عدد خاص بأعمال المؤتمر العلمي الثاني

استخلاص ستافلوكوكسين العنقوديات الذهبية ودراسة تأثيره على الخلايا المناعية

الدكتور أسامة ناظم نجرس
جامعة تكريت - كلية التربية / سامراء - قسم علوم الحياة

المستخلص:

شملت الدراسة (١٥٠) عزلة من المكورات العنقودية الذهبية تضمنت مكونات دمامل قيحية وحالات الخمج الجلدية ونماذج بول ونماذج دم إضافة إلى مسحات أنفية من حاملي هذه البكتريا .

تم اختبار فعالية العزلات في إنتاج الستافلوكوكسين وقد تم استخلاصه ودراسة تأثيره على بعض الخلايا المناعية في الزجاج. كما ونميت العزلات في أوساط زرعيه سائلة واختبرت قابليتها على إنتاج الستافلوكوكسين من خلال فعاليتها التثبيطية ضد العزلات البكتيرية المستخدمة ثم تم استخلاصه وتقدير فعاليته. كما ودرس تأثير الستافلوكوكسين على الخلايا المناعية من خلال تأثيره في كل من عيوشية الخلايا البلعمية متعدد أشكال النوى والليمفاوية وعلى هجرة الخلايا البلعمية وتفاعل ارثس وفرط الحساسية الآجل وفي التشكل الزهري التائي والبائي وعلى خلايا البلازما المعزولة من الإنسان واخيرا تأثيره على معامل انقسام خلايا نخاع العظم في الفئران.

ويمكن تلخيص أهم النتائج التي أمكن الحصول عليها في هذه الدراسة بآلاتي:

١- أمكن الحصول على (٢١) عزلة منتجة للستافلوكوكسين , انتخبت اثنان منها (SN129 , SN134) مصدرهما مسحات الأنف حيث أظهرتا افضل فعالية تثبيط بقطر بلغ (١٦, ١٥,٥) ملم على التوالي.

٢- بلغت فعالية الستافلوكوكسين كل من راسب وراشح العزلتين (٣٢٠ وحدة/مل للراسب و ٨٠ وحدة/مل للراشح) للعزلة SN129 و(٦٤٠ وحدة/مل للراسب و ٨٠ وحدة/مل للراشح) للعزلة SN134 , فيما كان تركيز البروتين (في الراسب) للعزلتين(٢٠٠) مكغم/مل و(٣٠٠) مكغم /مل على التوالي,لذا فقد استخدم بكتريوسين العزلة SN134 التي تلت الاخير.

٣- أظهرت نتائج معاملة الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى واللمفاوية التأثير السمي للتراكيز (١٥٠و ٣٠٠ و ٤٠٠) مكغم/مل من الستافلوكوكسين الخام .

٤- كان للستافلوكوكسين الخام تأثير مثبط على هجرة الخلايا البلعمية مقارنة مع معامل السيطرة (الخلايا غير المعاملة).

٥- أظهرت نتائج تأثير الستافلوكوكسين الخام على تفاعل ارثس وفرط الحساسية الآجل بالتراكيز المستخدمة أعلاه انخفاض معدل تفاعلهما مقارنة مع معامل السيطرة.

٦- أدى استخدام الستافلوكوكسين الخام إلى انخفاض النسبة المئوية للتشكل الزهري التائي والبائي مقارنة مع معامل السيطرة بالتراكيز المستخدمة (١٥٠ و٣٠٠ و ٤٠٠) مكغم/مل.

٧- أظهرت نتائج تأثير الستافلوكوكسين الخام على خلايا البلازما وجود فروق معنوية في معدل عدد خلايا البلازما المعاملة بالتراكيز الثلاثة اعلاه مقارنة مع معامل السيطرة.

٨- أظهرت النتائج التأثير المثبط للتراكيز العالية (٣٠٠ و ٤٠٠) مكغم/مل من الستافلوكوكسين الخام على معامل انقسام خلايا نخاع عظم الفئران, فيما كان لاستخدام التركيز الواطئ (١٥٠) مكغم/مل تأثير محفز عندما أدى إلى زيادة في معامل الانقسام لخلايا نخاع العظم مقارنة مع معامل السيطرة .

المقدمة:

تمتلك العديد من السلالات البكترية القدرة على تصنيع البكتريوسينات التي تؤثر تأثيراً كبيراً في تثبيط نمو عدد من السلالات البكترية القريبة لنوعها أو تلك المزاحمة لها في بيئتها .

يشير مصطلح البكتريوسين إلى بروتينات تصنع بكميات قليلة (Garcia , 1992) لأن إنتاجها يعد مهلكاً للخلايا نفسها وذات فعالية شديدة الخصوصية ترتبط بمستقبلات خاصة بها ، وتمتلك القدرة القاتلة لأنواع مماثلة للبكتريا المنتجة وبطيف ضيق من الفعالية (Cramer et al, 1990) .

وتطرق إلى تعريف البكتروسين العديد من الباحثين فقد عرف البكتريوسين Rogolsky and Wiley, (1977) بأنه (مواد تتراوح بين بروتينات بسيطة إلى بروتينات مقترنة مع دهون اوكاربوهيدرات أو مواد تشابه جزيئات العاثي البكتيري وهي قاتلة لسلالات من النوع نفسه أو أنواع مقاربة ويعزى فعلها القاتل لارتباطها بمستلمات الخلية الحساسة له) .

اثبتت الدراسات الكيميائية بأن بعض البكتريوسينات مثل بكتريوسين المكورات العنقودية تبدو كجزيئات معقدة من دهون وكربوهيدرات إضافة إلى بروتينات (Hale and Hindsill,1973) هناك بعض العوامل التي تؤثر على درجة ثبات جزيئة البكتريوسين مثل درجات الحرارة ، تركيز الاس الهيدروجيني، بعض المواد مثل الكلوروفورم ، والأشعة فوق البنفسجية . وجد (Tagg et.al.,1975) بان الراشح الخام للبكتريوسين هو أكثر ثبوتية من الراشح النقي ، كذلك وجد ان البكتريوسين يفقد(50%) من فعاليته خلال (15-30) دقيقة بحرارة (100 مْ) .

تتحدد مدى فعالية بكتريوسين معين (حتى بشكل جزئي) بوجود المستلمات الخاصة في الخلية الحساسة (Tagg et.al, 1976) . وتكون معظم البكتريوسينات التي تنتجها البكتريا السالبة لكرام فعالة ضد الأنواع القريبة جدا فقط ، فيما لا تقتصر فعالية بكتريوسينات البكتريا الموجبة لكرام على الانواع القريبة ولا على البكتريا الموجبة لكرام .

