمكونات المناعية المهمة للجسم ومنها المتمم (Merino *et al.*,1992) .



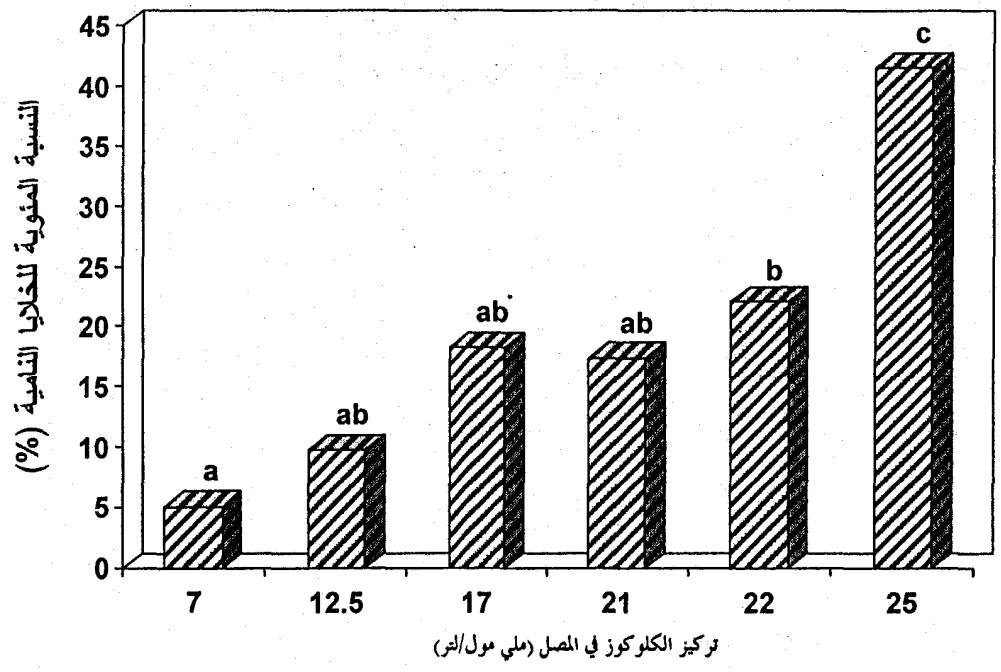
• فرق معنوي بين A.f و A.x.d (p<0.01) ، •• فرق معنوي بين A.f و A.x.x (p<0.0001) ، •• فرق معنوي بين A.x.d و A.x.x (p<0.01)

الشكل (1): مقارنة بين حساسية الأنواع الثلاثة تجاه المصل الطبيعي غير الممنع .



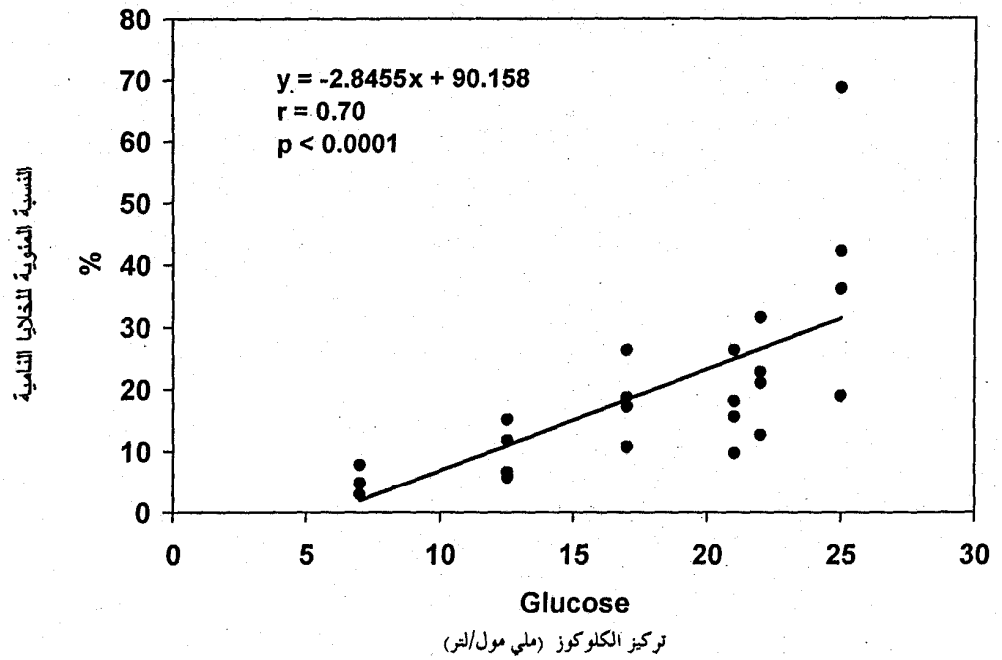
الشكل (2): العلاقة بين أعداد خلايا البكتريا *Alcaligenes faecalis* النامية في المصل الطبيعي غير الممنع وزمن التحضين .

