التحري عن بروتين الصدمة الحرارية HSP70 بين النساء المجهضات والمصابات بطفيلي *Toxoplasma gondii*في محافظة ذي قار

فاضل عباس منشد العبادي
علي نعيم سلمان
نادية احمد هادي العبيدي
جامعة ذي قار/ كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة

الخلاصة

اجريت الدراسة الحالية في محافظة ذي قار لتقدير مستوى بروتين الصدمة الحرارية Heat shock protein 70 لدى النساء المصابات بطفيلي المقوسة الكونيدية *Toxoplasma gondii*
بعد ان جمعت 310 عينة دم من النساء المجهضات والمشكوك اصابتهن بداء المقوسات للفترة من بداية شهر تشرين الاول 2010الى نهاية شهر نيسان 2011 .
بلغ عدد العينات المصابة 104حالة من مجموع 310حالة مفحوصة باستخدام اختبار الادمصاص المناعي للانزيم المرتبط (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA .
أظهرت الدراسة الحالية ارتفاع تركيز بروتين الصدمة الحرارية HSP70 في دم النساء المصابات بداء المقوسات بالمقارنة مع مجموعة السيطرةباستخدام اختبار ELISAحيث اجري الفحص على 38 عينة مصل للنساء المصابات وكان معدل تركيز البروتين HSP70 لديهن 6.26 نانوغرام / مل بالمقارنة مع مجموعة السيطرة المكونة من 10نساء إذ بلغ تركيز البروتين HSP70 لديهن 2.76 نانوغرام / مل

Detection of Heat Shock Protein 70 in aborted women infected with *Toxoplasma gondii* in Thi-Qar governorate.

Fadil Abbas Manshad Al-Abady
Ali Naeem Salman
Nadia Ahmed Hadi AL-Ubaydi
Thi-Qar University/ College of education/Biology department

Abstract

Atotal of 310 blood samples were collected from infected and suspected women with *Toxoplasma gondii* when admitted to hospitals Thi Qar and private laboratories. From the period December 2010 to April 2011. Eliza test has been shown 104 infected women from 310. The result of HSP70 has shown high level concentration (6.26 ng/ml) in infected and aborted woman compared with controle groupe (2.76 ng/ml

Keywords: aborted women, Heat Shock Protein 70, Toxoplasma *gondii*

المقدمة

داء المقوسات Toxoplasmosis يحدث نتيجة الإصابة بالطفيلي الداخل خلوي Intracellular parasite الذي يعرف *Toxoplasma gondii* والذي يعود الى تحت صنف coccidian وهو واسع الانتشار في العالم (Ryan and Ray , 2004 ; Dubey , 2003) وله القدرة على إصابة الإنسان والحيوان (Kim and Weiss , 2004).

تعد القطط المنزلية والبرية وجميع انواع العائلة Felidae هي المضائف النهائية لهذا الطفيلي بينما يعد الانسان وجميع الانواع العائدة لرتبة المقدمات primates هي المضائف الوسطية له (Micheal and John , 2000 ; Robert and Janovy , 1996).

تلعب بروتينات الصدمة الحرارية Heat shock proteins (HSPs) دورا مهما في الاستجابة المناعية ضد مسببات الامراض ومنها طفيلي المقوسة الكونيدية ، وبروتينات الصدمة الحرارية عبارة عن مرافقات جزيئية Molecular chaperon تعمل على حفظ وظائف البروتينات (Asea *et al* . , 2000 ; Mayer and Bukau 2005) من خلال

مساعدة سلاسل الأحماض الامينية Amino acids chain على أن تطوى بهيئتها البروتينية الصحيحة والتخلص من البروتينات التالفة ومصاحبة البروتينات وحمايتها وهي في طريقها للقاء مرافقاتها كما وتقوم بروتينات HSPs بواحدة من أهم عمليات الجهاز المناعي وهي عملية عرض المستضد presentation antigen لإظهار مستضدات المسبب المرضي لخلايا الجهاز المناعي من اجل القضاء عليه او إضعافه (pramod , 2008 ; Binder and Srivastava , 2005) .