وجد العديد من الباحثين الاخرين بان للبكتريوسين المنتج من قبل المكورات العنقودية مدى فعالية واسع جدا ضد مجاميع البكتريا الموجبة لكرام اهمها :

Bacillus subtilis, Bacillus Polymyxa, Staphylococcus aureus, ,Corynebacterium diphtheriae (Gagliano and Hindsill, 1970)

وأيد العديد من الباحثين بأن الخلية المنتجة غالبا ما تكون مقاومة للبكتريوسين الذي تنتجه (Jetten and Vogels, 1972). تشير الدراسات القليلة المتوفرة حول العوامل التي تحافظ على أعداد البكتريا داخل الجسم الى ان هناك تأثيرا كبيرا للبكتريوسين ضمن هذه

العوامل ، اذ شخصت قدرة بعض انواع البكتريا المنتجة للبكتريوسينات على كبح نمو انواع اخرى ، واعتماد على الملاحضات السريرية فان بعض انواع البكتريا التي لها القدرة على احداث امراض محتملة او كاملة تستطيع ان تمنع نمو البكتريا الممرضة كما هو الحال في وتديات الخناق وعصيات الجمرة الخبيثة (Florey, 1946)

ومنذ الوقت الذي استخدمت فيه المضادات الحيوية فان تطبيق اعطاء البكتريا المنتجة للبكتريوسين وقاية او علاج كانت قد توقفت ، الا ان المتعة في دراسة وسيلة كهذه وتاثير المضادات الحيوية على انواع البكتريا الطبيعية داخل الجسم فتح المجال واسعا لدراسات جديدة حول تطبيقات البكتريوسينات داخل الجسم الحي فقد استخدم النوع عالي الضراوة virulente من المكورات العنقودية الذهبية (A 502) للسيطرة على الوباء الذي حدث في احدى المستشفيات نتيجة الاصابة بالمكورات العنقودية وكذلك لعلاج المرضى الذين يعانون من اصابات متكررة لذلك النوع من البكتريا (Aly et.al, 1974) . اذ كانت لهذه المكورات قدرة على التداخل في نمو المكورات العنقودية داخل الجسم وخارجه ولم تكن ظاهرة التداخل هذه مفهومة في ذلك الوقت،ويظهر تاثير البكتريوسين الذي تنتجه المكورات العنقودية الذهبية(Phage71) واضحا في شفاء إصابات الجلد المختلفة من خلال تقليل اعداد المكورات المسبحية المحللة للدم نوع بيتا عند حقنها في جلد حيوان الهامستر (Hamster) مع البكتريا المنتجة للبكتريوسين (Dajani and Wannamaker,1971) .

ولهذا السبب فمن النادر ملاحظة وجود المكورات العنقودية الذهبية مع المكورات المسبحية معا في موقع الاصابة (Dajani et.al,1968). واستخدام الستافلوكوكسينA موضعيا لعلاج (50) شخصا مريضا يعانون من اصابات مختلفة سببها المكورات العنقودية.

المواد وطرائق العمل

١: تحضير مصل الارنب غير المنشط

سحب الدم من قلب الارنب بوساطة محقنة سعة (١٠) مل ثم نقل الى انابيب اختبار معقمة, وترك في حرارة الغرفة لمدة ثلاث ساعات حتى تتكون الخثرة الدموية, بعدها حركت الخثرة لفصلها عن الانبوب بأستعمال ابرة معقمة ثم وضعت الانابيب في الثلاجة (٤ ْم) حتى اليوم التالي, وسحب المصل بأستعمال ماصة باستور معقمة,بعدها رسبت كريات الدم الحمراء (ان وجدت) من المصل بجهاز الطرد المركزي بسرعة (١٠٠٠) دورة/ دقيقة ولمدة (١٥) دقيقة,ثم سخن المصل بحرارة(٥٦ ْم) في حمام مائي لمدة (٣٠) دقيقة لاتلاف العامل المتمم.

٢: **تحضير وسط هجرة الخلايا**

حضر وفق طريقة (Nonoyama,*et al*, 1979) وذلك بأذابة(١,٥) غم من الاكاروز في (١٠٠) مل من ماء مقطر وبعد ان عقم بالغليان ترك الوسك يبرد حتى حرارة (٤٥) ْم ثم اضيف اليه حجم مساوي من محلول هانكس الملحي المتوازن في درجة الحرارة نفسها, بعدها اضيف مصل الارنب غير المنشط بتركيز نهائي في الوسط مقداره (١٠%).

٣: **تحضير محلول هانكس الملحي المتوازن** pH=7.2

محضر جاهز من شركة (Flow labrotories) الانكليزية حيث استعمل هذا المحلول لتحضير عالق الخلايا اللمفاوية وعالق الخلايا متعددة اشكال النوى.

٤: **تحضير محلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي**

حضر بأذابة (٠,١٤٤) غم من (KH2Po4) و (٠,٧٩٥) غم من (Na2HPo4) و(٩)غم من (Nacl) في لتر واحد من الماء المقطر, وبعد تمام الاذابة ضبط الاس الهايدروجيني للمحلول باستعمال (٠,١) مولاري من (NaOH) ثم عقم بالموصد (١٢١ ْم لمدة ٣٠ دقيقة).

٥: **التحري عن العزلات المنتجة للستافوكوكسين** .

تم التحري عن انتاج الستافلوكوكسين لكل عزلات العنقوديات الذهبية قيد البحث باتباع طريقة Abbott and Shannon (1958) والمعتمدة على ملاحظة عدم نمو بعض السلالات الحساسة او الدالة للبكتريوسين الذي تنتجه سلالات اخرى حيث استخدمت جميع العزلات بوصفها سلالات منتجة تارة ودالة تارة اخرى بعد ان ثبتت ارقامها، وشملت الطريقة أعلاه ما يأتي :

٥-١. زرعت السلالات المراد التحري عن انتاجها للبكتريوسين بخط طولي على وسط أكار الدم وحضنت بحرارة (٣٧م) لمدة (٤٨) ساعة.

٥-٢. زرعت في اليوم الثاني السلالات التي استخدمت دالة او حساسة في المرق المغذي وحظنت بحرارة (٣٧م) لمدة (٢٤) ساعة.

٥-٣. في اليوم الثالث شبعت ورقة ترشيح بالكلوروفوروم ووضعت تحت غطاء الطبق الحاوي على وسط أكار الدم وقلب الطبق لمدة نصف ساعة، ثم ازيل النمو البكتيري من الوسط الزرعي بشريحة زجاجية نظيفة ومعقمة حيث رفع القسم الآخير من النمو وعرض الطبق مرة اخرى الى ابخرة الكلوروفورم، بعده ترك الطبق مفتوحاً لمدة نصف ساعة للتخلص من الكلوروفورم . زرعت السلالات الدالة من المرق المغذي عرضياً على وسط

اكار الدم بحيث تكون عمودية على الخط الزرعي الأول وحضنت بحرارة (٣٧م) حتى اليوم التالي حيث سجل منع النمو الحاصل لبعض السلالات الدالة بفعل الستافلوكوكسين المنتج .