أما تأثير المصل المأخوذ من مرضى داء السكر فيبين الشكل (3) إن التأثير القاتل له يعتمد على مستوى السكر في الدم إذ تبين نتائج التحليل الإحصائي للاختبار المقارنة بين قابلية المصل المأخوذ من المرضى داء السكر ومصل الأشخاص الأصحاء على قتل البكتريا *A. faecalis*، وبإتباع طريقة (Merino *et al.*, 1992) المحورة، وجود فرق معنوي بين قابلية المصل على قتل خلايا البكتريا عند تراكيز كلوكوز (≤ 22) ملي مول/ لتر والتي تمثلت بزيادة نسبة الخلايا البكتيرية النامية بوجود المصل، مقارنة مع نموها بوجود مصل السيطرة الطبيعي، كما اظهر التحليل الإحصائي للنتائج عدم وجود فرق معنوي بين قابلية مصل الدم المأخوذ من مرضى داء السكر وبتراكيز كلوكوز تراوحت ما بين (12.5-22) ملي مول / لتر على قتل البكتريا *A. faecalis* وقابلية مصل السيطرة الطبيعي في حين اظهر المصل الحاوي لتركيز كلوكوز (25) ملي مول/لتر انخفاضاً في فعاليته على القتل تميزت عن التراكيز الأخرى جميعا، الشكل (3). وارتبطت الزيادة في اعداد خلايا البكتريا *A.faecalis* النامية بوجود المصل مع الزيادة في تركيز كلوكوز المصل لدى مرضى داء السكر بما يعكس الانخفاض في قابليته على السيطرة على البكتريا. الشكل (4) .

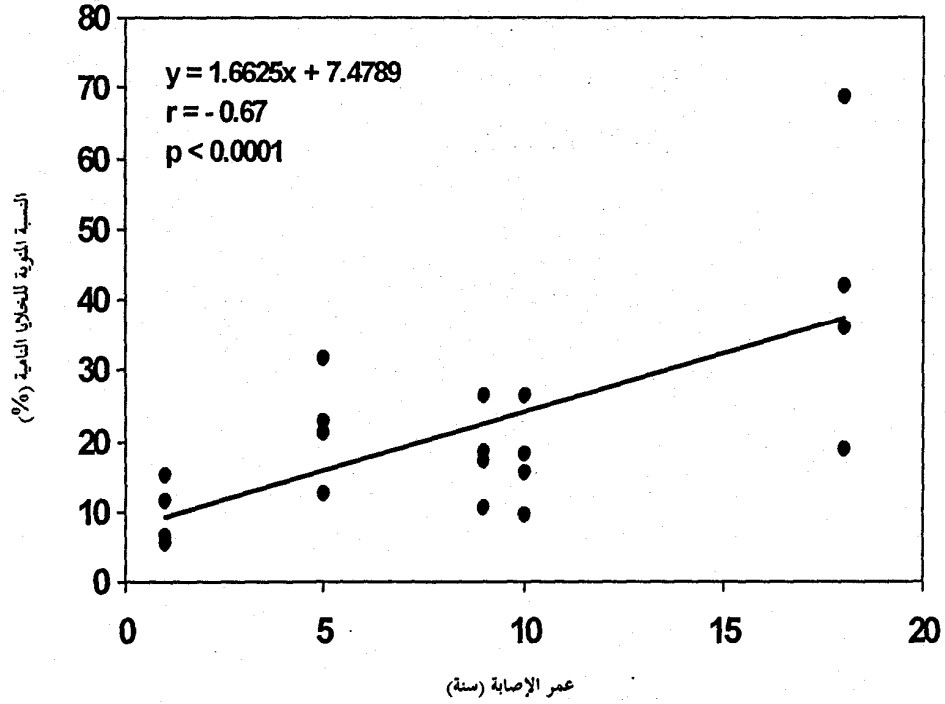


الحروف المختلفة تعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$)

الشكل (3): تأثير تركيز كلوكوز مصل مرضى داء السكر على نمو البكتريا *Alcaligenes faecalis* المحضنة معه.