تفرز بروتينات (HSPs) عند تعرض الجسم الى ظروف الاجهاد stress مثل ارتفاع درجة الحرارة والضغط العالي والتعرض لمركبات سمية كيميائية والإصابة بالمسببات المرضية(Compader *et al* . , 1998 ; Hartel,1996) تصنف بروتينات HSPs إلى أصناف متعددة اعتمادا على الوزن الجزيئي للبروتين واهم أنواع عائلة هذه البروتينات هي(HSP40, HSP90,HSP70,HSP60) (Hartl , 1996 ; Hightower , 1991) .

تهدف الدراسة الحالية الى تقدير كمية بروتين الصدمة الحرارية (HSP 70) في دم النساء المصابات بداء المقوسات.

*** المواد وطرائق العمل Materials and Methods :**

جمعت 310 عينة دم من النساء المجهضات والمشكوك اصابتهن بداء المقوسات المراجعات لمستشفى الحسين التعليمي ومستشفى الشطرة ومستشفى الرفاعي جنوب العراق للفترة من بداية شهر تشرين الاول 2010الى نهاية شهر نيسان 2011.

استعمل في الدراسة الحالية اختبار الاليزا للكشف عن بروتين الصدمة الحرارية HSP 70 واستخدمت عدة اختبار (HSP70 Bioassay ELISA Kit , U . S . A) وطريقة العمل هي Sandwich ويتضمن اساس العمل اضافة العينات Samples والمعاير Standards الى حفر الصفيحة الحاوية على اجسام مضادة وحيدة النسيلة لبروتين HSP 70 (Monoclonal antibody specific for HSP 70) .

يحدث ارتباط بين هذه الاجسام المضادة وبروتين HSP 70 وبعد الحضن والغسل واضافة المحلول اصفر اللون الحاوي على الاجسام المضادة متعددة النسيلة لبروتين HSP 70 (Anti polyclonal antibody specific for HSP 70) والذي يرتبط مع بروتين HSP 70 الملتصق على جدران حفر الصفيحة وبعد الحضن والغسل واضافة المحلول ازرق اللون الحاوي على (HRP conjugate) لكل حفرة في الصفيحة يرتبط مع الاجسام المضادة وبعد الحضن والغسل تضاف المادة الاساس (TMB substrate) الى كل حفرة .

ان (HRP) يحفز تفاعل يؤدي الى تكون مركبات متألقة وفي الخطوة الاخيرة يضاف محلول التوقف Stop solution لايقاف كل التفاعلات تمهيدا للقراءة التي تتم على طول موجي (450) نانوميتر علما ان لون حفر الصفيحة يصبح اصفر بعد اضافة محلول التوقف وتعتمد القراءة على شدة اللون الناتج الذي يعتمد على مستوى HSP 70 الموجود في العينة .

محتويات عدة الاختبار Kit components

- صفيحة مكونة من (96) حفرة مسطحة القعر ومغطاة بالاجسام المضادة وحيدة النسيلة (HSP 70 monoclonal antibody) .
- معاير قياسي Standards عبوة واحدة بحجم (10 µg / ml) .
- محلول داريء Buffer عبوة واحدة بحجم 50 ml تتكون من داريء الفوسفات الملحي phosphate buffer salin الحاوي على (BSA) ومنظف detergent .
- محلول الغسل wash buffer 20 x عبوة واحدة بحجم (100 ml) تتكون من داريء ملحي Buffer salin حاوي على مواد منظفة detergents .
- (HSP 70 pab) عبوة واحدة بحجم (10 ml) ذات سائل اصفر وهو عبارة عن اجسام مضادة متعددة النسيلة (Rabbit polyclonal antibody specific for HSP 70) .
- (HRP pab) وهي عبوة واحدة بحجم (10 ml) ذات سائل ازرق يتكون من اضداد IgG للارنب مقترنة مع انزيم peroxidase الماخوذ من نبات فجل الحصان (anti – rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase) .
- المادة الاساس TMB substrate عبوة واحدة بحجم (10 ml) مكونة من (TMB) 3 , 3 , 5 , 5 tetramethyl benzidine وبيروكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide .
- محلول التوقف Stop solution عبوة واحدة بحجم 10ml مكونة من حامض الهيدروكلوريك المائي (1N).