٦: **استخلاص الستافلو كوكسين.**

زرعت خلايا *S.aureus* في انبوبة اختبار حاوية على (٥) مل من وسط مرق نقيع المخ والقلبBrain heart broth وحضنت بحرارة (٣٧م) لمدة (٢٤) ساعة، ثم نقلت إلى قارورة حاوية على (٢٥٠) مل من الوسط نفسه وحضنت في الحاضنة الهزازة بحرارة (٣٧م) لمدة (١٨-٢٤) ساعة (٢٠ هزة/ بالدقيقة) ، بعدها أضيف المايتومايسين بتركيز (١,٥) ملغم / مل إلى الوسط واعيد المزروع إلى الحاضنة الهزازة لمدة (٤) ساعات أخرى. ثم رسبت الخلايا بالطرد المركزي (٤٠٠٠دورة / دقيقة ولمدة ساعة واحدة). وعند استخلاص الستافلو كوكسين من الخلايا قمنا بتكسير الخلايا بجهاز تكسير الخلايا للحصول على اكبر كمية منه بعد ذلك تم حفظه بدرجة (٤م) لحين الاستعمال ، ومن ثم اخذ الستافلو كوكسين المستخلص وقدرت فعاليته حسب الطريقة في (Kageyama and Egami,1962) وكمية البروتين حسب الطريقة في (Lowery et.al.1951).

٧: **تقدير فعالية الستافلو كوكسين.**

قدرت فعالية الستافلو كوكسين المستخلص بتباع الطريقة الواردة في (Kageyama and Egami,1962) وكالآتي:

بعد تنمية المزروع البكتيري لمدة (١٨) ساعة في وسط مرق نقيع المخ والقلب، رسبت الخلايا النامية بالطرد المركزي وعزل الستافلو كوكسين المنتج الى الوسط (الراشح) عن الستافلو كوكسين المتبقي في الخلايا الذي حصل على اكبر كمية منه بعد تكسير الخلايا وبسرعة (٥٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة)، بعدها استخدم المحلول الفوسفاتي الدارئ ذو الآس الهيدروجيني (٧,٢) لتحضير تخافيف متسلسلة من الستافلو كوكسين الراشح والراسب (الخلايا) (١/٢ و ١/٤ و١/٨ و١/١٦و١/٣٢و١/٦٤و١/١٢٨) ثم قطر (٠,١) مل من كل تخفيف على وسط اكار نقيع المخ والقلب (في أطباق زجاجية) الحاوي على مزروع للعزلة الدالة وبعمر (٤) ساعات ، وبعد تم تركها لمدة نصف ساعة كي تجف القطرات، وبعدها حضنت بحرارة (٣٧م) لمدة (١٨) ساعة وبانتهاء فترة الحضن لوحظ قطر منطقة تثبيط النمو للسلالة الدالة وقدرت الفعالية (وحدة/ مل) بضرب مقلوب اعلى تخفيف للستافلو كوكسين أعطى منطقة تثبيط في (١٠). وقد اتبعت هذه الطريقة أيضا لتقدير فعالية الستافلو كوكسين الخام.

٨: **تقدير تركيز البروتين.**

استخدمت طريقة لوري الواردة في (Lowery et. al., 1951) لتقدير البروتين الكلي المستخلص من الستافلوكوكسين وكما يلي:

٨-١. استخدم محلول كاربونات الصوديوم لتحضير (١) مل من التركيز (٢٤٠،١٦٠،٨٠، ٣٢٠،٤٠٠) مكغم / مل من المحلول القياسي البومين المصل البقري في انابيب اختبار وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز.

٨-٢. اضيف (٥) مل من محلول النحاس القاعدي لكل أنبوبة مع الرج ثم ترك لمدة (١٠) دقائق بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال.

٨-٣.أضيف (0,5) مل من محلول فولن لكل أنبوبة مع الرج ثم ترك لمدة(٣٠) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.

٨-٤. قدر طيف الامتصاص لكل أنبوبة على طول موجي (٧٥٠) نانومتر واستخدم (١) مل من الماء بدلا من المحلول النموذج في تحضيرمحلول(Blank).

٨-٥. رسم المنحي القياسي لمعايرة البروتين الذي يربط العلاقة بين تركيز البومين المصل البقري والامتصاص على طول موجي (٧٥٠) نانومتر.

قد تم دراسة التأثير السمي للستافلوكوكسين المنتج من خلال دراسة تأثير عدة تراكيز منه وكانت (٤٠٠،٣٠٠،١٥٠،٧٥، ٨٠٠،٦٠٠) مكغم / مل على الخلايا اللمفاوية والبلعمية متعددة اشكال النوى. وقد تبين بأن التراكيز (١٥٠، ٣٠٠،٤٠٠) مكغم / مل ذات تأثير متابين على الخلايا مقارنة بمعاملة السيطرة. في حين كانت التراكيز الآخرى بين تأثير سام قاتل للخلايا في التركيز العالي وانعدام التأثير تقريباً في التراكيز الواطئة منه.

٩: تأثير الستافلوكوكسين الخام في عيوشية الخلايا.

٩-١-الخلايا متعددة أشكال النوى Polymorphonuclear leucocyte (PMNs).

اتبعت الطريقة الواردة في (Nonoyama et. al,1979) لدراسة تأثير الستافلو كوكسين الخام في عيوشية الخلايا متعددة اشكال النوى وكالآتي:

٩-١-١. حضر عالق الخلايا متعددة أشكال النوى (PMNs) في محلول هانكس الملحي المتوازن وبتركيز(٨× 10^6) خلية/ مل.

٩-١-٢. حضرت ثلاث تراكيز مختلفة من الستافلوكوكسين الخام في دارئ الفوسفات هي (٤٠٠و٣٠٠و١٥٠) مكغم / مل.

٩-١-٣. اضيف (1,5) مل من خلايا متعددة اشكال النوى (PMNs) إلى(١) مل من كل تركيز من الستافلوكوكسين في أنابيب بلاستيكية معقمة، وتركت انبوبتان دون إضافة(كمعاملة سيطرة).

٩-١-٤. حضنت الانابيب في حرارة (٣٧م) لمدة ساعة واحدة، بعدها حسب العدد الحي للخلايا باستعمال صيغة التربيان الزرقاء (0,02%) باستخدام شريحة تعداد الخلايا (Chamber slid) حيث عدت الخلايا المصبوغة خلايا ميتة لتحطم الغشاء ودخول الصبغة، ثم استخرجت النسبة المئوية لعيوشية الخلايا وذلك بحساب عدد الخلايا الحية والميتة واستخرجت النسبة المئوية للعيوشية وفق القانون الآتي: عدد الخلايا الحية / عدد الخلايا الكلي × ١٠٠

٩-2- الخلايا اللمفاوية.