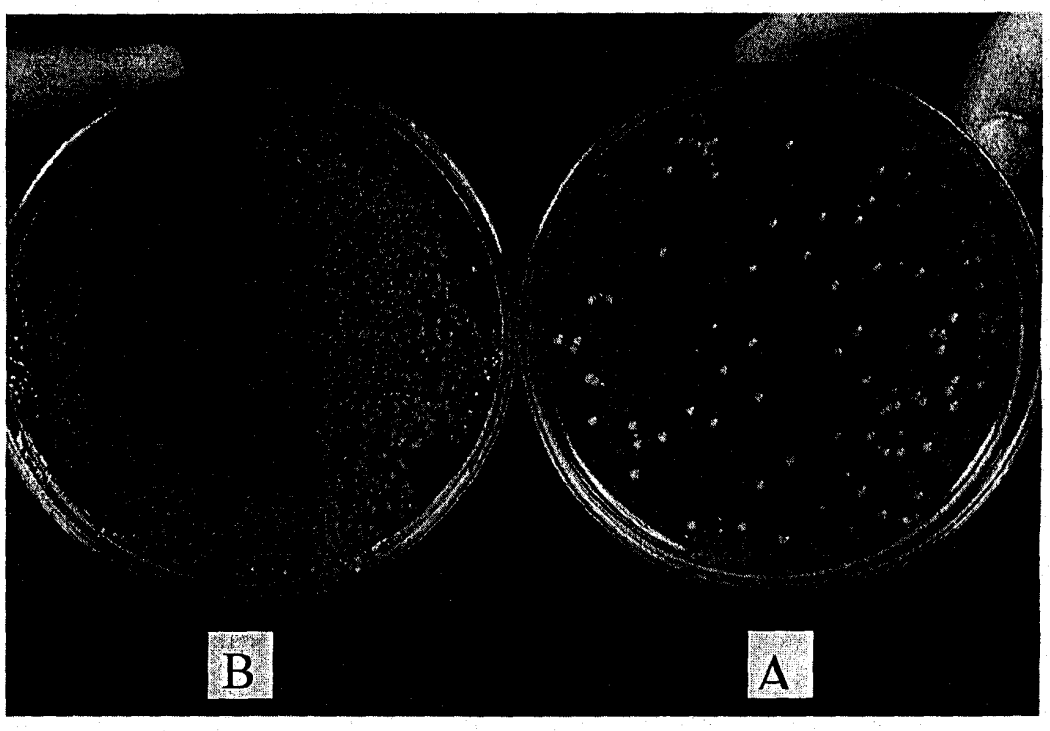
الشكل (4): العلاقة بين تركيز كلوكوز مصل مرضى داء السكر والنسبة المئوية لخلايا البكتريا *A.faecalis* النامية فيه.



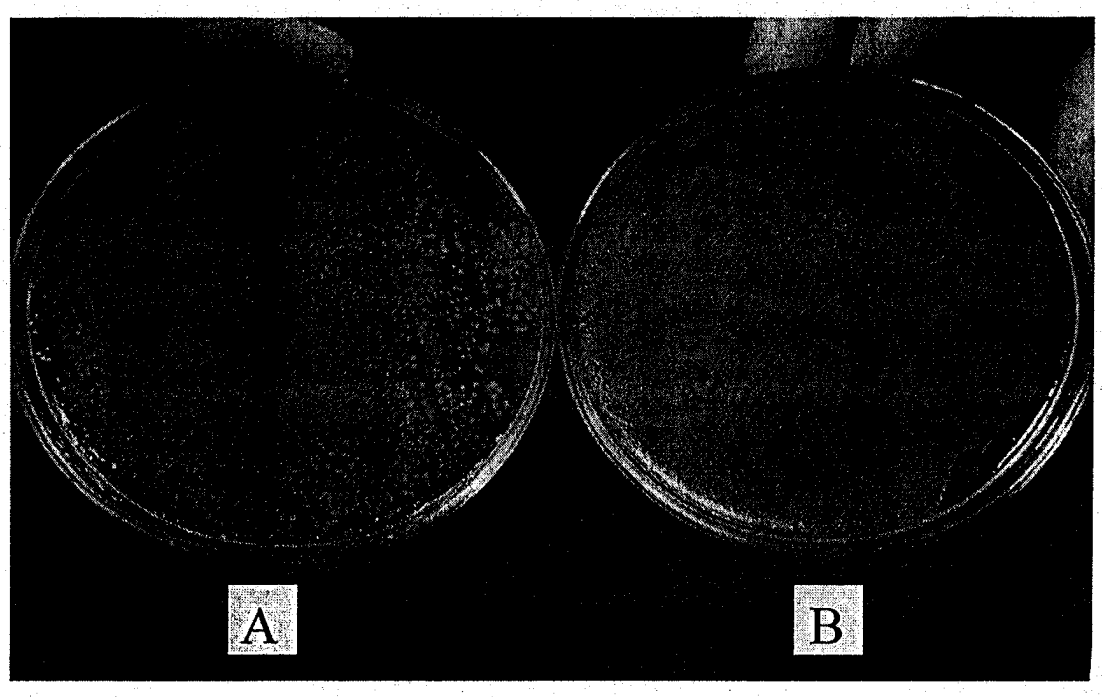
الشكل (5): العلاقة بين عمر الإصابة بداء السكر غير المسيطر عليه وعدد خلايا البكتريا *A.faecalis* النامية في المصل.