طريقة العمل Procedure

1- اخرجت عدة العمل من الثلاجة وتركت في درجة حرارة الغرفة قبل (30) دقيقة من المباشرة بالعمل به .
2- اضيف (100) مايكروليتر من محلول Buffer الى الحفرة الاولى في الصفيحة وهي تمثل (0 ng / ml standard) SO.
3- اضيف (100) مايكروليتر من المعاير Standards الى الحفر من رقم (1-7) والتي تمثل (S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 , S_7) وهي المعايرة القياسية لباقي القراءات في الصفيحة
4- اضيف (100) مايكروليتر من عينات المصل الى حفر الصفيحة .
5- وضعت الصفيحة في الحاضنة بدرجة حرارة (37م°) مع التحريك باستخدام Microplate shaker لمدة ساعتين .
6- فرغت الصفيحة من السوائل وغسلت اربع مرات باضافة (400) مايكروليتر من محلول الغسل لكل حفرة في كل مرة ثم قلبت الصفيحة على ورق لسحب اي محلول باقي منها .
7- اضيف (100) مايكروليتر من محلول الاجسام المضادة الاصفر اللون الى كل حفرة ماعدا (Blank) .
8- حضنت الصفيحة لمدة ساعة مع الرج بدرجة حرارة (37 م°) .
9- غسلت كما في الخطوة رقم 3 .
10- اضيف (100) مايكروليتر من المحلول الازرق (HRP conjugate) الى كل حفرة ماعدا (Blank) .
11- حضنت الصفيحة بدرجة حرارة (37م°) مع التحريك لمدة ساعة .
12- غسلت كما في الخطوة رقم 3 .
13 - اضيف (100) مايكروليتر من محلول المادة الاساس (Substrate) الى كل حفرة في الصفيحة .
14 - حضنت الصفيحة مع التحريك لمدة (30) دقيقة .
15- اضيف (100) مايكروليتر من محلول التوقف Stop solution الى كل حفرة .
16- قرئت النتائج في جهاز Elisa reader وعلى طول موجي (450) نانوميتر بعد برمجة الجهاز وتصفير حفرة Blank

حساب النتائج Calculation of results

يقوم جهاز الاليزا باعطاء قراءات الكثافة الضوئية(Optical Density (OD والتي تمثل تركيز (HSP70) واعطاء منحنى قياسي او يتم حساب النتائج حسب المعادلة التالية :

Avarage Net OD = Average OD _ Average Blank OD

*** النتائج Results :**

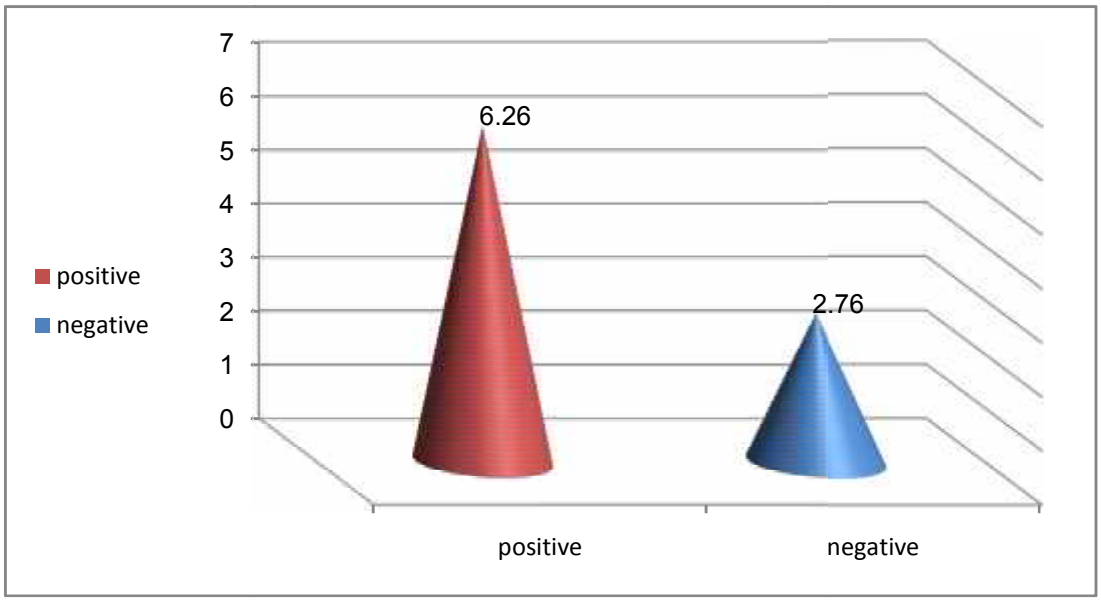
اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$) بين معدل تركيز بروتين الصدمة الحرارية HSP70 في مصل النساء المصابات بداء المقوسات مقارنة مع معدل تركيزه في مصل النساء غير المصابات بداء المقوسات .