اتبعت الخطوات نفسها في الفقرة السابقة ولكن باستعمال الخلايا اللمفاوية المعزولة من الدم.

١٠: **تأثير الستافلوكوكسين الخام في هجرة الخلايا البلعمية**.

استعملت لهذا الغرض الطريقة الواردة في (Nonoyama et.al.,1979) وكالآتي:

١٠-١. اضيف (١) مل من الستافلوكوكسين الخام وبالتراكيز الى (٩) مل من وسط الهجرة في اطباق معقمة وحركت الأطباق بلطف لمجانسة محتوياته.

١٠-٢. بردت الاطباق بحرارة (٤م) ثم عملت حفر على سطح الأكار باستعمال ثاقبة قطرها(٨) ملم.

١٠-٣. وضع (٢٠٠) مايكرولتر من عالق الخلايا البلعمية الحاوي على (5×10^6) خلية / مل في كل من الحفر المعمولة على الاطباق المعاملة واطباق السيطرة السالبة الحاوية على وسط الهجرة وال(Phytohaemagglutinin (PHA بتركيز(١٠) مكغم / مل.

١٠-٤. حضنت الأطباق داخل مجففات في الحاضنة بحرارة (٣٧م) وبوجود (5-10%) من غاز ثاني اوكسيد الكاربون لمدة (٧٢) ساعة،قيس بعدها قطر دائرة الهجرة بالمليمترات.

كررت التجربة لمرتين وبمعدل طبقين لكل تركيز وبحفرتين في كل طبق.

١١: **تاثير الستافلو كوكسين الخام في تفاعل ارثس وفرط الحساسية الآجل** Delayed Type Hypersensitivity.

درس تاثير البكتريوسين الخام في تفاعل ارثس وفرط الحساسية الآجل في الفئران وذلك بان قسمت الفئران إلى أربع مجموعات وبمعدل خمس فئران لكل منها وتمت معاملتها كالاتي :

١١-١. اعطيت المجموعات الثلاثة الاولى بكتريوسين خام بتركيز (400,300,150) مكغم / مل فيما تركت المجموعة الرابعة كمعاملة سيطرة إذ حقنت بالـ (PBS) عن طريق العضلة يومياً ولمدة (12) يوماً.

١١-٢. تم تمنيع جميع الحيوانات بكريات الدم الحمراء للخروف (10%) عن طريق الحقن داخل التجويف الخلبي في اليومين الرابع والثامن من المعاملة (Al-Joofy et.al,1996).

١١-٣. بعد أربعة أيام من آخر تمنيع حقنت راحة القدم اليمنى للفار بـــ (30) مايكرو لتر من عالق كريات الدم الحمراء المغسولة للخروف (10%) فيما حقنت راحة القدم اليسرى (30) مايكرو لتر من ال(PBS) كسيطرة .

١١-٤. تم قياس تفاعل ارشن من خلال ملاحظة انتفاخ راحة القدم بعد(4) ساعات من حقن كريات الدم الحمراء المغسولة للخروف ، في حين تم قياس فرط الحساسية الآجل بعد (-48 24) ساعة(Blackwood and Rowe, 1987).

١٢: **تأثير الستافلو كوكسين الخام في التشكل الزهري التائي**.

أجريت التجربة وفقاً للطريقة الواردة (Mendes et. Al.,1973) وكالاتي:

١٢-١. حضر عالق الخلايا اللمفاوية وبتركيز (10^5) خلية/مل.

١٢-٢. مزج في انبوبة اختبار (0,25) مل من عالق الخلايا اللمفاوية و (0,25) مل من (10%) من عالق كريات الدم الحمراء للخروف و (0,25) مل من البكتريوسين الخام وبالتراكيز النهائية السابق ذكرها للانابيب المعاملة و (0,25) مل من PBS لأنابيب السيطرة (حضرت انبوبتي اختبار لكل معاملة).

١٢-٣. حضنت الأنبوبة الأولى بحرارة (4م) لمدة ساعة واحدة لحساب النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية التائية الفعالة المكونة للشكل الزهري ، فيما حضنت الثانية بنفس الحرارة ولكن لمدة (24) ساعة لحساب النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية التائية الكلية المكونة للشكل الزهري.

١٢-٤.بعد انتهاء فترة الحضن نبذت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة (1000) دورة/ دقيقة ولمدة (5) دقائق، وبعد أن أهمل الراشح ورجت الخلايا المترسبة بلطف مع ما تبقى من الراشح، ثم وضعت قطرة منه على شريحة زجاجية نظيفة، وبعد نشرها جيداً تركت لتجف ثم ثبتت بالكحول المثيلي لمدة (10) دقائق وصبغت بصبغة رايت لمدة (20) دقيقة.

١٢-٥.فحصت الشريحة باستعمال المجهز الضوئي وحسب (200) خلية لمفاوية، ثم استخرجت النسبة المئوية للخلايا المكونة للشكل الزهري وذلك بان تنتظم حولها ثلاث او اكثر من كريات الدم الحمراء للخروف.

١٣: **تاثير الستافلوكوكسين الخام في التشكيل الزهري البائي**.

اتبعت الطريقة الواردة في (Mendes et.al., 1973) وكآلاتي:

١٣-١. حضر عالق الخلايا اللمفاوية وبتركيز (10^5) خلية/مل.

١٣-٢. حضر مصل الارنب الحاوي على الاضداد المضادة لكريات الدم الحمراء للخروف وذلك بحقن الارنب مدة ثلاث ايام متتالية عن طريق الوريد بعالق (100%) من كريات الدم الحمراء للخروف وبواقع (0,5) مل في اليوم الاول (1) مل في اليوم الثاني و (1.5) مل في اليوم الثالث.

١٣-٣ بعد مرور اسبوع سحب الدم من قلب الارنب ووضع في انابيب معقمة وترك ليتخثر، ثم نبذ بسرعة (1000) دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق للحصول على المصل الذي خفف بنسبة (200:1).

١٣-٤ مزجت كميات متساوية من كريات الدم الحمراء للخروف (بتركيز 10%) ومن مصل الارنب (تركيز 200:1)، وبعد ان حضن المزيج بحرارة (37م)/ (30) دقيقة، نبذ بسرعة (1000) دورة/٥دقيقة ، ثم اعيد تعليق الخلايا في محلول هانكس الملحي المتوازن للحصول على تركيز (100%).

١٣-٥مزجت كميات متساوية من العالق مع تخفيف (10:1) من متمم الفأر، وحضنت بحرارة (37م) لمدة (30) دقيقة، ثم نبذت بسرعة (1000) دورة/دقيقة لمدة (5) دقائق لثلاث مرات. بعدها علق الراسب في محلول هانكس الملحي المتوازن للحصول على تركيز (10%). اطلق على هذا المزيجEAC (Antibody Complement Erythrocyte).