تبين النتائج الموضحة في الشكل (5) إن قدم الإصابة بداء السكر غير المسيطر عليه يؤثر في فعالية المصل القاتلة للبكتريا، الذي أتضح من خلال الزيادة في أعداد الخلايا البكتريا النامية بوجود المصل المأخوذ من مرضى داء السكر، وبأعمار إصابة (≤ 15) عاماً وعند تركيز كلوكوز (5 .17) ملي مول/ لتر.

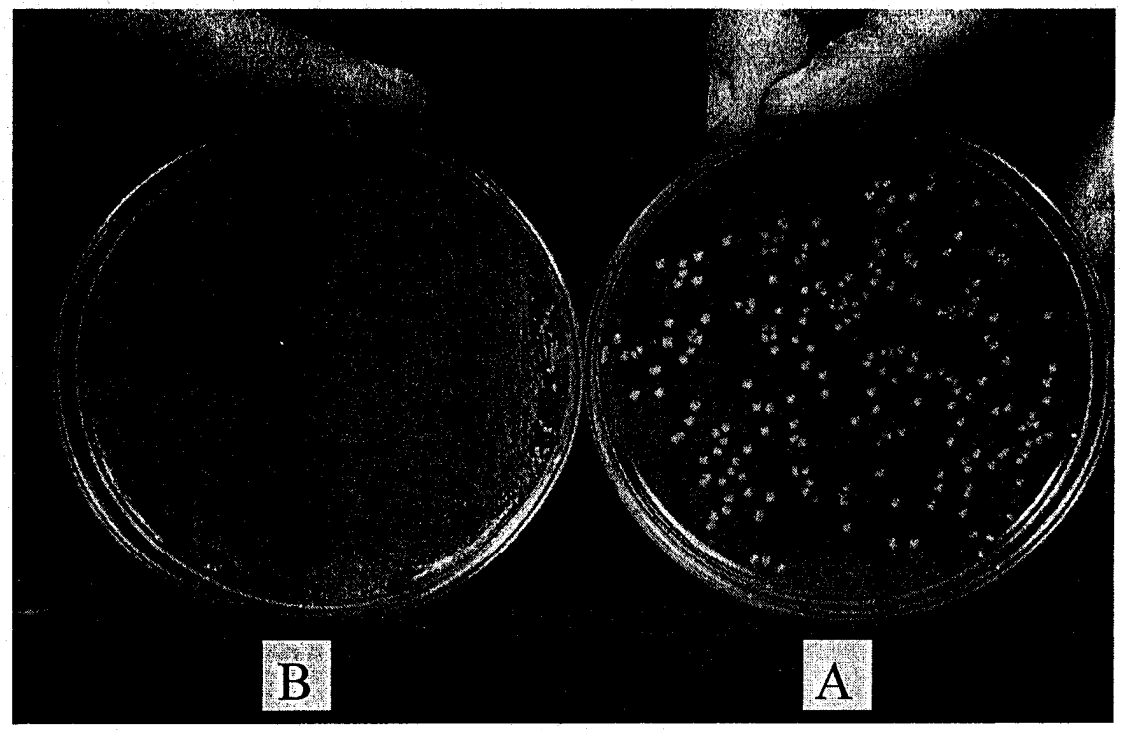
وتوضح الصورة (1) مقاومة خلايا البكتيرية *A. faecalis* لتأثير المصل المأخوذ من المصابين بداء السكر عند تركيز كلوكوز (25) ملي مول/لتر، مقارنة بتأثير المصل الطبيعي للأصحاء، إذ تظهر نتائج المقارنة الفرق الواضح بين أعداد الخلايا البكتيرية النامية على الوسط الزرعي.



