------مجلة علوم الرافدين، المجلد 26، العدد 1، ص 20-33، 2017------

عزل وتنقية الببتيدات المضادة للجراثيم من دم بعض الحيوانات ودراسة تأثيرها المضاد للجراثيم تجاه بعض البكتريا المرضية متعددة المقاومة للعلاجات

محمد عبدالله محمود
قسم علوم الحياة / كلية التربية/ جامعة الموصل

محسن أيوب عيسى
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

(أستلم 26/ 6 / 2013 ؛ قُبل 9 / 9 / 2013)

الملخص

يهدف البحث الى عزل وتنقية الببتيدات الموجبة Cationic المضادة للجراثيم Antimicrobial Peptides (Amps) من دم الأغنام، والأبقار، والجمال، و دراسة التأثير المضاد لهذه الببتيدات تجاه مجموعة من البكتريا المرضية المقاومة للعلاجات، وهي: (*Staphylococcus aureus* ، *Enterococcus faecalis*، *Pseudomonas aeruginosa* ، *E.coli: 0157: H7*) ومقارنة التأثير مع بعض المضادات الحيوية.

أظهرت النتائج إمكانية الحصول على هذه الببتيدات من مصادرها الحيوانية المختلفة ضمن التقنيات المستخدمة في هذه الدراسة، حيث أظهرت النتائج الخاصة بتقنية الـ HPLC، وجود (6) قمم امتصاص في المستخلص الخام للببتيد المعزول من دم الأغنام و (7) قمم امتصاص في المستخلص الخام للببتيد المعزول من دم الابقار، و (21) قمة امتصاص في حالة المستخلص الخام للببتيد المعزول من دم الجمال.

أوضحت النتائج ايضاً أن جميع هذه الببتيدات كانت مؤثرة ولكن بصورة متباينة ولم تظهر أي حالة مقاومة تجاهها، وإن أفضل تأثير كان في حالة الببتيد المعزول من دم الجمال، وإن تأثير الببتيد المعزول من دم الأغنام والأبقار كان متقارباً نوعاً ما. وان نوعي البكتريا الموجبة لصبغة كرام كانتا الأكثر تأثرا خاصة تجاه الببتيد المعزول من دم الجمال، وبأقطار تثبيط (27) ملم و (26) ملم لبكتريا السبحيات البرازية والعنقوديات الذهبية على التوالي.

الكلمات الدالة: الببتيدات المضادة للجراثيم، الببتيدات الموجبة، المقاومة العلاجية.

Isolation and Purification of Antimicrobial Peptides from the Blood of some Animals and the Study of its Antimicrobial Activity Against some Multidrug Resistant Pathogenic Bacteria

Mohammed A. Mahmood
Department of Biology /College of Education

Muhsin A. Essa
Department of Biology/ College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The study aimed to isolate and purify the cationic Antimicrobial peptides (Amps) from the blood of sheep, bovine and camels, then study its antimicrobial activity against some multidrug resistant pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa , E.coli : 0157: H7*), and compare it with some antibiotics.

The results showed that those peptides could be obtained from various animals using the techniques in this study. The results of HPLC technique showed that there are (6) peaks in the crude

extract from sheep blood and (7) peaks for bovine blood and (21) peaks in the crude extract isolated from camels' blood.

The results also showed that all these peptides were effective, but they have different effects, and all the bacteria were sensitive to it. The peptide isolated from the camels blood was the best, while those isolated from sheep and bovine showed similar activities, and all peptides affect gram-positive bacteria more than gram-negative, especially peptides isolated from camels blood as the inhibition zone was (27) mm and (26) mm for *Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus* respectively.

Keywords: Antimicrobial peptides, Cationic peptides, drug resistance.

المقدمة

نتيجة للحاجة الملحة في البحث المستمر والمتطور عن البدائل العلاجية لحل مشكلة المقاومة البكتيرية، والقضاء على البكتريا ذات المقاومة المتعددة للعلاجات والوصول إلى طرائق جديدة ومتنوعة للعلاج والقضاء على الأمراض البكتيرية، تم التوصل إلى اكتشاف ما يسمى بالببتيدات المضادة للجراثيم Antimicrobial Peptides (Amps) التي تعرف بأنها مجمل الببتيدات الدفاعية للمضيف في الكائنات الحية المختلفة والتي تدخل ضمن المناعة الذاتية كاستجابة لأي مؤثر خارجي أو بيئي (Wang, 2010 ; Oliveira *et al*., 2011). حيث لوحظ ان لهذه الببتيدات قدرة عالية في قتل أنواع مختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة الكرام، ومن ضمنها البكتريا التي تظهر مقاومة للمضادات الحيوية التقليدية، فضلا عن فعالية مؤثرة ضد الفطريات والفيروسات وحتى الخلايا السرطانية (Epand and Epand, 2010).