١٣-٦ مزج (0,25) مل من عالق الخلايا اللمفاوية و (0,25) مل من مزيج (EAC) مع (0,25) مل من كل من تراكيز البكتريوسين الخام بالتراكيز النهائية السابقة الذكرفيما اضيف الى انابيب السيطرة (0,25) مل من الـ (PBS).

١٣-٧. حضنت الانابيب بحرارة (4م) لمدة ساعة واحدة، نبذت بعد ذلك بحرارة (25م) بسرعة (1000) دورة/دقيقة لمدة (5) دقائق. وبعد إهمال الراشح مزج الراسب مع ما تبقى من الراشح، ونشرت قطرة منه على شريحة زجاجية نظيفة حتى جفافها، وبعد تثبيتها على الشريحة صبغت بصبغة رايت واحتسبت النسبة المئوية للخلايا المكونة للشكل الزهري من مجموع (200) خلية لمفاوية وحسب الطريقة المتبعة في اختيار التشكل الزهري التائي.

١٤: **تاثير الستافلوكوكسين الخام في خلايا البلازما**.

اتبعت الطريقة الواردة في (Nowotny, 1979) لدراسة تأثير البكتريوسين الخام في الخلايا المولدة للأضداد وكالاتي:

١٤-١. تم تمنيع الحيوانات كما جاء في الفقرة (سابعا-١).

١٤-٢. بعد التمنيع قتلت الفئران بالضغط على الرقبة من الجهة الظهرية وازيل الطحال ووضع في طبق معقم احتوى على (5) مل من الـ (HBSS) Hanks Balanced Salt Solution، ثم قطع الطحال وحضر عالق الخلايا في الـ (HBSS)، نبذ العالق بالمطرد

المركزي بسرعة (1500) دورة/دقيقة ولمدة (5) دقائق، وبعد إهمال الراشح غسل الراسب ثلاث مرات بمحلول هانكس الملحي المتوازن، ثم علق بالمحلول نفسه.

١٤-٣. حضرت اطباق الاكاروز بصب (10) مل من (1,5%) اكاروز في (100) مل من الـ (PBS) في كل طبق وتركت لتتصلب.

١٤-٤. مزج في انابيب زجاجية صغيرة (0,1) مل من (10%) كريات الدم الحمراء المغسولة للخروف و (0,1) مل من عالق خلايا الطحال و (2) مل من (0,7%) من الاكاروز الذائب في حرارة (45م).

١٤-٥. صب المزيج بسرعة وحذر على طبقة الاكاروز السفلية، وحضنت الأطباق بحرارة (37م) لساعة واحدة.

١٤-٦. أضيف (2,5) مل من تخفيف (10:1) من متمم خنازير غينيا لكل طبق واعيد حضن الأطباق بحرارة (37م) لمدة نصف ساعة.

١٤-٧. حسبت الخلايا المكونة للصفيحات (Plaquse) لكل (10^6) خلية من خلايا الطحال.

١٥: **تأثير الستافلوكوكسين الخام على معامل انقسام خلايا نخاع عظم الفأر**.

أجريت التجربة وفق الطريقة الواردة في (عيسى ,1986) وكآلاتي: قسمت الفئران إلى أربع مجموعات تظم كل منها اربع فئران لكل تركيز، إضافة إلى معاملة السيطرة. ثم حضرت تراكيز البكتريوسين الخام في دارئ الفوسفات (PBS) وكآلاتي:

(400,300,150) مكغم لكل (0,5) مل أي بجرع (16000,12000,6000) مكغم/كغم من وزن الحيوان، بعدها حقنت الفئران بـ (0,5) مل من التراكيز المحضرة أعلاه في التجويف الخلبي وتركت لمدة (18) ساعة، بعدها حقنت بالطريقة نفسها بحجم (0,5) مل من محلول الكولجسين ذو تركيز (١) ملغم/مل.

أخيرا قتلت الفئران بعد مرور (4) ساعات بالضغط على الرقبة من الجهة الظهرية وتم تشريحها للحصول على نخاع العظم وكالاتي:

أ. ثبت كل فأر على ظهره فوق طبق التشريح وغسلت أطرافه السفلى بالكحول الاثيلي (تركيز 70%).

ب. ازيل الجلد من منطقة الفخذ، ومسك عظم الفخذ بالملقط من المنطقة الوسطية وقطع ارتباطه بالمفصلين.

ج. نظف العظم خارج جسم الفأر من بقايا العضلات ونزعت الأقراص المرتبطة بالمفصلين.

د. مسك العظم بشكل عمودي على انبوبة اختبار معقمة لغرض حقنه بـ (10) مل من دارئ الفوسفات (PBS) بمحقنة معقمة لانزال النخاع بحيث يصبح لون العظم ابيض، وجمع نخاعي كل عظمين من الفأر الواحد في انبوبة اختبار واحدة.

و. بعدها نبذت الخلايا بالطرد المركزي بسرعة (1500) دورة/دقيقة لمدة (٥) دقائق واهمل الراشح فيما اضيفت الى الراسب بضع قطرات من المحلول المثبت (٣ كحول اثيلي و ١ حامض الخليك) ثم اكمل الحجم الى (5) مل من المحلول المثبت مع الرج المستمر.

ز. وضعت الانابيب في حرارة (4م) لمدة (30) دقيقة لتثبيت الخلايا، ثم نبذت بسرعة (1000) دورة/دقيقة لمدة (5) دقائق، غسلت بعدها بالمثبت ذاته لثلاث مرات وعلقت بـ (1) مل من المحلول المثبت.

ح. سحب عالق الخلايا بماصة باستور، واسقط بصورة عمودية على الشرائح الزجاجية ثم تركت الشرائح لتجف على الصفيحة الساخنة بحرارة (60م).

ط. صبغت الشرائح بصبغة كمزا لمدة (20) دقيقة، وغسلت بالماء المقطر، فحصت بعد جفافها تحت المجهر الضوئي وعدت الخلايا المنقسمة بفحص (500) خلية على الأقل واستخرجت النسبة المئوية للانقسام الخيطي = عدد الخلايا الانقسامية/العدد الكلي للخلايا اللمفاوية × 100 .

النتائج والمناقشة

١: العزلات المنتجة للستافلوكوكسين

من مجموع العزلات التي شملتها الدراسة (١٥٠ عزلة) امكن الحصول على (٢١) عزلة منتجة للستافلوكوكسين (أي بنسبة ١٤%) فيما كانت العزلات الاخرى غير منتجة. وتختلف نسبة وجود العزلات المنتجة للستافلوكوكسين من دراسة لاخرى وذلك باختلاف المصادر التي عزلت منها وبالطريقة المتبعة في التحري عن انتاجيتها(Tagg,et al,1976).

