التحري عن دور حاملات الحديد Siderophores في إمراضية وضرارة بعض الجراثيم المرضية

شاكر غازي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام	القبول
2011 / 08 / 21	2011 / 12 / 08

Abstract

The research included extraction of siderophores from three pathogenic bacterial isolates: *Escherichia coli ,Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract, burn, upper respiratory tract infections respectively which were identified according to cultural, physiological, and biochemical characteristics.

The extracted siderophores from the three isolates were detected by the chemical and bioassay methods, The results showed the ability of the three isolates to produce siderophores.

The In vivo virulence assay for the isolates were performed to determine the LD-50 on mice by injecting them Intraperitanially with serial different concentrations of each bacterial isolate.

The three isolates subjected to 12.5µm `of 5_o_ (N_salicyal)_ subfamily adenosine) (SAL_AMS) In order to inhibit their abilities to produce siderophores, the siderophores were extracted from the treated isolates then their detection were performed, the results showed inability of treated isolates to produce siderophores.`

The in vivo virulence assay performed for the treated and untreated isolates were compared, the results showed Increases in the lethal dose values of 50% in mice injected with the treated isolates.

The extracted siderophores from the isolates before treatment injected at 2mg/ml with different serial concentration of the treated isolates then the lethal dose values for 50% of mice calculated and compared with the LD50% for mice injected with the treated isolates and saline as a control, the results showed reduction in LD50% for mice

injected with treated isolates and extracted siderophores and this result means increase of the virulence and pathogenicity of treated isolates after injection of extracted siderophores in vivo.

الخلاصة:

تضمن البحث استخلاص حاملات الحديد Siderophores من ثلاث عزلات بكتيرية مرضية هي *Pseudomonas. aeruginosa*، *Staphylococcus. aureus, Escherichia. coli* معزولة من إصابات القناة البولية، الجهاز التنفسي العلوي، الحروق على التوالي، وتم تشخيصها اعتماداً على الخصائص المزرعية والفسلجية والبايوكيميائية. تم استخلاص حاملات الحديد من العزلات الثلاث بطريقة Rogers و اجري الكشف عنها بالاختبار الكيميائي والحيوي، واظهرت النتائج قابلية العزلات الثلاث على انتاج حاملات الحديد.

تم اجراء اختبار الفوعة داخل الجسم الحي للعزلات الثلاث لتحديد قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بمنطقة الخلب بتراكيز متسلسلة مختلفة من العزلات. تم معاملة العزلات الثلاث بمادة (SAL-AMS) 5-0 [N-Salicyl – Sulfamoyl] adenosine بتراكيز 12.5 µm لغرض تثبيط قدرتها على انتاج حاملات الحديد، و تم استخلاص حاملات الحديد من العزلات المعاملة و اجري الاختبار الكيميائي والحيوي للكشف عنها، واظهرت النتائج عدم قدرة العزلات المعاملة على انتاج حاملات الحديد بعدها اجري اختبار الفوعة للعزلات الثلاث المعاملة وقورنت مع فوعتها ما قبل المعاملة وأظهرت النتائج زيادة قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات الثلاث المعاملة بمادة SAL-AMS مقارنة مع قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات غير المعاملة.

حاملات الحديد المستخلصة من العزلات الثلاث غير المعاملة بمادة (SAL-AMS) حقنت بتركيز 2mg/ml مع العزلات المعاملة بتراكيز متسلسلة مختلفة وتم حساب قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران وقورنت مع قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات المعاملة مع محلول الملح الفسيولوجي كسيطرة وأظهرت النتائج حدوث انخفاض بقيم الجرع القاتلة لـ50% من للفئران المحقونة بتركيز 2mg/ml من حاملات الحديد مع العزلات المعاملة بمادة (SAL-AMS) مقارنة مع السيطرة وهذه النتيجة تؤكد ان حاملات الحديد التي أنتجتها العزلات الثلاث قيد الدراسة تعد احد عوامل الضراوة المهمة التي تساهم في زيادة فوعة العزلات.

المقدمة:

يعد الحديد عنصر ضروري لنمو كل الكائنات الحية وبضمنها الاحياء المجهرية إذ يدخل بالعديد من العمليات الأيضية المهمة مثل إنتاج الطاقة بواسطة بروتينات السايتوكروم، تصنيع الـDNA، كعامل مساعد في الانزيمات الايضية، إزالة سمية نواتج أكسدة الأوكسجين شديد التفاعل (1، 2).

بالرغم من ان جسم الإنسان يحوي كمية كبيرة من الحديد، لكن أغلبها غير قابلة للاستخدام من قبل الجراثيم لأنه يكون مرتبطاً مع بروتينات الجسم المختلفة ذات الالفة العالية للارتباط به مثل الترانسفرين، واللاكتوفرين وبالتالي تعمل هذه البروتينات على تحديد وتقليل كمية الحديد الحر اللازم لنمو وتكاثر وضراوة البكتريا (2، 3، 4).

تحتاج البكتريا (0μm - 4μm) من الحديد الحر لغرض النمو والتكاثر وانتاج عوامل الفوعة وبما ان تركيز الحديد الحر في الدم واللمف وسوائل الجسم خارج الخلوية والافرازات الخارجية يكون قليلاً جداً (10^{-8}) مول/لتر، لذا تستخدم البكتريا المرضية طرائق وميكانيكيات متعددة للحصول على الكمية المناسبة من الحديد من ضمنها تصنيع وافراز حاملات الحديد Siderophores التي هي مركبات عضوية واطئة الوزن الجزئي عالية الالفة للارتباط بالحديد إذ تتنافس مع بروتينات خلايا المضيف لجذب الحديد منها (1، 5، 6).