الصورة (1): مقارنة بين مصل شخص سليم A وB مصل مريض مصاب بداء السكر بتركيز كلوكوز (25) ملي مول / لتر، فيما يخص قتل البكتريا *A. faecalis* .



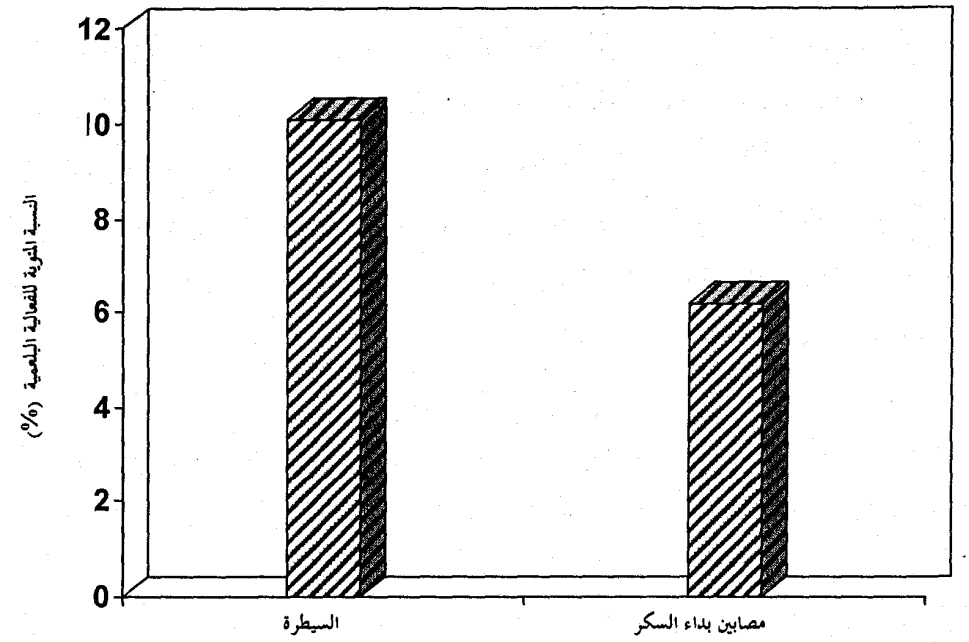
الصورة (2): مقارنة بين تأثير مصل مريض مصاب بـداء الـسكر ذي تركيـز كلوكـوز (25) ملي مول / لتر A و B الملح الفسيولوجي فيما يخص قتل البكتريا *A. faecalis*



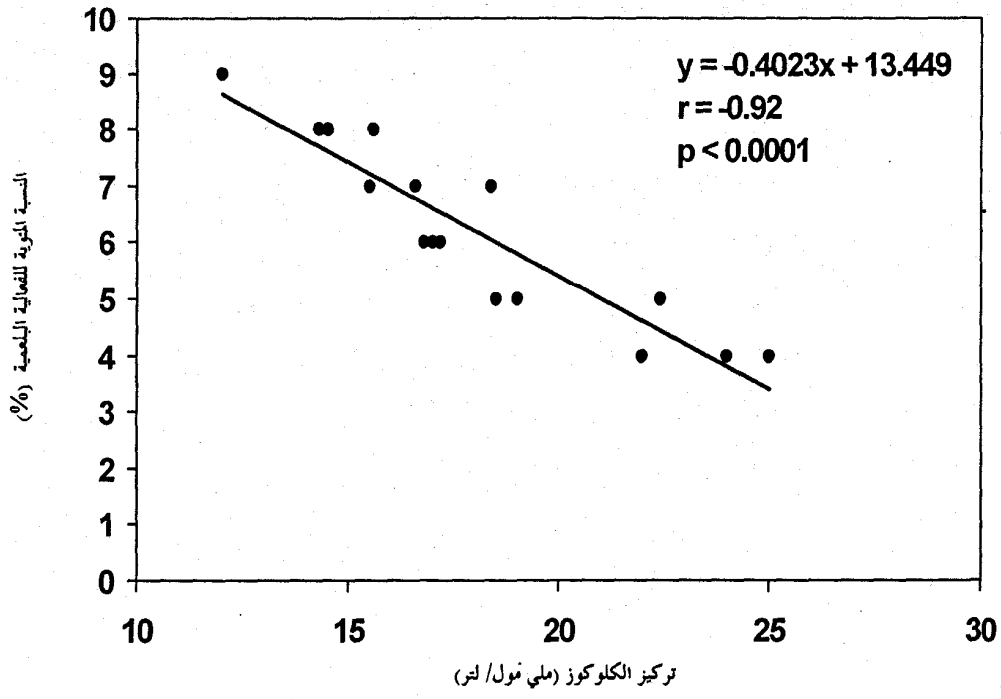
الصورة (3): مقارنة بين تأثير مصل مريض مصاب بداء السكر ذي تركيز كلوكوز (12.5) ملي مول / لتر A و B الملح الفسيولوجي على قتل البكتريا *A. faecalis*