وكان لاستخدام طريقة التخطيط المتقاطع للتحري عن انتاج البكتريوسين في هذه الدراسة فوائد كثيرة, اهمها ان حضن العزلة المنتجة لمدة (٤٨) ساعة اعطى الوقت الكافي لافرازكمية مناسبة من الستافلوكوكسين ومن ثم انتشارها داخل الوسط الزرعي لمسافات تظهر من خلالها مناطق تثبيط النمو الواضحة للعزلات المتحسسة.وكانت مناطق التثبيط قد تراوحت بين (١٠- ١٦) ملم حسب العزلة المنتجة, لذلك فقد اختيرت عزلتين(١٢٩و ١٣٤) مصدرهما مسحات الانف لاظهارهما اعلى انتاجية للستافلوكوكسين مقارنة ببقية العزلات المنتجة الاخرى. ويمكن ان يعود وجود عزلات منتجة للستافلوكوكسين لدى حاملي بكتريا

العنقوديات الذهبية في منطقة الانف الى قدرة البكتريا على البقاء بصورة نقية لفترة زمنية طويلة قد تستمر لعدة سنوات بفعل الستافلوكوكسين الذي تنتجه.

٢: **استخلاص الستافلوكوكسين**

اجريت عدة محاولات لاستخلاص الستافلوكوكسين للعزلتين (١٢٩ و ١٣٤) من الوسط ومن خلال تنمية البكتريا في وسط مرق نقيع المخ والقلب واظهر الستافلوكوكسين المنتج من العزلة ١٣٤ ثباتية وتأثير اكبر في العزلات الحساسة.

٣: **تقدير فعالية الستافلوكوكسين**

اظهرت النتائج ان اعلى تخفيف للستافلوكوكسين المنتج من العزلة ١٢٩ اعطى منطقة تثبيط كان ٣٢/١ للراسب و ٨/١ للراشح ومن هنا قدرت الفعالية بانها ضرب مقلوب هذين التخفيفين في (١٠) أي ٣٢٠ وحدة/سم للراسب و ٨٠ وحدة/سم للراشح وكذلك بالنسبة للعزلة ١٣٤ التي كانت فعالية الراسب بها ٦٤٠ وحدة /سم للراسب و ٨٠ وحدة/سم للراشح .

٤: **دراسة تأثير الستافلوكوكسين الخام على الخلايا المناعية**

اظهرت نتائج معاملة الخلايا البلعمية متعددة اشكال النوى والخلايا اللمفاوية بالتراكيز(١٥٠ و٣٠٠و ٤٠٠) مكغم/مل من الستافلوكوكسين الخام على التوالي لمدة ساعة واحدة ان الستافلوكوكسين الخام ذو تأثير سمي على الخلايا المعاملة به لاسيما عند استخدام التراكيز (٣٠٠و٤٠٠) مكغم/مل (جدول ١) قد يعود التأثير السلبي للتراكيز المستخدمة من الستافلوكوكسين الخام على عيوشية الخلايا الى دخول الستافلوكوكسين غشاء الخلية لعمل قناة ناضحة للايونات مؤديا الى موت الخلية المتحسسة(Vand- der- Goot et al 1993) .

جدول (١) تأثير الستافلوكوكسين الخام على عيوشية الخلايا متعددة أشكال النوى و اللمفاوية

تركيز الستافلوكوكسين مكغم / مل	عيوشية (PMNS) % المعدل + الانحراف المعياري	عيوشية الخلايا اللمفاوية % المعدل + الانحراف
صفر	1.785 - + 96.75	3.082 - + 95
١٥٠	* *4.387 - + 78.5	* *2.549 - + 85
٣٠٠	* *5.66 - + 35.5	* *1.871- + 35
٤٠٠	* *10581 - + 28	* *2.278

٥: تاثير الستافلوكوكسين الخام على هجرة الخلايا البلعمية

تشير نتائج الجدول (٢) الى التأثير المثبط للستافلوكوكسين الخام بالتراكيز المستخدمة (١٥٠ و ٣٠٠ و٤٠٠) مكغم/مل على معدل قطر منطقة هجرة الخلايا البلعمية واظهرت نتائج التحليل الاحصائي (اختبار F) وجود فرق معنوي ($P<0.05$) بين كل من معدل قطر منطقة الهجرة للخلايا المعاملة بالتراكيز آنف الذكر والخلايا غير المعاملة (معاملة السيطرة). وتوصل بعض الباحثين مثل (بهجت, ١٩٨٣) الى ان العزلات غير المنتجة للستافلوكوكسين تظهر زيادة في معدل قطر الهجرة للخلايا البلعمية وذلك لتحريرها مركبات مختلفة تؤثر على هجرة الخلايا . ويؤكد هذا ما ذكر في الدراسات عن المواد التي تحررها بكتريا المكورات العنقودية والتي تسبب الانجذاب الكيمياوي.

جدول رقم (٢) تأثير الستافلوكوكسين الخام على هجرة الخلايا البلعمية تحت الأكاروز

تركيز الستافلوكوكسين مكغم / مل	معدل هجرة الخلايا البلعمية (بالملم) $^{+}_{-}$ الإنحراف المعياري
صفر (السيطرة السالبة)	13.75 + - 1.09
150	**12 + - 0.71
300	**9.75 + - 0.83
400	**8.25 + - 0.83
السيطرة الموجبة (PHF)	**22.25 + - 1.78

٦: تاثير الستافلوكوكسين الخام على تفاعل ارثس وفرط الحساية الآجل

يلحظ من الجدول (٣) حدوث انخفاض في معدلات قيم ارثس في مجاميع الفئران المعاملة بالستافلوكوكسين الخام بتراكيزه المستخدمة (١٥٠ و ٣٠٠ و٤٠٠) مكغم / مل على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة (الفئران غير المعاملة) ويمكن تفسير تفاعل ارثس وفرط الحساسية الآجل في مجاميع الفئران المعاملة بتراكيز الستافلوكوكسين الخام الى تأثيره على الخلايا اللمفاوية التائية اذ يمكن ان يكون مثبط لتكاثر الخلايا اللمفاوية التائية عن طريق تثبيطه اظهار مستقبلات بين ابيضاضي ٢ على سطوح تلك الخلايا. ويعتمد تفاعل ارثس على وجود

الاضداد وتتم اعلى قيم حدوثه بعد (٣ ٤) ساعات اما فرط الحساسية الآجل فيرتفع بعد (١٨_٢٤) ساعة وتكون الخلايا اللمفاوية التائية الوسيط في هذه العملية (Roitt, 1988).