هناك إثباتات تجريبية عديدة أكدت أن أنظمة نقل الحديد المتوسطة بحاملات الحديد ساهمت بشكل كبير لتحفيز نمو الجراثيم داخل الجسم الحي وزيادة فوعتها وإمراضيتها، إضافة لذلك إن فقدان القدرة على انتاج حاملات الحديد ارتبطت بصورة وثيقة بفقدان الفوعة في العديد من الجراثيم مثل *Erwinia. entrysanth chrysanthmi* في النبات (7)، *Vibrio.anguillarum* (8)، *Mycobactrium.tuberculosis* (9)، *Yersinia. enterocolitica*(10)، *Salmonella.typhimurium* (11)، *Escherichia. coli* (12)، *Pseudomonas. aeruginosa* (13، 14)، أيضاً لوحظ ان انتاج حاملات الحديد يعد أساسي لضراوة جرثومة *Neisseria. Gonorrhoeae* (15)، وجرثومة *Haemophilus. influenzae* (16).

جرثومة *Pseudomonas. aeruginosa* تمتلك القدرة على تصنيع وافراز كميات كبيرة من حاملات الحديد بنوعيها Pyoverdin و Pyochelin تحت ظروف قلة الحديد (17، 18). إذ تعمل على جذب وإذابة ونقل الحديد خلال الغشاء البكتيري بواسطة بروتينات مستقبلة متخصصة متواجدة بالغشاء الخارجي (19).

جرثومة *Staphylococcus.aureus* تنتج ثلاث أنواع مختلفة من حاملات الحديد هي Staphyloferrrin A، Staphyloferrin B، aurocholin (20). تمكنها من الحصول على

الحديد من مصادره المختلفة مثل الهيم والترانسفرين واللاكتوفرين التي لها دور كبير في زيادة فوعة وامراضية الجرثومة خلال الاصابة داخل الجسم الحي (21).

اغلب سلالات جرثومة *Escherichia. coli* تنتج نوعين من حاملات الحديد هي enterobactin و aerobactin والتي تسبب اصابات مختلفة مثل اصابات القناة البولية، تجرثم الدم، والاصابات الخارج معوية الاخرى (22) نتيجة لامتلاكها القدرة على انتاج حاملات الحديد التي تزيد من قابلية الجرثومة على سحب الحديد من المضيف وزيادة فوعتها في احداث الاصابة(23).

المواد وطرائق العمل:

1- العزلات البكتيرية:

تم الحصول عليها مشخصة من كلية العلوم/ قسم علوم الحياة والمعزولة من حالات مرضية مختلفة؛ *S. aureus* من اصابات الجهاز التنفسي العلوي، *E. coli* من التهاب المجاري البولية، *P. aeruginosa*: من التهاب الحروق وتم التأكد من تشخيصها بإجراء الفحص المجهري والفحوصات الكيمياحيوية والفسلجية(24).

2- استخلاص حاملات الحديد من العزلات قيد الدراسة:

استخدمت طريقة Rogers (25) لاستخلاص حاملات الحديد من العزلات الثلاث قيد الدراسة، إذ تم تلقيح العزلات في (100) مل من وسط ترس سكسنيت الادنى Tris minimal Succinate medium والمضاف له المكونات الآتية: Casaamino acids، (0.5)µg/ml pantothenic acid، (0.01)µg/ml Biotein، Thiamen (50)µm، Cal_2 (100)µm، بدون إضافة الكلوكوز والحديد. حضن الوسط بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24ساعة، جمعت الخلايا الجرثومية بوساطة الطرد المركزي المبرد الفوقي بسرعة (11000g) بدرجة (4مْ). أخذ الطافي Supernatent من المزرعة الجرثومية وأضيف إليه (40 مل) من خلات الاثيل Ehtyl acetate لغرض تحميضه وتم تبخير الخلات باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary vacuum evaporator وتم الحصول على المستخلص الخام crude extract للتحري عن حاملات الحديد، إذيب المستخلص في (400) مايكروليتر ماء مقطر معقم لغرض استخدامه في الاختبارات الكيميائية والحيوية، علماً ان الماء المستخدم في هذه الاختبارات خالٍ من الأيونات (26).

3- الاختبار الكيميائي للكشف عن حاملات الحديد في العزلات الثلاث قيد الدراسة:

استخدمت طريقة اختباربيروكلورايت الحديديك Ferric perchlorate التي تتضمن مزج (0.5 سم^3) من الطافي من المزرعة الجرثومية مع (2.5 سم^3) من كاشف بيروكلورايت

الحديديك المحضر من (5 مولار) من $Fe(clo_4)_3$ في (0.1) مولار من $Hclo_4$. إن ظهور اللون البرتقالي إلى الارجواني يدل على وجود حاملات الحديد في المحلول أي يشير الى قدرة البكتريا على انتاج هذه العوامل التي تعمل على جذب الحديد من بروتينات المضيف (27).