اجري الفحص لـ 38عينة مصل من النساء المصابات مع مراعاة ان يكون الفحص بشكل مزدوج Dublicate لكل عينة فوجد ان معدل تركيز بروتين HSP70 لديهن (6.26) نانوغرام / مل مقارنة بـ (2.76) نانوغرام / مل لعينة السيطرة المكونة من 10 نساء اجري الفحص لهن بصورة مزدوجة Dublicate . كما هو موضح في جدول رقم (1) وشكل رقم (1)

جدول(1): يبين معدل تركيز بروتين الصدمة الحرارية HSP70 في مصل النساء المصابات بداء المقوسات بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

المجموعة	Number	Mean	St. Deviation	t	df	p	α
مجموعة السيطرة	10	2.76	1.11	2.86	46	0.006	0.05
مجموعة المصابات	38	6.26	3.80				

قيمة (t) الجدولية (df = 46 ، ∝= 0.05) = 1.67



شكل(1): يبين معدل تركيز بروتين الصدمة الحرارية Hsp70 في مصل النساء المصابات بداء المقوسات مقارنة مع معدل تركيزه في مصل النساء غير المصابات .

1 – (M = 6.26 , SD ± 3.80) , t = 2.86 , p = 0.006 , ∝ = 0.05

2 – (M = 2.76 , SD ± 1.11) , t = 2.86 , p = 0.006 , ∝ = 0.05

المناقشة :

على الرغم من ان بروتينات الصدمة الحرارية (HSPs) فعالة في الخلايا في الاحوال العادية فانه من السهل ملاحظة كم تكون مساعدتها اكثر نفعا للخلية في الاوضاع الصعبة ففي الظروف الطارئة مثل الحرارة والبرد الشديدين ونقص الاوكسجين والجفاف والتعرض لاجتياح العوامل الممرضة كالطفيليات والبكتريا والفيروسات والسرطانات فان دور هذه البروتينات يظهر جليا في تحفيز الاستجابة المناعية للجسم لمقاومتها (Pramod , 2008).

ان بروتين HSP70 يعمل على مقاومة طفيلي المقوسة الكونيدية بالاشتراك مع خلايا البلعمية Macrophagesوالخلايا التائية Tcells بمختلف انواعها لتكون المحصلة النهائية للاستجابة المناعية أما القضاء على الطفيلي او تحويله الى الحالة المضعفة (تثبيطه).

اظهرت الدراسة الحالية ان معدل تركيز بروتين الصدمة الحرارية HSP70 في دم النساء المصابات بداء المقوسات هو اعلى من معدل تركيزه في دم النساء غير المصابات وهذا يؤكد دور (HSP70) في الاستجابة المناعية ضد المقوسة الكونيدية فهو يعمل على مقاومة الطفيلي وتثبيطه من خلال الارتباط مع مستضدات الطفيلي وتقديمها للخلايا العارضة للمستضد وبمساعدة مستضدات التوافق النسيجي MHC يتم عرضها للخلايا T cell والتي تقوم بدورها في مقاومة الطفيلي (Jacquier *et al* , 1994 ;Denagel and Piece , 1992) .