جدول رقم (٣) تأثير الستافلوكوكسين الخام على أرثس وفرط الحساسية الأجل

تركيز الستافلوكوكسين مكغم / مل	عيوشية (PMNS) % المعدل + الانحراف المعياري	عيوشية الخلايا اللمفاوية % المعدل + الانحراف
صفر	1.785 - + 96.75	3.082 - + 95
١٥٠	* *4.387 - + 78.5	* *2.549 - + 85
٣٠٠	* *5.66 - + 35.5	* *1.871- + 35
٤٠٠	* *10581 - + 28	* *2.278

٧: **تأثير الستافلوكوكسين الخام على التشكل الزهري التائي**

اظهرت النتائج ان معاملة الخلايا اللمفاوية بالتراكيز المستخدمة من البكتريوسين (١٥٠ و ٣٠٠ و ٤٠٠) مكغم / مل كان لها تأثير واضح بانخفاض النسبة المؤية لتكوين التشكل الزهري الفعال والكلي وذلك من خلال المقارنة مع الخلايا غير المعاملة (مجموعة السيطرة) (جدول٤) وقد يعود هذا الانخفاض الى تاثير الستافلوكوكسين الخام في فعالية مستقبلات الخلية اللمفاوية التائية لكريات الدم الحمراء للخروف او الى تأثيره على عيوشية الخلايا اللمفاوية (بنوعيها) كما وسبق وان تمت الاشارة له في جدول (١) اذ ان الخلايا الميتة لا تكون الشكل الزهري وبهذا فأن الستافلوكوكسين (واعتمادا على التراكيز المستعملة) يعمل على تثبيط الاستجابة المناعية الخلوية التي تعتمد بدورها على عدد الخلايا اللمفاوية التائية وعملها وبتراكيز محددة.

ان هذه النتائج تدعم نتائج فرط الحساسية الآجل (جدول٣) اذ وجد ان هناك علاقة طردية بين فرط الحساسية الآجل ونسبة تكوين التشكل الزهري حيث تزداد النسبة في حالة زيادة فرط الحساسية الآجل وتنخفض بانخفاضه (Wybran,et al., 1973) .

جدول رقم (٤) تأثير البكتريوس الخام في الشكل الزهري التائي

تركيز الستافلوكوكسين مكغم / مل	التشكل الزهري الفعال % المعدل + / – الإنحراف المعياري	التشكل الزهري الكلي % المعدل + / – الإنحراف المعياري
صفر	1.299 - + 61.25	0.829 - + 65.75
١٥٠	* *6.837 - + 38.5	* *5.723 - + 54.5
٣٠٠	* *6.538 - + 36.5	* *1.785- + 52.25
٤٠٠	* *6.837 - + 35.5	* *1.225 - + 50

٨: تأثير الستافلوكوكسين الخام على التشكل الزهري البائي

يبين الجدول (٥) ان النسبة المئوية للتشكل الزهري البائي انخفضت في الخلايا المعاملة بالتراكيز (١٥٠ و ٣٠٠ و ٤٠٠) مكغم/مل من الستافلوكوكسين الخام على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة ويمكن ان يعزى تأثيره على تثبيطه انتاج بين ابيضاضي _ ٢ الضروري لنمو الخلايا اللمفاوية التائية والبائية وتمايزها وان التثبيط يزداد بأزدياد التركيز المستعمل.

جدول رقم (٥) تأثير الستافلوكوكسين الخام على التشكيل الزهري البائي

تركيز الستافلوكوكسين مكغم / مل	التشكل الزهري البائي % المعدل + – الإنحراف المعياري
صفر (السيطرة السالبة)	1.229 - + 28.75
150	** 0.829 - + 24.25

300	22.75 + - 1.479 **
400	20.25 + - 1.92 **

٩: تأثير الستافلوكوكسين الخام على عيوشية خلايا البلازما

يشير الجدول (٦) ان التراكيز المستخدمة من الستافلوكوكسين الخام (١٥٠و ٣٠٠و ٤٠٠) مكغم/مل على التوالي ذات تأثير مثبط على معدل عدد الخلايا المكونة للصفيحات لكل مليون خلية طحال وتظهر النتائج ان الستافلوكوكسين (اعتمادا على التراكيز المستخدمة) يثبط الاستجابة المناعية الخلطية من خلال تثبيطه تمايز الخلايا للمفاوية البائية لتصبح خلايا بلازما.

جدول رقم (٦) تأثير الستافلوكوكسين الخام على خلايا البلازما

تركيز الستافلوكوكسين مكغم / مل	عدد الخلايا المكونة للصفحات (PFE) لكل ١٠ ° خلية طحال + – الإنحراف المعياري
صفر (السيطرة السالبة)	1153.75 + - 32.28
150	1106.25 + - 2.165 **
300	1061.75 + - 4.603 **
400	1043.25 + - 2.046 **

١٠:تاثير الستافلوكوكسين الخام على معامل انقسام خلايا نخاع العظم في الفئران

يشير الجدول (٧) الى تأثير الستافلوكوكسين الخام بالتراكيز المستعملة (١٥٠ و ٣٠٠ و ٤٠٠) مكغم/مل في معامل انقسام خلايا نخاع عظام الفئران حيث كانت قيم معامل الانقسام الخيطي مختلفة للخلايا المعاملة وسجلت اعلى قيمة لمعامل الانقسام الخيطي في الخلايا المعاملة عند استعمال التراكيز الواطئة حيث ادت بعضها الى زيادة في عملية الانقسام وصلت الى ما يقرب من (٣٠%) عن معاملة السيطرة وكما هو الحال عند استعمال تركيز (١٥٠)مكغم/مل, وعموما كانت اوطأ قيمة لمعامل الانقسام الخيطي عند التراكيز (٣٠٠ و ٤٠٠)مكغم/مل حيث يمكن ان تدل مثل هذه النتائج على قدرة تلك التراكيز في تثبيط الانقسام الخيطي في اطواره المختلفة كما اشارت اليه (عيسى, ١٩٨٦).

ودلت نتائج Farkas and Muclow.(1980) بأن التراكيز العالية للبايوسين (البكتريوسين) تعمل كمثبط لانقسام الخلية السرطانية حيث يبدأ عملها عند فترة ما قبل الانقسام الخيطي و في فترة تخليق الدنا.

جدول رقم (٨) تأثير الستافلوكوكسين الخام على معامل خلايا نخاع العظم في الفئران

تركيز الستافلوكوكسين مكغم / مل	معامل الأنقسام الخيطي + – الإنحراف المعياري
صفر (السيطرة السالبة)	2.345 - + 16
150	** 1.09 - + 21.75
300	** 0.829 - + 14.75
400	** 0.545 - + 13.125