4- الاختبار الحيوي للتحري عن حاملات الحديد في العزلات الثلاث:

تم تلقيح الوسط الادنى الخالي من ايونات الحديد Iron-deficient minimal medium الحاوي على (25) مايكرومول من مادة Ethyl diamine-di(o-hydroxy phenol acetic acid) (EDDHA) المخلبية التي تعمل على ازالة الحديد المتبقي من الوسط بتركيز (10^4) من العزلات البكتيرية الفتية قيد الدراسة، ثم وزعت اقراص مشبعة بالمستخلص الخام الحاوي على حاملات الحديد المحضرة بطريقة (Rogers, 1973) على سطح الوسط الزرعي وحضنت بدرجة (37)°م ولمدة (24) ساعة، بعد انتهاء فترة التحضين تم تقييم حدوث النمو الكثيف حول الاقراص التي تدل على النتيجة الموجبة لهذا الاختبار أي وجود حاملات الحديد في المستخلص الخام (27,26) كما اجري اختبار سيطرة لاثبات ان العامل المحفز لنمو الجراثيم حول الاقراص المشبعة بالمستخلص الخام هو حاملات الحديد وليس مكونات الوسط الادنى من الفيتامينات والاملاح. اذ تم الحصول على المستخلص الخام من الوسط الادنىMinimal medium لوحده بدون وجود الجراثيم، ثم حضرت اقراص مشبعة بالمستخلص الخام وثبتت على الوسط الزرعي الادنى الملقح ايضاً بتركيز (10^4) من الخلايا الجرثومية قيد الدراسة وحضن الوسط بدرجة (37)°م لمدة (24) ساعة، عدم ظهور نمو كثيف حول الاقراص يكون دليلاً على ان العامل المحفز لنمو الجراثيم هو حاملات الحديد وليس مكونات الوسط الادنى (26).

5- معاملة العزلات الثلاث بمادة (SAL-AMS):

استخدمت طريقة الباحثون (28) لغرض تثبيط قدرة العزلات على تصنيع حاملات الحديد إذ تم تعريض المزارع الفتية للعزلات لمادة SAL-AMS بتركيز μm12.5 لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37مْ ثم أجري الطرد المركزي للخلايا البكتيرية لازالة المادة المثبطة، ثم أجري استخلاص حاملات الحديد من العزلات الثلاث مباشرة وتم التحري عنها باستخدام الاختبار الكيميائي والحيوي.

6- اختبار الفوعة داخل الجسم الحي:

اجري اختبار الفوعة لتحديد قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات البرية الثلاث المنتجة لحاملات الحديد وتحديد قيم الجرع القاتلة للفئران المحقونة بالعزلات الثلاث المعاملة بمادة SAL-AMS وغير المنتجة لحاملات الحديد، استخدمت طريقة الباحث Charles(13)، إذ تم استخدام فئران بيضاء بالغة نوع BALB/C، نميت العزلات

البكتيرية الثلاث بوسط Nutrient Broth وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة ثم غسلت الخلايا وعلقت بتركيز 5×10^7 خلية/مللتر من Nacl. حقنت الفئران داخل منطقة الخلب بتراكيز مختلفة متسلسلة لمجاميع الفئران بواقع 6 فئران لكل مجموعة:- المجموعة الأولى حقنت بالعزلات الثلاث غير المعاملة بمادة SAL-AMS، الثانية حقنت بالعزلات الثلاث المعاملة بمادة SAL-AMS والغير منتجة لحاملات الحديد، الثالثة فئران سيطرة حقنت بـ50 مللتر من PBS، تم تحديد العدد الحي للبكتريا في كل تركيز حُقنت الفئران به بطريقة العد بالاكار، تم مراقبة الفئران يومياً على مدى (7-10) أيام وسجلت حالات النفوق في كل مجموعة وتم حساب الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة لكل معاملة حسب طريقة (29).

7- اختبار دور حاملات الحديد المستخلصة في ضراوة العزلات الثلاث داخل الجسم الحي:

لغرض اثبات وجود علاقة ما بين فقدان الفوعة وفقدان القدرة على انتاج حاملات الحديد في العزلات الثلاث تم حقن حاملات الحديد المستخلصة من العزلات الثلاث غير المعاملة بتركيز 2mg/ml مع العزلات المعاملة بمادة SAL-AMS بالتركيز الذي سبب قتل 50% من الفئران، تم حقن مجموعة اخرى بحاملات الحديد المستخلصة لوحدها بتركيز 2mg/ml، المجموعة الثالثة حقنت العزلات المعاملة بمادة SAL-AMS مع Saline كمجموعة سيطرة. تم مراقبة الفئران يومياً على مدى (7-10) ايام، وسجلت الوفيات في كل مجموعة وتم حساب الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المعاملة حسب طريقة (29).

النتائج والمناقشة:

اظهرت النتائج إمتلاك العزلات الثلاث لحاملات الحديد إذ ظهر لون برتقالي – إرجواني عند التحري الكيميائي عنها بطريقة بروكلورايت الحديديك نتيجة لتفاعل الحديد مع حاملات الحديد المتواجدة في راشح المزرعة الجرثومية للعزلات الثلاث كما أستخدمت طريقة الباحث (26) كأختبار حيوي تأكيدي لوجود حاملات الحديد وأوضحت النتائج قدرة العزلات الثلاث على انتاج حاملات الحديد إذ حصل نمو بكتيري كثيف حول الأقراص المشبعة بالمستخلص الخام الحاوي على حاملات الحديد مما يدل على وجود حاملات الحديد في المستخلص الخام وإن عدم حصول تحفيز للنمو البكتيري حول الاقراص المشبعة بمستخلص الوسط الزرعي الاولي بدون الجراثيم يؤكدان حصول التحفيز للنمو البكتيري حول الاقراص المشبعة بالمستخلص الخام للعزلات الثلاث يعزى إلى وجود حاملات الحديد وليس بسبب تحفيز مكونات الوسط الزرعي الغني بالفيتامينات والاحماض الامينية والمغذيات المشجعة للنمو.