ومن ملاحظة نتائج التشخيص نجد ان غالبية الاصابات مزمنة Chronic اي تحمل النساء المستضد المناعي IgG وهذا يؤكد على ان الطفيلي في مرحلة الطور البطيء Bradyzoite الذي ينزوي داخل خلايا المضيف للتخلص من فعالية الجهاز المناعي حيث من المعروف ان هذا الطور يتصاحب مع الاصابات المزمنة (Dubey , 2002) ولكن عندما تنخفض مناعة الجسم بسبب تناول عقارات مثبطة للمناعة او الاصابة بمرض الايدز فان هذه الاكياس تنفجر وتتحول الى الطور النشط السريع Tachyzoite مسببا اعراض حادة مرة اخرى مسببا الانتكاسة المرضية (عطيفي ، 1996 , Jonson ;1999) وهذا يدل على اهمية (HSP70) في بقاء الطفيلي مضعف طالما ان الجهاز المناعي للجسم سليم وفعال .

لم يعرف دور (HSPs) في الاستجابة المناعية الا في السنوات الاخيرة رغم انه اكتشف منذ عام 1962 وتتجه البحوث الحديثة التي يقوم بها علماء امريكا واوربا وروسيا واستراليا نحو استخراج لقاحات وادوية مشتقة من هذه البروتينات للتمنيع ضد الاصابة بالسرطانات والاورام الخبيثة والامراض الطفيلية والفيروسية بعد نجاح بحوث عديدة على المصابين بالسرطان والذين تلقوا جرعات من لقاح مشتق من HSPs والذي هو عبارة عن ببتيدات مشتقة من خلايا مريضة مرتبطة مع بروتينات HSPs فعندما اعطيت لمرضى السرطان عاشوا فترة اطول من المرضى الذين تلقوا علاجات تقليدية بما فيها العلاج الكيميائي لمدة تجاوزت السنة والنصف كما اجريت تجارب ناجحة على الفئران حيث جرى تمنيعها ضد سرطاناتها واصبحت بروتينات الصدمة الحرارية تشكل ثورة عارمة في مجال الاكتشافات الدوائية والصيدلانية (Pramod , 2008) .

وتعد الدراسة الحالية هي الاولى في العراق التي تهدف الى تقدير بروتين الصدمة الحرارية HSP70 في اجسام المرضى المصابين بداء المقوسات وتسليط الضوء على دوره في الاستجابة المناعية كما ان البحوث التي اجريت على الطفيليات بهذا الخصوص قليلة جدا ولكون طفيلي المقوسة الكونيدية هو من الطفيليات الداخل خلوية والذي له قدرة على الهروب من مناعة المضيف فان مثل هكذا دراسة ذات فائدة كبيرة في فتح باب امام البحوث المستقبلية في ايجاد لقاحات او ادوية للتمنيع ضد الاصابة بداء المقوسات لكون بروتين HSPS قادر على الاحتفاظ ببصمة مستضدية عن الطفيلي وابقاءها فترة متاحة لخلايا الجهاز المناعي للجسم .

وهناك الكثير من الدراسات التي تثبت ان لبروتين HSP70 دورا اساسيا في الاستجابة المناعية ضد المسببات المرضية والسرطانات منها الدراسة التي اجراها (Bendz *et al* . , 2007) والتي وجدوا من خلالها ان لبروتين HSP70 قدرة على عرض المستضدات الخاصة بالخلايا المريضة المصابة بالاورام السرطانية على مستضدات التوافق النسيجي MHCI اضافة لدوره كحارس للخلايا من خلال عمله كمرافق جزيئي Molecular chaperon وهذا يتفق مع الدراسة الحالية في اثبات عملية عرض المستضد .

وفي دراسة اخرى اجراها (Figueiredo *et al* . , 2009) اثبت من خلالها ان لبروتين HSP70 قدرة على تحفيز الاستجابة المناعية للخلايا اللمفاوية المساعدة إذ يحفز كل من (CD8 + Cytotoxity T helper cell) وخلايا (CD4 + T helper cell) .

وفي دراسة اخرى قام بها (Chen *et al* . , 2009) التي وجد من خلالها ان بروتين الصدمة الحرارية HSP70 المتحرر من الخلايا السرطانية المجهدة حراريا يؤدي الى انشاء استجابة مناعية مضادة للورم السرطاني عن طريق تحفيز انتاج الكيموكينات للخلايا السرطانية وتنشيط الخلايا الشجيرية Dendritic cells عبر مسار (TLR4) .