المصادر الأجنبية

- Abbott, J. D., and R. Shannon.(1958). A mathod for typing Shigella sonei using colicin production as a marker. J. Clin. Pathol. 11:71-77.
- Al – joofy, I. K.; Mousway, K. M. and Rahid, S.(1996).Immunomodulatory effect of semipurified Rhizobium polysaccharides fracton in BALB/C mice (submitted publishing, J. Fac. Med., Baghdad. (In press)
- Aly, R. H.; Maibach, H. I.; Shinefield, H. R.; Mandel, A. and Starauss, W. G. (1974).Bacterial interference among strain of Staphylococcus aureus in man.J.Infect. Dis.,129 :720-742.
- Blackwood, L. I. And Row, J. I. (1987). Supprssion of delayed – type hypersensitivity and cell – mediated immuno responses to Listeria monocytogenes induced by Pseudomomonas aeruginosa. Infect. Immun.,55:639-644.
- Carmer, W. A.; Cohen, F. S.; Merrill, A. R. and Song, H. Y.(1990). Micro review (structure and dynamics of colicin E channal). Mol. Microbiol., 414:519-526.
- Dijani, A. S.; and Wannamaker, L. W. (1970).Experimental infection of the skin in the hamster stimulating human impetigo. 111. Interaction between Staphylcocci and A Streptococci. J. Exp. Med., 134:588-599.
- Dijani, A. S.; Farah, F. S. and Kurban, A. K.(1968). Bacterial etiology of superficial phoderma in Lebanon. J. Pediator.,73:431-435.
- Farkas, H. and H. Muclow, C. E.(1980). Bacteriocins effect on mammalians cell mode of analyzed by flow eytometry and cell sorting cell. Mol. Biol., 26:597-604.
- Florey, H. W.(1946). The use of microrgansims for therapeutic purposes.yale J. Biol. Med.,19:101-117.
- Gagliano, V. J. and R. D. Hindsill.(1970). Characterization of a Staphylococcus aureus bacteriocin. J. Bacteriol.,104:117-125.
- Garcia, Q. H. (1992). Mechanism of the antibiotic activity of the bacteriocin. Rev. Med. Chil, 120:439-440.
- Hale, E. M. and R. D. Hindsill.(1973). Characterization of bacteriocin from S. aureus 462. Antimicrob. Agents. Chemother.,4 :634-640.
- Jatten, A. M. and G. D. Vogel.(1972). Nature and properties of a S. epidermidis bacteriocin. J. bacteriol.,112:243-250.
- Kageyama, M. and F. Egami.(1962). On the purification and some properties of a pyocin a bacteriocin produced by P. aeruginosa life.sci.,9:471-476.
- Lowery, O. H.; Rosebrouch, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J.(1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.,193:265-275.
- Mendes, N. E. ; Tolanal, M. E. A. ; Silveria, N. P. A.; Gilbertsen,R. B.; and Metzgar, R. S.(1973). Technical aspects of the Rosett test used to detect human

complement receptor (B) and sheep erythrocyte binding (T) lymphocytes. J.Immunol.,111:861-867.

- Nonoyama, K. J. ; H. Mine, Y. ; Nishidam. G. T. S. and Kawahara, S.(1979). Inhibitory and killing activity of rabbit a PMN leucocytes: Mechanisms of action of aPMN leacocytes inhibitor. Infec. Immun.,24:399-403.
- Nowotny, A.(1979). Determination of antibody production cell at cellular level (Immuno Plaque method).In:Basic exercises in immuno chemistry a laboratory manua.2nd ed. Pringer, new york.
- Rogolsky, M. and B. Wiley.(1977). Production and properties of Staphylococcin genetically controlled by the Staphylococcal plasmid for exofoliative toxin. Infect. Immun.,15:726-732.
- Roitt, I.(1988). Essential immunology.6th ed. Black well.Scient. Public.
- Tagg, J. R.; A. S. Dijani and L. W. Wannamaker.(1975). Bacteriocins of group B Streptococci.: Partial purification and characterization. Antimicrob.Agents. Chemother.,7 :764-772.
- Tagg, J. R.; A. S. Dijani and L. W. Wannamaker.(1976). Bacteriocin of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev.,40:722-756.
- Van-der-Goot, F.G.; Didat, N.; Pattus, F. S.; Downhan, W. and Lettelliev, L.(1993). Role of acidic lipids in the translocated and channel activity of the colicin A and N in E. coli cells. Eur. J. Biochem.,13(1) :217.
- Wybran, J.; Ievin. A. S.; Spitler, L. E. and Fundenbery, H. H.(1973). Rosette – forming cells immunological deficiency disease and transfer Factor. N. Engl. J. Med.,288:710-713.

المصادر العربية

- بهجت, شبابة عبد اللطيف (١٩٨٣). انتاج البكتريوسين الخام من بكتريا Staphylococcus aureus وتأثيره على عملية البلعمة في الزجاج. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.
- عيسى, رجوة حسن (١٩٨٦). دراسة كيميائية حياتية ووراثية على البايوسين (R) وتأثيره على البلعمة. رسالة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة بغداد.

Extraction of Staplylococcus aureus Staphylococcin and Study of its Effect on Some Immuno Compentent Cells

DR.USAMA N. NIJRIS
University of Tikrit - Education College / Samarra - Biology Dept

Abstract:

This study included (150) isolates os Staphyllococcus aureus which were obtained from patients suffering from different infection cases representing boils, skin infection, blood, urine, and nose swab of *S. aureus* carriers.

The ability of these isolate to produce Staphyllococcin and study the effect of such Staphyllococcins on some immuno competent cells.

Effect of Staphyllococcin on some immuno competent cells was studied through its effect on polymorphonuclear leucocytes (PMNs) and lymphocyte, arthus reaction, delayed type hypersensitivity, Tand B – rosette forming, plque forming cell and finally its effect on the mitotic index in the mouse bone marrow cell.

Results of the study could be summarised as follow:

Twenty one of the isolate produce Staphyllococcin , tow of them (SN 129, SN134 from nose swab) exhibited best antibacterial activity when the diameter of the inhibition zone reached (15.5, 16) mm, respectively.

Staphylococcin activity of precipitate and filtrate of the isolate were (320)u/ml to the ppt and (80) u/ml to the filtrate of SN129 isolate, (640) u/ml to the ppt and (80) u/ml to the filtrate of SN134 isolate.Protein concentration of the tow isolates (from precipitate) was (200)µg /ml and (300) µg /ml respectively, so SN134 Staphylococcin was used for further studies.

The result of treating PMNs and lymphocyte presented the toxicity effects on concentration (150,300,400) µg /ml of the crude Staphylococcin.

Crude Staphylococcin has inhibition effect to migration of PMNs, compared with control (cells that were not treat with Staphylococcin).

The results of the crude Staphylococcin upon arthus reaction and delayed type haypersensitivity by using the brevious concentration presented the reducing avarage of mixing arthus reaction and delayed type haypersensitivity compared with control.

The using of crud Staphylococcin led to the reducing of the percentage of T and B rosette formation, by using concentration (150,300,400) µg /ml.

The result of the crude Staphylococcin effect on the plaque forming cells presented the reduction of the average of the number of forming cell for the

plaque forming cells with concentration (150,300,400) µg /ml compared with control.

The result presented the inhibitor effect to the tow concentration (300,400) µg /ml of the crude Staphylococcin on the mitotic index of the mouse bone marrow cells, whereas the using of (150) µg /ml concentration has increased the mitotic index (21.75) when the control was (16).