إتفقت نتائج الدراسة مع دراسات عديدة اكدت قدرة سلالات *E.coli* على تصنيع وانتاج حاملات الحديد بنوعيها enterobactin و aerobactin كأحد عوامل الفوعة إذ تم الكشف عنها بالاختبار الكيميائي والحيوي التأكيدي (30، 31، 32). أثبتت دراسات عديدة قدرة جرثومة *P. aeruginosa* على انتاج الحديد Pyoverdin و Pyochelin كأحد عوامل الضراة لأحداث الاصابة داخل المضيف اذ تم التحري عنها باستخدام الاختبار الكيميائي والحيوي التأكيدي (33، 14). وإتفقت نتائج الدراسة مع دراسات عديدة أكدت قدرة جرثومة *S. aureus* على النمو والتكاثر تحت ظروف قلة الحديد داخل الجسم الحي وذلك من خلال تصنيع وافراز جاذبات الحديد (34، 21، 35). إن نتائج الدراسة المتعلقة بالتحري عن حاملات الحديد في العزلات المرضية الثلاث أكدت قدرتها على انتاج حاملات الحديد بالطريقتين الكيميائية والحيوية وهذا يؤكد على أهمية حاملات الحديد في جذب الحديد من البروتينات المتواجدة في الجسم ذو الالفة العالية للارتباط بالحديد مثل اللاكتوفرين والترانسفرين والهيموكلوبين لذا يمكن أن تعتبر انتاج حاملات الحديد من قبل العزلات قيد الدراسة عوامل فوعة تساعدها على مواجهة ظروف البيئة الخارجية ذات المحتوى الواطيء من الحديد مما يمكنها من البقاء بصورة نشطة بالاعتماد على الحديد المرتبط ببروتينات المضيف في إدامة فعاليتها الايضية والتكاثر وانتاج عوامل ضراوة اخرى وإحداث الاصابة داخل الجسم الحي.

الجدول رقم (1) يوضح قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات الثلاث كل على حده. دراسات عديدة أشارت إلى ان اختبار الفوعة داخل الجسم الحي يعد مؤشر أساسي على فوعة البكتريا داخل الجسم الحي لغرض دراسة عوامل ضراوة مختلفة من خلال حقن العزلات البرية والطافرة لانتاج عامل ضراوة معين ففي هذه الدراسة اجري اختبار الفوعة للعزلات البرية الثلاث المنتجة لحاملات الحديد لغرض مقارنة فوعتها بعد إجراء تثبيط لقدرتها على انتاج حاملات الحديد لغرض معرفة دور حاملات الحديد كعامل ضراوة داخل الجسم الحي.

الجدول (1): قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران للعزلات الثلاث المنتجة لحاملات الحديد

العزلة الجرثومية	مصدر العزل	الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران
E.coli	القناة البولية	4×10^5
P. aeruginosa	الحروق	2×10^4
S. aureus	الجهاز التنفسي العلوي	5×10^4

تم معاملة العزلات الثلاث المنتجة لحاملات الحديد بمادة (SAL-AMS) لغرض تثبيط قدرتها على انتاج حاملات الحديد (28)، إذ تعد هذه المادة من مشابهات acyl adenylate وهي مثبطات قوية لانزيمات aryl acid A domains إذ لوحظ تأثيرها المثبط على نمو العديد من الجراثيم المنتجة لحاملات الحديد التي تستخدم في تصنيع حاملات الحديد aryl acid A domains، وإن حاملات الحديد صنف aryl – capped تعد واسعة

الانتشار ما بين الجرالثيم المرضية، وأشارت الدراسة (28) أن مادة (SAL-AMS) أحدثت تثبيط بنسبة 99.6% لانتاج حاملات الحديد بتراكيز 12.5µm، لذا تم استخدام هذه المادة لمعاملة العزلات الثلاث لغرض مقارنة فوعتها بعد تثبيط قابليتها على انتاج حاملات الحديد لمعرفة دور حاملات الحديد كعامل فوعة داخل الجسم الحي. وأظهرت النتائج فقدان قابلية العزلات الثلاث المعاملة بمادة (SAL-AMS) على انتاج حاملات الحديد.

أجري اختبار الفوعة داخل الجسم الحي للفئران للعزلات المعاملة بمادة SAL-AMS وقورنت مع فوعتها ما قبل المعاملة والجدول رقم (2) يشير إلى قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران للعزلات الثلاث قبل معاملتها بالمادة SAL-AMS (المنتجة لحاملات الحديد) وبعد المعاملة بالمادة (غير منتجة لحاملات الحديد).

الجدول (2): قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران للعزلات الثلاث المعاملة (المنتجة لحاملات الحديد) و الغير المعاملة بمادة SAL-AMS (غير منتجة لحاملات الحديد).

العزلة الجرثومية	المصدر	الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات غير المعاملة بـSAL-AMS	الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات المعاملة بـSAL-AMS
E.coli	القناة البولية	4×10^5	2×10^7
P. aeruginosa	الحروق	2×10^4	1×10^8
S. aureus	الجهاز التنفسي العلوي	5×10^4	2×10^6

يتبين من الجدول (2) حدوث زيادة في قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة المعاملة بمادة (SAL-AMS) مقارنة مع قيم الجرع المحقونة بالعزلات غير المعاملة بها أي ان العزلات بعد المعاملة بمادة SAL-AMS أصبحت أقل ضراوة نتيجة لفقدان قدرتها على انتاج حاملات الحديد نتيجة لمعاملتها بالمادة SAL-AMS التي تعمل على تثبيط تصنيع حاملات الحديد من خلال تثبيط أنزيمات Aryl acid adenylation الضرورية لبناء حاملات الحديد. بالنسبة للجرثومة *E.coli* نلاحظ ان الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات غير المعاملة بمادة SAL-AMS كانت 4×10^5 ولكن بعد معاملتها بالمادة حدث زيادة بقيمة الجرعة إذ ازدادت إلى 2×10^7 أي ان الضراوة داخل الجسم الحي للفئران انخفضت نتيجة لعدم قدرة الجرثومة *E.coli* المعاملة بمادة SAL-AMS على انتاج حاملات الحديد وهذا يؤكد دور حاملات الحديد كعامل ضراوة لأحداث الاصابة إذ تتنافس مع بروتينات المضيف لسحب الحديد واستخدامه لفاعليتها الايضية والنمو وانتاج عوامل ضراوة أخرى داخل الجسم ةالحي ذو المحتوى الواطيء من الحديد.