تظهر النتائج الموضحة في الصورتين (2) و (3) تأثير التباين في تركيز كلوكوز المصل لمرضى داء السكر في قابليته على قتل البكتريا *A.faecalis* المحضنة معه، إذ استخدم في الصورة (2) مصل لمريض بداء السكر ذي تركيز كلوكوز (25) ملي مول/ لتر اظهر نمواً كثيفاً لبكتريا *A.faecalis* وغير القابل للعد، في حين اظهر مصل مريض داء السكر وعند تركيز كلوكوز (12.5) ملي مول /لتر (الصورة 3) تأثيرا واضحاً مقارنة بالنتائج الموضحة في الصورة (2)، إذ تؤدي الزيادة في تركيز الكلوكوز المصل إلى انخفاض في فعالية المتمم مما يؤدي إلى حدوث حالة التثبيط المناعي لدى المرضى المصابين بداء السكر (Bharat , 2003)، وينتج هذا الانخفاض في فعالية المتمم عن مهاجمة الجزء c_3b من المتمم للخلايا الطلائية للأوعية الدموية وتكوين الخثرة بدلاً من سلوكه الطريق الأساس في الارتباط بالمعقد المناعي وإكمال تنشيط المتمم في المسار الكلاسيكي(Zhang *et al.*, 2002).

أظهر اختبار المقارنة لكفاءة الفعالية البلعمية للخلايا العدلة لدى المصابين بداء السكر والأصحاء وجود فرق معنوي بين أفراد المجموعتين أتضح من خلال التحليل الإحصائي للنتائج المبينة في الشكل (6)، ومن دراسة العلاقة بين تركيز كلوكوز المصل والفعالية البلعمية أوضحت النتائج وجود ارتباط وثيق بين الزيادة في تركيز كلوكوز المصل وانخفاض الفعالية البلعمية للخلايا العدلة (الشكل 7). وهذا يتفق مع نتائج Saeed وCastle عام (1998) في ان الانخفاض في الفعالية البلعمية لدى مرضى داء السكر يرتبط بالارتفاع في مستوى كلوكوز الدم الذي يعمل على إتلاف مستقبلات الجزء Fc للكلوبيولين الممنع IgG ومستقبلات الجزء C_3 من مكونات المتمم الموجودة على سطوح الخلايا البلعمية فضلا عن إنتاج خلايا بلعمية ذات مستقبلات غير طبيعية، كما إن التراكم المستمر للمركبات الاسيتونية في الدم جراء الايض غير الطبيعي للكلوكوز الفائض يزيد من حموضة الدم ويؤدي إلى تثبيط الفعالية البلعمية للخلايا العدلة من خلال تثبيط عمل إنزيم Myeloperoxidase المسؤول عن إنتاج الأوكسجين المنفرد الفعال في عملية قتل الجرثوم المبتلع داخل الخلية البلعمية. وهذا يؤكد ما توصل إليه Sanchez وجماعته عام (1973) من إن تناول الأصحاء لـ (100) غم من السكر النقي تكفي لتثبيط الفعالية البلعمية للخلايا العدلة مدة لا تقل عن (5) ساعات، وهذه النتائج توضح استعداد الأشخاص المصابين بداء السكر للتعرض للإصابات الثانوية والمتمثلة بإصابة المجاري البولية والتنفسية والتقرحات الجلدية (Segado *et al.*, 1999) .