تعد هذه الببتيدات عوامل علاجية متطورة تمتاز عن المضادات الحيوية المتداولة بكونها ذات فعالية قاتلة Bacteriocidal أكثر من كونها مثبطة للبكتريا Bacteriostatic وعدم تطور مقاومة بكتيرية تجاهها، كما تمتاز بسرعة قتل الجراثيم مقارنة مع المضادات الحيوية التقليدية (Langham *et al*., 2008).

تعزل العديد من أنواع الببتيدات المضادة للجراثيم من مصادر مختلفة سواء النباتية او الحيوانية او من بعض الكائنات بدائية النواة، ويعد دم الثدييات من أفضل مصادر عزلها، إذ عزلت من كريات الدم البيضاء Leukocytes وخاصة العدلة Neutrophils في بعض هذه الحيوانات مثل الأبقار والأغنام والماعز والغزلان والخنازير وغيرها.

تقسم بصورة عامة حسب تركيبها وشحنتها إلى مجموعتين رئيسيتين وهما الببتيدات الموجبة Cationic Amps و الببتيدات السالبة Anionic Amps (Anderson *et al*., 2004)، وإن الأنواع الموجبة هي المجموعة الأكثر فعالية ضد الجراثيم المتنوعة والممرضة للإنسان والتي تضم عائلتين مهمتين وهما Defensins التي تكون غنية بالحامض الأميني Arginine و Cysteine وتحتوي على ثلاث أواصر ثنائية الكبريتيد وهي تقسم إلى عدة عوائل ثانوية حسب أشكالها وتراكيبها (Brogden, 2005).

العائلة الأخرى هي Cathelicidins التي تعد أيضاً عائلة مهمة من الببتيدات الموجبة لها عوائل ثانوية، تختلف عن Defensins في شكلها ولكنهما يتشابهان في امتلاكهما شحنة موجبة وقطبية Hydrophobic وكلاهما يؤثران بالآلية الأساسية نفسها من خلال الارتباط بالجدر الخلوية والأغشية البلازمية للجراثيم وتغيير تركيبها وهندستها وفقدان وظيفتها، (Zhao *et al*., 1995 ; Huttner *et al*., 1998)، أما المجموعة السالبة الشحنة من الببتيدات المضادة للجراثيم فتكون عادة أصغر بكثير من الببتيدات الموجبة وتخالفها في الشحنة وتضم أعداداً قليلة من الببتيدات التي تكون فعاليتها ضعيفة وغير واضحة ضد الجراثيم الممرضة (Brogden *et al*., 2003).

ونظرا لأهمية هذه الببتيدات المضادة للجراثيم بوصفها بدائل علاجية فعالة وعدم وجود دراسات محلية حولها فقد هدفت الدراسة الحالية إلى استخلاص هذه الببتيدات من كريات الدم البيضاء العدلة في دم بعض الحيوانات المحلية وهي الأبقار والأغنام ولأول مرة الجمال ودراسة تأثيرها المضاد تجاه عدد من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل

المواد

البكتريا المستخدمة

استخدمت أربع عزلات بكتيرية مرضية معزولة ومشخصة في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل، اثنان منها تعود لمجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام وهي *Staphylococcus aureus* (معزولة من إصابات الحروق) و *Enterococcus faecalis* (معزولة من بيئة المستشفى) واثنان منها تعود لمجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام وهي *Pseudomonas auroginosa* (معزولة من إصابات الجروح) و *E.coli* 0157: H7 (معزولة من حالات الإسهال الدموي)، تم التأكد من تشخيص هذه العزلات بأجراء الاختبارات الشكلية و الزرعية و الكيموحيوية الملائمة واعتمادا على (Collee *et al*., 1996; Koneman *et al*., 2006).

الحيوانات المستخدمة كمصدر للحصول على الببتيدات المضادة للجراثيم

استخدمت ثلاثة أنواع من الحيوانات المحلية في محافظة نينوى مصادر للحصول على الببتيدات المضادة للجراثيم، وهي الأغنام Sheep من الأغنام العواسية (*Ovis aries*)، الأبقار Bovine من الأبقار الشرابية (*Bos indicus*) و الجمال Camel من نوع ذو السنام الواحد (*Camelus dromedarius*).

الأوساط الزرعية المحضرة

استخدمت الأوساط التالية في تجارب حساسية البكتريا المدروسة تجاه Amps في طريقة الانتشار الشعاعي ذو الطبقتين Two-stage radial diffusion حضرت من مكوناتها الأساسية واعتمادا على (Shamova *et al*., 1999).

- الوسط A:

المكونات	التركيز غم/ لتر ماء مقطر
Agar	10
Trypticase soy broth	30
Sodium Phosphate	10

- الوسط B:

المكونات	التركيز غم/ لتر ماء مقطر
agar	10
Trypticase soy broth	60

ضبط الـ pH لكل من الوسطين A وB بين 7.2 – 7.4، وعقما بجهاز الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة121 ^{0} م وعند ضغط 15 باوند/ انج^2 ولمدة 15 دقيقة.