إتفقت نتيجة الدراسة مع دراسة الباحث Rogers (25) الذي اشار إلى أن انتاج حاملات الحديد تعد ضرورية للنمو البكتيري السريع داخل وخارج الجسم الحي للفئران إذ تعد عوامل ضراوة حقيقة تساعدها بدرجة كبيرة على إحداث الاصابة من خلال سحب الحديد من بروتينات المضيف إذ لاحظ ان السلالات الطافرة لجرثومة *E.coli* غير المنتجة لحاملات الحديد كانت أقل ضراوة إذ كانت قيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بها أكبر من قيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالسلالة البرية المنتجة لحاملات الحديد، أيضاً لاحظت الدراسة (25) أن جرثومة *E.coli* الضارية كانت تنمو بسرعة كبيرة بالمصل نتيجة لقدرتها على انتاج حاملات الحديد التي تمكن الجرثومة على سحب الحديد من بروتين الترانسفرين ذو الالفة الشديدة للارتباط بالحديد.

دراسة الباحثان William and Warser (37) اثبتت أن ضراوة جرثومة *E.coli* الطافرة غير المنتجة لحاملات الحديد داخل الجسم الحي كانت أقل بكثير من ضراوة الجرثومة البرية المنتجة لحاملات الحيد، إذ لم تحدث أية حالة نفوق للفئران المحقونة بها على عكس السلالة المنتجة لحاملات الحديد التي أحدثت وفيات بالفئران خلال يومين بعد الحقن وهذا يشير إلى دور حاملات الحديد كعامل فوعة داخل الجسم الحي لأحداث الاصابة وذكر الباحثان ان سبب زيادة الضراوة للسلالة البرية غير الطافرة هي إمكانيتها العالية لتحمل التأثيرات القاتلة للمصل نتيجة لامتلاكها حاملات الحديد التي تقاوم ظروف قلة الحديد من خلال سحب الحديد من بروتين الترانسفرين مما يجعل الحديد سائغاً لنمو وفعالية الجرثومة.

أكدت دراسة الباحث (38) وجود علاقة مترابطة بين امتلاك العزلات لحاملات الحديد وبين ضراوتها التي تم قياسها باجراء اختبار الفوعة وحساب نسبة الوفيات بالفئران المحقونة بالعزلات الممتلكة لحاملات الحديد إذ حدثت حالات النفوق بعد إحداث الاصابة خلال 24 ساعة فقط وتراوحت نسبة الامراضية بين 0-79.6% وهذه النتيجة اقترحت بأن وجود حاملات الحديد نوع aerobactin بجرثومة *E.coli* تعد عامل ضراوة معنوي يساعدها على غزو مجرى الدم وإحداث الاصابة الجهازية.

أيضاً لوحظ ان السلالات التابعة لجرثومة *E.coli* المنتجة لحاملات الحديد نوع aerobactin كانت أكثر ضراوة من السلالات الفاقدة لحاملات الحديد في موديل إصابة الفئران بالجلد إذ حدثت آفات جلدية عميقة ووفيات بالفئران المحقونة بها مقارنة مع السلالات الفاقدة لحاملات الحديد حتى عندما تكون عوامل الضراوة الاخرى متشابهة او ثابتة بين السلالات المنتجة وغير المنتجة لحاملات الحديد (26).

بالنسبة لجرثومة *P. aureginosa* نلاحظ أيضاً زيادة قيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران من 2×10^4 إلى 1×10^6 أي ان العزلة المعاملة بمادة SAL-AMS قلت ضراوتها نتيجة

لفقدان قدرتها على انتاج حاملات الحديد فالعديد من البحوث أكدت ان إحداث طفرة في الجينات المسؤولة عن تصنيع حاملات الحديد او استخدام مواد تثبيط من تصنيعها ادت إلى تقليل ضرارة سلالات جرثومة *P. aureginosa*، فدراسة الباحث (13) أشارت الى أن قيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالسلالة الطافرة غير القادرة على انتاج حاملات الحديد ارتفقعت من 8.8×10^5 إلى 1×10^8 وهذا يؤكد بقوة أن فقدان القدرة على انتاج حاملات الحديد ادت إلى تقليل الضرارة وانخفاض معدلات النفوق في الفئران المحقونة بالسلالات الطافرة لأن انتاج حاملات الحديد من قبل الجرثومة تعد عامل ضرارة مهم وأساسي داخل الجسم الحي للمضيف إذ تعمل على سحب واكتساب الحديد من بروتينات المضيف واستخدامها لفعاليتها الحيوية وانتاج عوامل فوعة أخرى.

دراسة الباحث (39) أكدت أن طافرات جرثومة *P.aureginosa* الفاقدة للبروتين المرتبط Ferrisiderophores على سطح الخلية البكتيرية كانت أقل إمراضية من السلالة البرية المنتجة لحاملات الحديد في موديل إصابة عيون الفئران، وأشار الباحث أيضاً إلى ان الطافرات كانت أقل معدل إصابة للفئران بموديل الاصابة بالحرق مقارنة مع السلالة المنتجة لحاملات الحديد عندما حقنتا بتركيز 10^2، وعندما زرعت عينات الدم والانسجة (الكبد، الطحال، الكلى) على الاوساط الزرعية للفئران المحقونة بالعزلات الطافرة والمنتجة لحاملات الحديد لوحظ ان الطافرات لم تعزل من الدم والانسجة لعدم إمكانيتها مقاومة ظروف قلة الحديد في البيئة المحيطة بها لعدم امتلاكها حاملات الحديد أما السلالة البرية فقد عزلت من الدم والانسجة وبتركيز عالي وهذا يؤكد دور حاملات الحديد في ضرارة البكتيريا وإمراضيتها في موديل إصابة الفئران بالحرق.