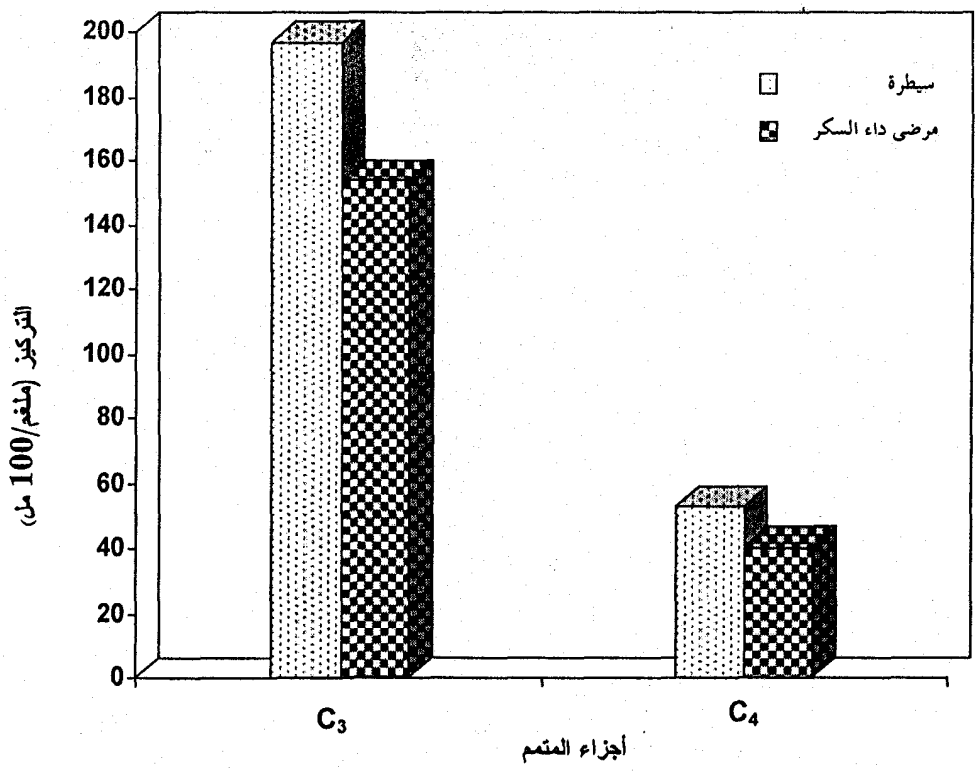


الشكل (6): النسبة المئوية للفعالية البلعمية لكل من مجموعة مرضى داء السكر ومجموعة السيطرة .



الشكل (7): العلاقة بين تركيز كلوكوز المصل والفعالية البلعمية للخلايا العدلة .

تظهر نتائج التحليل الإحصائي الخاصة بالمقارنة بين تراكيز أجزاء المتمم C_3 و C_4 في كل من مجموعة مرضى داء السكر ومجموعة الأصحاء، عدم وجود فروق معنوية بين تراكيز أجزاء المتمم C_3 و C_4 في كلتا المجموعتين. الشكل (8) وهذه النتيجة لا تتفق مع نتائج Bharat عام (2003) الذي أشار إلى أن الإصابة بداء السكر تؤدي إلى تثبيط مناعة الجسم من خلال خفض مستويات المتمم في المصل. إلا أنها تتفق مع نتائج Herman عام (2001) الذي أشار إلى بقاء مستويات C_3 و C_4 في مصل مرضى داء السكر ضمن معدلاتها الطبيعية، بيد أن بقاء تراكيز أجزاء المتمم ضمن معدلاتها الطبيعية في مصول مرضى داء السكر لا يعكس الصورة الحقيقية لفعاليتها مقارنة بالأصحاء، اذ يقوم الجزء الفعال C_3b من المتمم لدى المرضى المصابين بداء السكر بتغيير مساره والعمل على مهاجمة الخلايا الطلائية المبطنة للأوعية الدموية بدلاً من ارتباطه بالمعقد المناعي وإكمال تنشيط المتمم على وفق المسار الكلاسيكي (Zhang *et al.*,2002). لذلك فان التراكيز المرتفعة لسكر الكلوكوز في الدم تثبط الفعالية البلعمية لدى المريض وتجعله عرضة للإصابات الثانوية (Abrass & Gin, 1993 ; Hori ,1984).



الشكل (8): تركيز مكونات المتمم C_3 و C_4 في مصل كل من مجموعة مرضى داء السكر ومجموعة السيطرة.

وهذا يؤكد ما خلصت إليه مجموعة من الدراسات من أن الإفراط في تناول الكربوهيدرات ومنها العسل يؤدي إلى تثبيط فعالية الجهاز المناعي على نحو عام . (Kos *et al.*,1984 ; Nutter, 1983 ; Ringsdorf *et al.*,1976)

المصادر

1- Abrass, C. K. and Hori, M. (1984). Alterations in Fc receptor function of macrophages from streptozotocin induced diabetic rats. J. Immunol. Vol. 133. Issue(3). pp. 1307-1312.

2- Barrett, J. T. (1976). Basic immunology and its medical application. C. V. Mosby company. pp. 8-13; 83-86.