المصادر:

*عطيفي ، يحيى زكريا (1996) . الطفيليات البيطرية ، جامعة عمر المختار ، بنغازي ، صفحة 838.

* **Asea, A. ; Kraft, S.k. and kurt – Jones, E.A. (2000)** . Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14- dependant pathway , demonstrating its dual role as achaperone and cytokine .NatMed. 6:435-442.

* **Bendz, H. ; Ruhland, S.C. ; Panday, M.J. ; Hainzl, O. ; Riegelsberger, S. ; Baruchle, C. ; Mayer, M.P. ; Bucher, J. ; lssels, R.D. , and Noessner, E. (2007)**. Human Heat Shock Protein 70 (Hsp 70) Enhanced Tumor Antigen precentation through complex Formation and inter caller Antigen Dilivery without Innate Immune Signal, J. Biol chem. 282,31688-31702.

* **Binder, R.J. and Srivastava, P.K. (2005).** Nat. Immun. 6,593-599 .

* **Chen , T. ; Guo ,J. ;Han ,C. ;Yang , M. and Gao , X. (2009).** Heat shock protein 70, Released from Heat-stressed Tumor cells ,initiates Antitumor immunity by inducing Tumor cell chemokine production and activating Dendritic cell via Tlr4 pathway . J. Immunol . 182, 1449-1459.

* **Compadre , R.; Lilia ph.D. ; Henle , Kurt ph.D. ; Byrd , chrystine UAMS ; Murthy , Krishna ph.D. ; Joachimiak , Andrzej ph. D. (1998)**. structure-Function of Heat shock proteins. http://www.Uark.edu\staff\arkent\internet2\grant-Uams-app113 .html.

* **DeNagel ,D.C., and Pierce , S.K.(1992) .** Acase of chaperones inantigrn processing Immunol. Today 13:86-89.

* **Dubey, J.p. (2002)**. Toxoplasma gondii . Httm .Gsbs .Atmbedil micro book ch.84.Htm.

Dubey, J.p. (2003). Toxoplasma gondii . Vet . Parasitol , 86:235-248.

* **Figueiredo , C. ; Wittman , M. ; Wang , D . ; Dressel , R . ; Seltsam , A ; Blasczyk , K . and Eizvesper , B. (2009)** . Heat shock protein 70 (Hsp70) induced cytotoxicity of T-helper cells . Blood . , 113 : 3008 – 3018 .

* **Hartl , F. (1996)**. Molecular chaperones in cellular protein folding .Nature . 381 (6583) : 571 – 9 .

* **Hightower , L.E. (1991)**. Heat shock , stress proteins , chaperones ,and proteotoxicity. Cell. 66(2):191-7.

* **Jacquier – Sarlin , M.R.K. ; Fuller , A.T. ; Dinh-xuan , M.J. ;Richard and polla , B.S. (1994)** . Protective effect of Hsp70 in inflammation . Experientia 50: 1031-103.

* **Joynson, D.H.M.(1999)**. Emerging parasite infection in man . infection.Dis.Rev.; 2 :131-134 .

* **Kim, K. and Weiss, L.M. (2004)**. Toxoplasma gondii the model Apicomplexan . Inter .J . Parasitol. 34:423-432 .

* **Mayer , M.P. and Bukau ,B. (2005)** . Cell . Mol. Life. Sci.62:670-684 .

* **Michael , W.B. and Jone , C.B. (2000)** . Lytic cycle of Toxoplasm gondii . Micro .Mol. Biol. Rev. 116(3):607-623.

* **Pramod, K.S. (2008)**. New jobs for Ancient chaperones . Oncology. Vol. 26 (6) ; 955 – 962 .

* **Roberts, L.S. and Janovy, J. (1996).** Gerald D,Schmidt andLarrys, Jr , Roberst,61 : 315 – 327.

* **Ryan , K.J.and Ray ,C.G.(2004).** Sherris Medical Microbiology (4th ed) .Mc.Graw.Hill.PP.723-7. ISBN 0838585299.