أشار الباحث (40) إلى أن سلالة *P. aureginosa* الطافرة الفاقدة لقدرتها على انتاج حاملات الحديد بنوعيها Pyoverdin و Pyochelin لم تستطع النمو داخل الجسم الحي عندما حقنت بالعضلة ولم تحدث إصابة للفئران ولاحظ أنها نمت بصورة قليلة جداً بالرئة وأيضاً عزلت بأعداد قليلة جداً من دم الفئران المحقونة بها مقارنة بالسلالة البرية وهذا يشير إلى أهمية حاملات الحديد Pyoverdin و Pyochelin لجرثومة *P. aureginosa* لفوعتها داخل الجسم الحي للمضيف.

بالنسبة لدور حاملات الحديد في ضرارة الجرثومة *S.aureus* داخل الجسم الحي لوحظ أن معاملة العزلة *S.aureus* بمادة SAL-AMS أدت إلى فقدان ضرارتها إذ ارتفقعت قيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بها من 5×10^4 إلى 2×10^6 مقارنة بقيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلة غير المعاملة بمادة SAL-AMS والمنتجة لحاملات الحديد أي أن عدم القدرة على انتاج حاملات الحديد قللت من فوعة الجرثومة داخل الجسم الحي في الفئران.

جرثومة *S.aureus* تمتلك القدرة على استهلاك الحديد المرتبط بقوة ببروتين الترانسفرين عن طريق انتاج حاملات الحديد مما يمكن الجرثومة من النمو والقيام بالفعاليات الايضية تحت ظروف قلة الحديد، إذ تعد حاملات الحديد عامل فوعة مهم للجرثومة في احداث الاصابات المختلفة (21).

إن قلة الحديد الحر المتوفر لنمو البكتريا داخل انسجة المضيف تعد من ميكانيكيات الدفاع غير المتخصصة للمضيف تجاه الميكروبات، لذا فإن أغلب البكتريا المرضية ومن ضمنها جرثومة *S.aureus* يجب ان تجابه هذه الميكانيكية لغرض النمو وإحداث الاصابة وذلك من خلال تصنيع حاملات الحديد التي تعد أنظمة عالية الالفة لاكتساب الحديد والتي تعد عامل ضرارة تزيد من إمراضية الجرثومة وتمكن الجرثومة من إحداث الاصابة وانتشارها إلى جميع انسجة الجسم على الرغم من ان محتواها واطيء لعنصر الحديد (41).

دراسة الباحث (34) أثبتت أن إحداث الطفرة في الجين sbne المسؤول عن إنتاج حاملات الحديد في جرثومة *S.aureus* ادت إلى تقليل إمراضيتها للفئران بموديل إصابة الكلى إذ لم يلاحظ أية تأثيرات نسيجية أو خراجات في الكلى للفئران المحقونة بالسلالة الطافرة على عكس السلالة البرية غير الطافرة المنتجة لحاملات الحديد فإنها أحدثت تأثيرات نسيجية وخراجات بالكلى، أيضاً كان معدل البكتريا المعزولة من الكلى للفئران المحقونة بالسلالة غير الطافرة 10^7 في اليوم الخامس بعد الاصابة لكن لم يتم عزل البكتريا الطافرة من كلى الفئران المحقونة بها وهذا يؤكد أن جرثومة *S.aureus* الممتلكة لحاملات الحديد استطاعت من النمو والتضاعف داخل الدم وأحداث الاصابة على الرغم من ان البيئة محددة الحديد.

إن تثبيط الجينات المسؤولة عن إنتاج حاملات الحديد بنوعيها Staphyloferrrin A، Staphyloferrin B، ادى إلى انتاج طافرات ذات ضراوة منخفضة خلال موديل الاصابة الجهازية للفئران، إذ لم تعزل جرثومة *S.aureus* الطافرة بأعداد كبيرة من حالات زرع خلب الفئران على الاوساط الزرعية التي تعد مؤشر لقابلية الجرثومة على إحداث التهاب شغاف القلب وهذه النتيجة تؤكد ان إكتساب عنصر الحديد بالمصل يعد عامل مهم لامراضية الجرثومة (40).

واظهرت النتائج زيادة فوعة العزلات الثلاث المعاملة بمادة SAL-AMS نتيجة لحقنها مع حاملات الحديد بتركيز 2 mg/ml إذ حدث انخفاض بقيم الجرع القاتلة للعزلات الثلاث المعاملة بمادة SAL-AMS مقارنة مع قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات الثلاث المعاملة بمادة SAL-AMS مع Saline وهذا يثبت ان حاملات الحديد تعد عامل ضرارة مهم داخل الجسم الحي لأحداث الاصابة وزيادة امراضية البكتريا وفوعتها تحت ظروف البيئة الخارجية ذات المحتوى الواطيء جداً من الحديد.

الجدول (3): قيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات المعاملة بمادة SAL-AMS مع حاملات الحديد بتركيز 2 mg/ml، المحقونة بالعزلات المعاملة بمادة SAL-AMS مع Saline كسيطرة.