3- Benjamini, E.; Coico, R. and Sunshine, G. (2000). Immunology a short course. Wiley-Liss. Inc, USA. pp. 18-26, 57-78, 224-225, 361.

4- Bernard, M. D. (1978). Oxygen dependent microbiol killing by phagocytosis. N. Engl. J. Med. 298 (12) :659-667.

5- Bharat, B. T. (2003). Diabetes and infection. Smt. N.H.L. Municipal Medical. College. Ahmad Abad.

6- Cooper, E. L. (1982). General Immunology. Pergamon. Press. Oxford. P:124-126.

7- Gin, H. (1993). Infection and diabetes. Rev. Med. Interne. 14(1): 32-38.

8- Golub, E. S. (1987). Immunology a synthesis. Sinauer Associates inc, Sunderland, USA. pp. 444-445.

9- Gupta, P. R. ; Bajpai, H. S. and Srivatava, P. K. (1979). Urinary tract infection in diabetes mellitus. J. Indian. Med. Assoc. 72:231-234.

10- Herman, W. H. (2001). Renal Disease in type 1 Diabetes. Clin. Diabetes. 19(2). 74.

11- Janeway, C. A.; Travers, P.; Hunt, S. and Walport, M. (1997). Immuno Biology. The immune system in health and disease. 3th ed, current biology Ltd Garland publishing inc, New York. USA. pp. 8:17-18.

12- Kos, W. L.; Kos, K. A. and Kaplan, A. M. (1984). Impaired function of immune reactivity to *Listeria monocytogenes* in diet-fed mice. Infect immun. 43: 1094-1096.

13- Merino, S.; Camprubi, S.; Alberti, S.; Benedi, V. T. and Tomas, J. M. (1992). Mechanism of *Klebsiella pneumonia* resistance to complement mediated killing. Infect. Immunol, 60 (6) :2529-2535.

14- Miller, L. E.; Ludke, H. R. ; Peacock, J. E. and Tomar, R. H. (1991). Manual of Laboratory Immunology. Second ed, Lea and Febiger: Philadelphia. USA. pp. 1-24.

15- Peterson, P. K.; Verhoef, J.; Schmeling, D. and Quie, P. G. (1977). Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphoneuclear leukocytes and monocytes. 136 (4) :502-509.

16- Playfair, J. H. L. and Chain, B. M. (2001). Immunology at a glance .6th ed. Blackwell Science Ltd, USA. pp. 22-30.

17- Prk, P.H.; Fikrig, S. M. and Smithwick, E. M. (1968). Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils, Lancet, 2: 532-534. Cited by Shareeff, A. A. (1982).

18- Ringsdorf, V. M.; Cheraskin, E. and Ramsaym R. R. (1976). Neutrophilic phagocytosis and resistance to disease. Dent Survey. 52(12): 46.

19- Roitt, I.; Brostoff, J. and Male, D. (1998".(Immunology" 5th ed., Mosby Intern .Ltd., London, PP.43-59.

20- Saeed, F. A. and Castle, G. E. (1998). Neutrophil chemiluminescence during phagocytosis inhibited by Abnormally Elevated levels of Acetoacetate: Implications for diabetic susceptibility to infection. Clin. & Diagnost. Laborat. Immunol. (5): 740-743.

21- Sanchez, A.; Reeser ,J. L. and Lau, H. S. (1973). Role of sugars in human neutrophilic phagocytosis. AMJ, Clin, Nutr. 26:1180-1184.

22- Segado, S. A. ; Cobos, L. G. G. ; Martin, G. M. J. ; Garcia, V. M. ; Gonzalez, G. J. and Sedano, F. A. (1999). Infectious Pathology in diabetic patients cared for in an emergency department. An. Med. Interna. 16(1): 3-7.

23- Stites, D. P. ; Stobo, J. D. ; Fundenberg, H. H. and Wells, J. V. (1982). Basic and clinical immunology (6th. ed.). Lange medical publication. Drawerl, Losahos; California. pp. 1-19.

24- Taylor, P. W. (1983). Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria, Microbiol. Rev., 47.83-46 :

25- Williams, P.; Lambert, P. A.; Brown, M. R. W. and Jones, R. J. (1983). The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella arogenes* to serum killing and phagocytosis. J. General Microbil., 129.2191-2181 ,

26- Zhang, J.; Gerhardinger, C. and Lorenz, M. (2002). Early complement activation and decreased levels of Glycosyl Phosphatidyl inositol-Anchored complement inhibitors in human and Experimental diabetic Retinopathy. Diabetes. 51(12). pp. 3499-3504.