المضادات الحيوية

استخدمت الأقراص المجهزة من شركة Bioanalyse (Turkey) وبقطر (6) ملم و بالتراكيز المبينة في (الجدول 1):

الجدول 1: أنواع وتراكيز المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز/مايكروغرام
Cefotaxime	CTX	10
Ciprofloxacin	CIP	10
Erythromycin	E	10
Amikacin	AK	10
Ampicillin	AM	10
Amoxiclave	AMC	30
Piperacillin	PRL	30
Tetracycline	TE	30
Gentamicin	CN	30
Tobramycin	TOB	10

طرائق العمل

حساسية العزلات البكتيرية المدروسة تجاه المضادات الحيوية

أجري اختبار الحساسية للعزلات البكتيرية الأربعة قيد الدراسة تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المبينة في (الجدول 1)، وقد اتبعت طريقة Kirby-Bauer المحورة لهذا الغرض (Vandepitte *et al*., 2003).

استخلاص الببتيدات المضادة للجراثيم من دم الحيوانات

جمع الدم من الحيوانات قيد الدراسة:

جمع ما يقارب (300) مل من الدم الوريدي لكل حيوان، ومزج مباشرة مع محلول الـ Sodium Citrate المانع للتخثر بنسبة 4:1 من الدم ورُج جيداً لمنع تخثر الدم لحين استخدامه في التجارب اللاحقة (Ghai , 2005).

عزل واستخلاص الـببتيدات المضادة للجراثيم من كريات الدم البيضاء

استندت طريقة العمل إلى (Shamova *et al*., 1999; Treffers *et al*., 2005)، حيث تم عزل واستخلاص الـ Amps من كريات الدم البيضاء لكل من الحيوانات المدروسة وكما يلي:

- حللت كريات الدم الحمراء من خلال معاملة عينات الدم بمحلول Ammonium Chloride الذي أضيف إلى الدم بنسبة 1:3 ومزج جيداً.
- جمعت كريات الدم البيضاء بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد (Germany/Hettich) عند درجة حرارة 4 م° وسرعة 700 دورة/ الدقيقة ولمدة 15 دقيقة.
- وضع الراسب في محلول الملح الفسلجي الدارئ المحور (PBSX) Modified Phosphate Buffer Saline.
- عومل الراسب بجهاز الترددات فوق الصوتية Sonicater لغرض تفجير الخلايا لحين الحصول على محلول رائق في الأنبوبة لتحرير وإطلاق الحُبيبات الموجودة داخل خلايا العدلة Neutrophils granules.
- عومل المحلول بجهاز الطرد المركزي المبرد عند درجة حرارة 4 م° وسرعة 27000 دورة/ الدقيقة ولمدة 40 دقيقة ، لجمع حبيبات خلايا العدلة.

- وضع الراسب في حامض الخليك 10 % ومزج جيداً في درجة حرارة 4 م° إلى اليوم الثـاني Over night لاسـتخلاص وعزل الببتيدات المضادة للجراثيم Amps من تلك الحبيبات.
- عُومل المحلول مرة ثانية بجهاز الطرد المركزي المبرد (27000 دورة/ الدقيقة ولمدة 20 دقيقة / 4 م°)، وجمع الراشـح الحاوي على الببتيدات المضادة للجراثيم.

تنقية الـببتيدات الموجبة المضادة للجراثيم باستخدام تقنية التبادل الأيونيIone-exchange chromatography :

نُقيت الببتيدات المضادة للجراثيم الموجبة الشحنة من محلول لـ Amps الذي تم الحصول عليه في الفقرة السابقة، حيث استخدمت تقنية التبادل الأيوني لهذا الغرض واستنادا إلى (Treffers *et al.*, 2005)، وكما يلي:

- مُلئ عمود الفصل المستخدم في هذه التقنية بمادة Amberlite resin IRC-50 (H) ونشطت بـ Nacl بتركيز 20 %.
- وضع محلول لـ Amps في عمود الفصل، لتتم عملية التبادل ألايوني والتجاذب اعتماداً على اختلاف الشحنات بين المواد.
- أضيفت مادة الـ Ammonium acetate (25mM) لغسل وإزالة المواد غير الموجبة فـي الخلـيط Non-cationic molecules، وكُررت العملية مرتين للتأكيد.
- غسل عمود الفصل بحامض الخليك 10% للحصول على الببتيدات الموجبة وتنقيتها، وكررت العملية مرتين للتأكيد .
- جفف محلول الببتيدات الموجبة الناتج بجهاز التجفيد الـ Lypholizer (Germany/Christ) وحفظ لحين الاستخدام .

فصل الببتيدات الموجبة بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء – الطور المعاكس (Reversed-Phased-(RP-HPLC High-Performance Liquid Chromatography :

اجري العمل في قسم الكيمياء/ كلية العلوم/ جامعة الموصل أجريت طريقة العمل بالاعتماد على (Selsted *et al.*, 1993; Shamova *et al.*, 1999)، وتم فصل الببتيدات الموجبة المستخلصة من دم الحيوانات المدروسة، وباستخدام جهاز الـ HPLC (Japan /Shimadzu-2010 A) ذو عمود فصل من نوع وحجم R.P. C18 Column. وبطور ثابت (Stationary Phase) غير قطبي، وطور متحرك (Mobile Phase) قطبي، وبنسبة متدرجة من (1-60%) من Acetonitrile و (0.1 %) من Trifluoroacetic acid (TFA)، وماء مقطر.