العزلة الجرثومية	الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات المعاملة بمادة SAL-AMS مع حاملات الحديد المستخلصة بتركيز 2mg/ml	الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالعزلات المعاملة بمادة SAL-AMS مع 0.1 مللتر من Saline
E.coli	4×10^5	2×10^7
P. aeruginosa	2×10^4	1×10^6
S. aureus	5×10^4	2×10^6

نلاحظ من الجدول ان قيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بكل عزلة معاملة بمادة SAL-AMS مع حاملات الحديد المستخلصة منها قبل المعاملة بتركيز 2 mg/ml انخفضت وعلى النحو الآتي 2×10^7 إلى 2×10^5، 1×10^6 إلى 2×10^4، 2×10^6 إلى 5×10^4 للعزلات الثلاث على التوالي، أي حدث استرداد بفوعة العزلات الثلاث المعاملة بمادة SAL-AMS نتيجة لحقنها مع حاملات الحديد داخل منطقة الخلب للفئران، ولوحظ عدم حدوث أية تأثيرات على الفئران المحقونة بحاملات الحديد لوحدها إذ لم تلاحظ أية حالة نفوق وهذا يثبت دور حاملات الحديد في زيادة فوعة العزلات داخل الجسم الحي على فرض ثبات عوامل الفوعة الاخرى التي قد تمتلكها العزلات.

دراسات عديدة اشارت إلى أن حقن حاملات الحديد مع الجراثيم داخل الجسم الحي للفئران يؤدي إلى زيادة ضرارتها من خلال حدوث انخفاض بقيم الجرع القاتلة لـ50% من الفئران وزيادة حالات النفوق خلال الايام الاولى للحقن، فدراسة الباحث (24) أكدت أن حقن حاملات الحديد نوع Catechole بتركيز 4Mg/kg لم تحدث أية تأثيرات ملحوظة بالفئران الطبيعية (غير المحقونة بالبكتريا)، لكن عندما حقنت مع السلالة الطافرة الفاقدة لقدرتها على انتاج حاملات الحديد لوحظ حدوث زيادة سريعة بالنمو اللوغارتمي لسلالة *E. coli* ونفقت الفئران المحقونة خلال 18 ساعة بعد الحقن مقارنة مع نتيجة حقن البكتريا نفسها الفاقدة لانتاج حاملات الحديد لوحدها بتركيز 10^7 إذ لم يلاحظ أية حالة نفوق للفئران، هذه النتيجة تؤكد ان البكتريا الضارية تستطيع النمو بالمصل وتمتلك ميكانيكية بايوكيميائية متخصصة لازالة الحديد من معقد الترانسفرين وهذه القابلية تعد عامل فوعة حقيقية لأن فقدان ميكانيكية الدفاع المناعية من قبل المضيف يؤدي إلى نمو وتكاثر المجتمع الميكروبي ووصوله لحد مناسب لاحداث الاصابة داخل الجسم الحي.

اجريت دراسة لتحديد وجود علاقة بين فقدان قدرة الجرثومة *P. aeruginosa* على انتاج الحديد نوع pyoverdin وبين فقدان فوعتها داخل الجسم الحي، وأظهرت النتيجة حدوث زيادة بنسبة الوفيات بالفئران المحقونة بالسلالة الطافرة مع حاملات الحديد مقارنة بقيمة الجرعة القاتلة لـ50% من الفئران المحقونة بالسلالة الطافرة لوحدها وهذا يؤكد دور حاملات الحديد المحقونة في زيادة ضرارة السلالة الطافرة واشارت الدراسة أيضاً إلى أن الحقن المتكرر لحاملات الحديد pyoverdin بمنطقة الحرق للفئران زادت من نسبة الامراضية من 30% إلى 80% وهذا يثبت دور حاملات الحديد pyoverdin في زيادة فوعة الجرثومة داخل الجسم الحي (14).

دراسات اجريت على جراثيم أخرى لتحديد دور حاملات الحديد كعامل فوعة داخل الجسم الحي لزيادة امراضية البكتريا، فدراسة الباحث (42) اثبتت وجود علاقة مترابطة ما بين انتاج حاملات الحديد وبين ضرارة جرثومية *Vibrio vulnificus* إذ كانت السلالة الطافرة الفاقدة لقدرتها على انتاج حاملات الحديد أقل ضرارة في موديل اصابة الفئران الرضع مقارنة بالسلالة البرية المنتجة لحاملات الحديد.

دراسة أخرى على جرثومة *Salmonella* أكدت أن حقن حاملات الحديد بتركيز 50Mg قبل يوم من حقن جرثومة *Salmonella* الطافرة الفاقدة لقدرتهاعلى انتاج حاملات الحديد أحدثت زيادة بمعدل الامراضية في الفئران، لكن عند حقن حاملات الحديد بتراكيز 10Mg أو 50Mg مع السلالة البرية المنتجة لحاملات الحديد سجلت أن الفئران قاومت الاصابة ولم يحدث فيها أية نسبة نفوق (43).

نستنتج من الدراسة الحالية أن حاملات الحديد التي تنتجها العزلات الثلاث قيد الدراسة تعد عامل ضرارة أساسي لزيادة فوعتها داخل الجسم الحي للفئران من خلال مقارنة قيم الجرع القاتلة للفئران المحقونة بالعزلات الثلاث المنتجة وغير المنتجة لحاملات الحديد، إذ لوحظ أن حقن حاملات الحديد المستخلصة من العزلات المنتجة أحدث زيادة بضرارة العزلات المعاملة بمادة SAL-AMS وغير المنتجة لحاملات الحديد عندما حقنت داخل منطقة الخلب للفئران.

References

1) Cornelis, P. and Anderws, S. C. (2010). Caster Academic pres. ISBN 978-1-904455-65-3.
2) Phillio, E.; Klebba, S.; Newton, W. C. (2011). Infec α Immun – 20(5): 340-355.
3) Weinberg, F. D. (1999). Acquistion of iron and other nutrient inviro, P. 79-93. In. Roth, J. A.; Botm, C. A.; Brogdon, K. A.; Mimon, E. C. and Wannemueher, M. E. (Bd). Virulence

mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology, Washington D. C.