تأثير الـببتيدات الموجبة على البكتيريا المدروسة:

درس تأثير الـ Amps الموجبة المضاد للجراثيم والتي تم استخلاصها من مصادرها المختلفة تجاه أربعة أنـواع مـن البكتريا المدروسة واستندت طريقة العمل إلى (Selsted *et al.*, 1993)، المحدثة التي استخدمت فيها طريقة الانتشار الشعاعي ذي الطبقتين Two-stage radial diffusions للباحث (Lehrer *et al.*, 1991)، وتلخص الطريقة كالآتي:

- نشطت البكتيريا بزرعها على وسط Trypticase Soy broth (TSB) وحضنت لمدة 18-24 ساعة للحصول على نمو في الطور اللوغارتمي.
- مزج (1) مل من معلق البكتيريا الذي يحتوي بحدود (1.5×10^8) خلية/ مل مع (10) مل من الوسط A المبرد وترك ليتصلب في طبق زجاجي ثم عملت حفر في طبقة الوسط المتصلب بقطر (4-mm) بواسطة ثاقبة فلين.
- أخذ 1غم من مسحوق Amps الموجبة وأذيب في 10 مل محلول حامض الخليك acetic acid 0.01% ووضع (5 µl) من هذا المحلول في كل حفرة، وحضنت في درجة 37 م° ولمدة 3-4 ساعات.
- بعد ذلك، أضيف (10) مل من الوسط B كطبقة عليا وتركت لتتصلب.
- حضنت الأطباق لمدة 18-24 ساعة وبدرجة 37م°.
- لوحظت مناطق التثبيط وسجلت.

النتائج والمناقشة

مقاومة العزلات البكتيرية المدروسة تجاه المضادات الحيوية

الجدول (2) نتائج حساسية العزلات البكتيريـة الأربعـة قيـد الدراسـة *Stapylococcus aureus* ، *Enterococcus Pseudomonas aeruginosa, faecalis* ، *E.coli: 0157: H7* تجاه مجموعة من المضادات الحيوية، حيث يلاحظ تباين هذه العزلات في نمط مقاومتها لهذه المضادات.

فقد أظهرت عزلة جرثومة *Stapylococcus aureus* مقاومة مطلقة لجميع المضادات الحيوية المدروسـة وأن عزلـة جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* كانت مقاومة لكل هذه المضادات عدا مضادين حيويين همـا (Tetracycline and Amikacin) ، أما بكتريا *E.coli* 0157:H7 فقد أظهرت مقاومة لمعظم المضادات وكانت حـساسة لثلاثـة منهـا وهـي Tobramycin و Tetracycline و Gentamicin بينما أظهرت بكتريا *Enterococcus faecalis* مقاومة لخمسة مضادات حيوية وهـي Amikacin و Ampicillin وmoxiclav و Cefotaxime و Piperacillin فيمـا كانـت حـساسة تجـاه المضادات Ciprofloxacin و Erythromycin و Getamicin و Tetracycline و Tobramycin.

بصورة عامة يلاحظ من خلال هذه النتائج ان البكتريا المدروسة اظهرت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، ويعد ظهور البكتريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية التقليدية الشائعة مشكلة صحية خطيرة وتحدي كبير للمختصين في هذا المجال، حيث ازدادت هذه المشكلة بشكل كبير وسريع خلال العقود الأخيرة مع انخفاض في عدد المضادات الحيوية الجديدة المكتشفة وزيادة الحاجة للبدائل ومن بينها البتيدات المضادة للجراثيم، (Sergio and Gloria, 2003 ; Oliveira *et al*., 2011).

الجدول 2: حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضادات الحيوية المدروسة (قطر التثبيط بالملم)

E.coli 0157: H7	***Pseudomonas aeruginosa***	***Enterococcus faecalis***	***Staph. aureus***	**البكتيريا / المضادات**
R	R	R	R	Cefotaxime
R(7)	R(9)	S(25)	R	Ciprofloxacin
R	R	S(25)	R	Erythromycin
R	S(24)	R	R	Amikacin
R	R	R	R	Ampicillin
R	R	R	R	Amoxiclave
R	R	R	R	Piperacillin
S(20)	S(21)	S(22)	R	Tetracycline
S(19)	R	S(30)	R	Gentamycin
S(22)	R(9)	S(20)	R	Tobramycin

(R) مقاومة / (S) حساسة

نتائج تنقية وفصل البتيدات الموجبة من دم الحيوانات المدروسة

اجري في هذه الدراسة اختيار البتيدات الموجبة وذلك لأهمية هذا النوع من البتيدات المضادة للجراثيم ودورها الفعـال في قتل العديد من الأحياء المجهرية المرضية مقارنة مع الأنواع الأخرى من هذه البتيـدات الموجـودة فـي دم الحيوانـات

المختلفة، كما إن البيتيدات الأخرى غير الموجبة Non-cationic Peptides تكون أقل تأثيراً وأهمية في المجال الجرثومي و أقل عدداً وتنوعاً،(Brogden *et al*., 2003; Anderson *et al*., 2004).