4) Bullen, J. J. (1981). Rev. Infec. Dis. 3: 1127-1138.

5) Murray, P.R.; Baron, E. J.; Tenover, F. C. and Yolken, R. H. (1999). Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington D. C. PP. 80-82.

6) Braun, V.; Brazel – Fasst, C. and Schneider, R. (1998). FEMS Microbiol. Lett. 21 : 99-103.

7) Enard, C.; Diolez, A. and Expert, D. (1988). J. Bacteriol. 170: 2419-2426.

8) Crosa, J. H. (1980). Nature. 284: 566-568.

9) Snow G.A. (1970). J Bacteriol. Rev. 34:99_125.

10) Heesemann, J.; Hantka, K.; Vocke, T.; Saken, E.; Rakin, A.; Stajiljkovic, S. and Berner, R. (1993). Mol. Microbiol. 8: 397-408.

11) Yancey, R. J.; Breeding, s. A. L. and Lankford, C. E. (1979). Infec. Immun. 24: 174-180.

12) Williams, P.H. (1979). Infec. Immun. 26: 925-932.

13) Charles, D. C. (1982). Infec. Immun. 36: 17-23.

14) Jean-Marie, M.; Alice, N.; Alain, S.; Claude, G. and Ian, A. H. (1996). Infec. Immun. 64: 518-523.

15) Yancey, R. J. and Finkelstein, R. A. (1981). Infec. Immun. 32: 600-608.

16) Jarosik G.P., Sanders J.D., Cope L.D., Muller-Eberhard U. and Hansen E.J.(1994). Infec. Immun. 62:2470-2477..

17) Briskot, G.; Taraz, K. and Budzikiewicz, H. (1989). Liebig Ann. Chem.. 375-384.

18) Charles, D. C; Rinohart, M.; Moree, L. and Cook, J. C. (1981). Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A. 78: 302-308.

19) Heinrichs, D. E.; Young, L. and Poole, K. (1991). Infec. Immun. 59: 3680-3684.

20) Dryla, A.; Gelbmann, D. G.; Vongabain, A. and Nagy, E. (2003). Mol. Microbiol. 49: 37-53.

21) Ra-Young, P.; Hui-Yu, S.; Mittwa, C.; Young-Hoon, B. and Sung-Heui, S. (2005). Micribiol. 183-190.

22) Earhart, C. F. (1996). Up take and metabolism of Iron and molybdenum. P. 1075-1090. in Neidhardt, F. C. (ed), *Escherichia coli and Salmonella*. ASM. Press, Washington D.C.

23) Crosa, J. (1989). Microbiol. Rev. 53: 517-530.

24) Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Screckenberger, P. C. & Winn, W. C. (1997). Color Atlas & Text Book of Diagnostic Micribiology. 5th ed, Lippincott_Raven Publishers, Philadelphia, USA, pp. 171 – 220.

25) Rogers, H. J. (1973). Infec. Immun. 7: 445-456.

26) Sebulsky, M. T.; Hohnstein, D. H.; Hunter, M. D.; Heineriches, D.E. (2000). J. Bacteriol. 182(16); 4349-4400.
27) Atkin, C. L.; Neilands, J. B. and Phaff, H. J. (1970). J Bacteriol. 103, 722. In Clark, V, L. and Baviol, P. M. (1997). Bacteriol Pathogenesis. Harcourt Brace and Company, Academic Press, California.
28) Mithke, M.; Bisseret, P.; Becjering, C. L.; Vignard, D.; Eustache, j. and Marahil, M. A. (2005). FEBS. J. 273: 409-419.
29) Reed, L. J. and Muench, H. (1938). Am. J. Hyg. 27: 493-497.
30) Demir, M. and Kaleli, I. (2004). Clin. Microbiol α Infect. 10, 11. P. 1011-1014.
31) Montgomeria, J.Z.; Bindereif. A.; Neilands, J. B.; Kalmanson, G. M. and Guze, L. B. (1984). Infec. Immun. 46(3): 835-838.
32) Wiliams, P.H.; carbonetti, N. H. (1986). Infec. Immun. 51(3): 942-947.
33) Lamont, I. L.; Beare, P. A.; Oensner, U.; Vasil, A. I. and Vasil, M. L. (2002). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 7072-7077.
34) Lindsay, J. A. and Riley, T. V. (1994). Infec. Immun. 62(6): 2309-2314.
35) Dale, S. E.; Kirby, A. D.; Lahoie, G. and Heinrichs, D. E. (2004). Infec. Immun. 72(1): 29-37.
36) Friederik, F.; Lisa, J. S.; Kirsten, H. and Sören, S. (2007). Infec. Immun. 75(6) : 3188-3187.
37) Peter, H. W. and Philip, J. W. (1980). Infec. Immun. 29(2): 411-416.
38) John, Z. M.; Albrecht, B.; Joseph, B. N.; George, M. K. and Lucien, B. G. (1984). Infec. Immun. 46(3): 835-838.
39) Pamela, A. S. (1987). Infec. Immun. 55(9): 2021-2025.
40) Hiroyuki, T.; Hironobu, N.; Kazuki, H. and Tsuyoshi, O. (2000). Infec. Immun. 68(4): 1834-1839.
41) Beasley, F. C. (2001). Electronic Thesis and Dissertation Repository. 70(5): 135-139.
42) Christine M.L., Teresa W.R. and Jody S. (1996). Infec. Immun. 64(7):2834_2838.
43) Wright A.C., Simpson L.M. and Oliver J.D.(1980). Infec. Immun. 34:503_507.