نُقيت البيتيدات الموجبة من خلايا الدم البيضاء في دم الحيوانات قيد الدراسة باستخدام تقنية التبادل الأيوني بهدف الحصول على هذه البيتيدات فقط من بين البيتيدات الأخرى، اذ تعتمد هذه التقنية على مبدأ التبادل الأيوني وعمليات التجاذب والالتصاق المعاكسة بين مكونات المادة المعزولة مع المواد المستخدمة في عمود الفصل وحسب الشحنة وقوتها، وقد استخدمت هذه التقنية من قبل الباحثين في مجال عزل وتنقية البيتيدات من دم الحيوانات المختلفة (Anderson and Yu, 2003 ; Treffers *et al*., 2005) .

استخدمت تقنية الـ RP-HPLC لغرض فصل مكونات البيتيدات الموجبة التي تم عزلها وتنقيتها في المراحل السابقة من الدراسة ولإعطاء فكرة عن عدد وأنواع البيتيدات التي يتضمنها محلول البيتيدات الموجبة من مصادر الدم المختلفة المستخدمة في هذه الدراسة.

فيما يتعلق بالبيتيدات الموجبة المعزولة من دم الاغنام، يوضح الشكل (1) أن هناك عددا من قمم الامتصاصية (Peaks) التي تعود الى محلول هذه البيتيدات، والتي قد تمثل الأنواع المختلفة من البيتيدات الموجبة المتواجدة في هذا المحلول، اذ يلاحظ وجود (6) أنواع من البيتيدات الموجبة تختلف عن بعضها في زمن الاحتباس, والنسبة المئوية لمساحتها وارتفاعها، أكبرها في زمن احتباس (2.353) دقيقة وبنسبة مئوية للارتفاع (47.135 %) وبنسبة مئوية للمساحة (40.658 %)، وأصغرها الذي ظهر في زمن الاحتباس (0.369) دقيقة وبنسبة مئوية للارتفاع (1.771 %) وبنسبة مئوية للمساحة (0.968 %).

أوضحت دراسة (Shamova *et al*., 1999) إمكانية الحصول على البيتيدات المختلفة الموجبة المعزولة من دم الأغنام وفصلها، وباستخدام تقنية الـ HPLC، اذ بينت هذه الدراسة وجود عدة قمم امتصاص، بما فيها قمة امتصاص عظمى من مجموع القمم التي ظهرت، كانت تمثل البيتيد OaBac5a، حيث تم تنقيته ومعرفة تسلسل مكوناته الأساسية، وقدرت كتلته بـ 5539.7 Da، ويشفر بواسطة جين متخصص, وكان لهذا البيتيد قابلية واضحة في قتل العديد من البكتريا المرضية للإنسان.

كما أكدت دراسة (Anderson and Yu, 2003) إمكانية فصل مجموعة من قمم امتصاص، وذلك من خلال معاملة المحلول الموجب المعزول من كريات الدم العدلة للأغنام بتقنية الـ HPLC، حيث ظهرت (7) ببتيدات، وتم دراسة أحداها ومعرفة مكوناته الأساسية وتسلسله، وبيان تأثيره الفعال ضد العديد من الأحياء المجهرية.

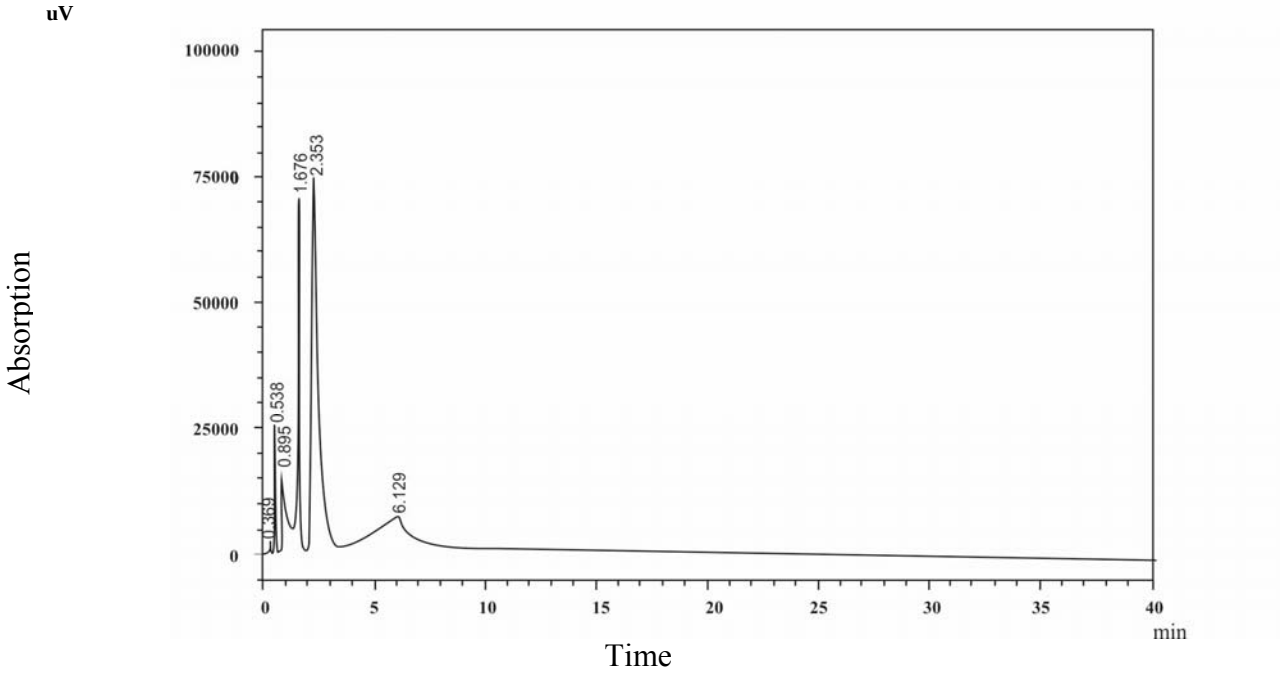
أما بالنسبة للبيتيدات الموجبة المعزولة من دم الأبقار، فيلاحظ من الشكل (2) ظهور عدد من القمم الامتصاصية في محلول هذه البيتيدات والتي قد تمثل الأنواع المختلفة من البيتيدات الموجبة، اذ يلاحظ وجود (7) أنواع من هذه البيتيدات التي اختلفت عن بعضها في أزمان احتباسها والنسب المئوية للارتفاع والمساحة، كان أكبرها الذي ظهر في زمن احتباس (4.890) دقيقة وبنسبة مئوية للارتفاع (42.557 %) ونسبة مئوية للمساحة (53.776 %)، وأصغرها في زمن احتباس (2.660) دقيقة، وبنسبة مئوية للارتفاع قدرت بـ (1.079 %) ونسبة مئوية للمساحة (0.373 %).

حيث تؤكد نتائج دراسة (Selsted *et al*., 1993) على دم الأبقار إمكانية الفصل والحصول على البيتيدات الموجبة فيها، وتم الحصول على عدة قمم امتصاص من المحلول البيتيدي المعزول من خلايا العدلة في دم الأبقار، فقد ميزت هذه الدراسة مجموعةβ-defensins وهي من البيتيدات المهمة المتواجدة في دم الأبقار وكان عدد قمم الامتصاص بحدود (13) قمة مفصولة عن بعضها البعض، وسميت هذه القمم بـ BNBD 1-13، حيث كل BNBD هو ببتيد مفصول بزمن احتباس معين، كما درس حجم كل ببتيد ومكوناته الأساسية من الأحماض الامينية، والفروقات بين هذه البيتيدات، وكان لهذه المجموعة من البيتيدات فعالية واضحة في القضاء على أنواع مختلفة من البكتريا المرضية للإنسان كما أكدت دراسة (Tang and Selsted, 1993) وجود هذا النوع من البيتيدات.

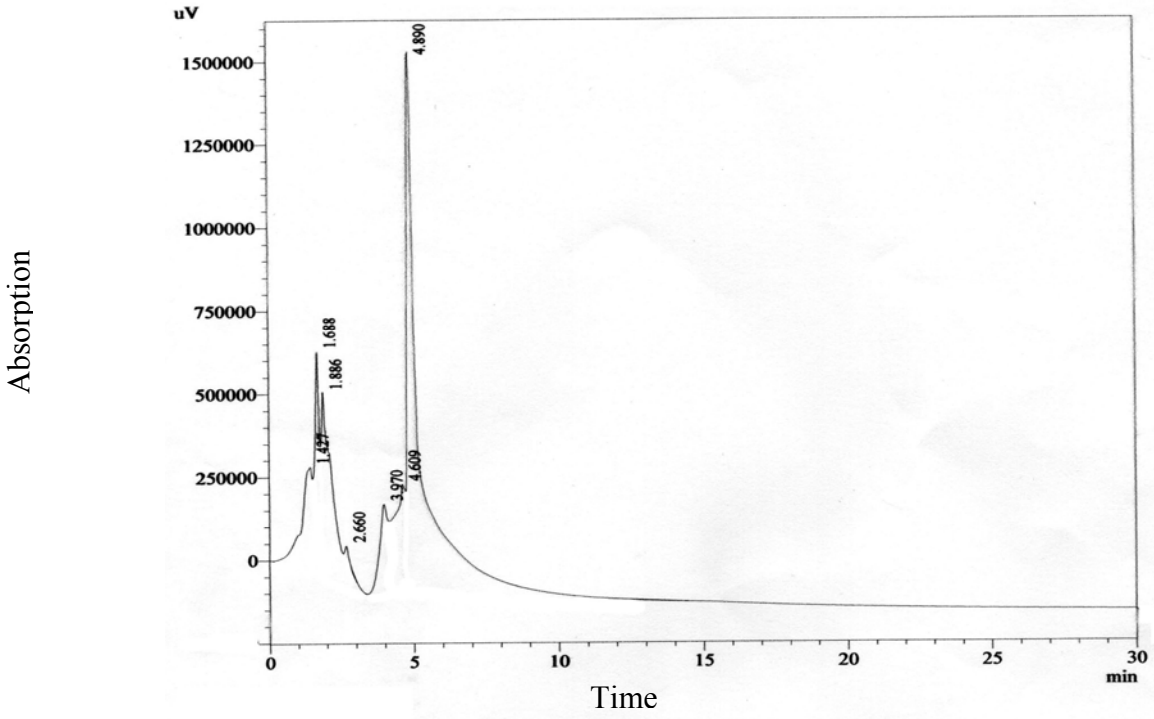
أما فيما يتعلق بالببتيدات الموجبة المعزولة من الخلايا العدلة لكريات الدم البيضاء من دم الجمال فتوضح النتائج في الشكل (3) إن هناك عددا كبيرا من قمم الامتصاصية، والتي تعود إلى محلول هذه الببتيدات التي يمكن أن تمثل الأنواع المختلفة من الببتيدات الموجبة المتواجدة في المستخلص الذي عزل من دم هذا الحيوان اذ يلاحظ وجود (21) قمة امتصاص أو نوع ببتيدي من أنواع الببتيدات الموجبة التي اختلفت عن بعضها في زمن احتباس كل نوع، والنسبة المئوية للارتفاع وللمساحة أكبرها الذي ظهر في زمن احتباس (1.523) دقيقة، وبنسبة مئوية للارتفاع (26.281 %) ونسبة مئوية للمساحة (22.077 %)، والذي تميز عن الببتيدات الموجبة الأخرى التي ظهرت في هذا المحلول، وكان أصغرها الذي ظهر في زمن احتباس (11.028) دقيقة، وبنسبة مئوية للارتفاع (0.018 %) ونسبة مئوية للمساحة قدرت بـ (0.017 %).

وبالمقارنة مع عدد الببتيدات الأخرى المفصولة من دم الأبقار والأغنام بتقنية HPLC يلاحظ أن عدد هذه الببتيدات المعزولة من دم الجمال كانت أكثر عدداً، مع ملاحظة الاختلافات في الخصائص المتعقلة بزمن الاحتباس والنسبة المئوية للارتفاع والمساحة وإن ظهور هذا العدد من هذه الببتيدات التي عزلت من خلايا العدلة لدم هذا الحيوان، قد يعزى إلى فسيولوجية الجمل، وبيئته التي يعيش فيها والتي قد تعكس تطور مناعته, وآليات مقاومته للأحياء المجهرية المرضية، إذا ما أخذنا بنظر الاعتبار إن هذه الببتيدات معزولة من خلايا الدم البيضاء ذات الوظيفة الدفاعية في الجسم.

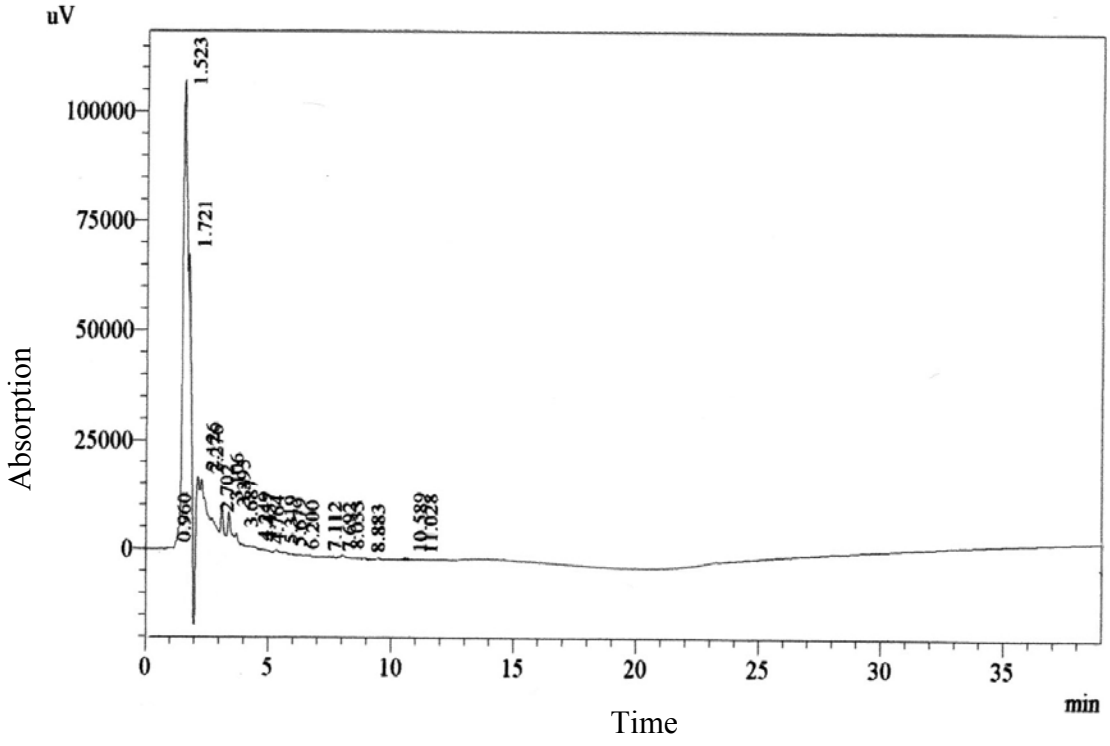
كما يلاحظ بأن الببتيدات في الأغنام والأبقار متقاربة العدد، وهذا ما أكدته دراسة (Huttner *et al*., 1998; Anderson *et al*., 2004) في وجود تشابهات بين هذه الببتيدات المتواجدة في دم الأغنام والأبقار، حتى فيما يتعلق بالجين المشفر لهذه الببتيدات، والتي تشابه أيضاً الببتيدات في الماعز والفأر، كما أوضحت نتائج دراسة (Travis *et al*., 2000) وجود هذه التشابهات في الببتيدات المضادة للجراثيم في كثير من الحيوانات الثديية ومنها الأغنام والأبقار.



الشكل 1 : قمم الامتصاصية للببتيدات الموجبة المعزولة من دم الأغنام باستخدام جهاز الـ HPLC



الشكل 2: قمم الامتصاصية للببتيدات الموجبة المعزولة من دم الأبقار باستخدام جهاز الـ HPLC



الشكل 3: قمم الامتصاصية للببتيدات الموجبة المعزولة من دم الجمال باستخدام جهاز الـ HPLC

تأثير الببتيدات الموجبة المعزولة من دم الحيوانات المدروسة على بعض البكتريا المرضية:

استخدمت طريقة الانتشار ألشعاعي بالطبقتين Two-stage radial diffusion لحساسيتها وأهميتها في دراسة التـأثير التثبيطي للببتيدات الموجبة المعزولة من مصادر الدم الحيوانية المختلفة تجاه أربعة أنواع من البكتريـا المرضـية المعروفـة بمقاومتهـا للمـضادات الحيويـة وهـي: *Enterococcus faecalis* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و*E.coli 0157:H7* حيث يلاحظ من خلال النتائج في (الجدول 3)، والـصورة (1) أن الببتيـدات الموجبـة المعزولة من مصادر الدم الحيوانية المختلفة كانت لها فعالية مضادة واضحة تجاه أنواع البكتريا المدروسة وبـصورة متباينـة رغم مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية. اذ تمتلك هذه الببتيدات الشحنة الموجبة التي تتفاعل وتستقطب مع الأغشية والجـدر الخلوية البكتيرية ذات الشحنة السالبة فضلاً عن وجود مستقبلات خاصة لهذه الببتيدات على الجدران البكتيرية، وبالتالي يـؤدي هذا الارتباط والتفاعل إلى حدوث خلل وتغييرات كبيرة في تركيب وهندسة جدران البكتريا وأغشيتها مما يؤدي إلـى موتهـا، بالإضافة إلى ميكانيكيات التأثير الأخرى لهذه الببتيدات (Pelegrini *et al*., 2001) .

الجدول 3: التأثير التثبيطي لأنواع الببتيدات الموجبة المختلفة تجاه البكتريا المرضية المدروسة (قطر التثبيط بالملم)

E. coli 0157:H7	***Pseudo. aeruginosa***	***Entrococcus faecalis***	***Staph.aureus***	**البكتريا / مصدر الببتيد**
8	10	20	25	الأغنام
10	9	21	22	الأبقار
15	11	27	26	الجمال

يلاحظ بصورة عامة إن تأثير هذه الببتيدات كان أكثر فعالية في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقارنة بالسالبة لصبغة كرام، ففي حالـة الببتيـدات الموجبـة المعزولـة مـن دم الأغنـام يلاحـظ أنهـا أثـرت بـصورة أكبـر فـي بكتريـا *Enterococcus faecalis* and *Staph.aureus* بأقطار تثبيط (25) و (20) على التوالي، مقارنة بنوعي البكتريا السالبة.

وتؤكد الدراسات على فعالية هذا النوع من الببتيدات المعزولة من دم الأغنام تجاه البكتريا التي تميزت بمقاومتها العاليـة للمضادات الحيوية، حيث أوضحت تأثير أنواع الببتيدات الموجبة المعزولة من كريات الدم البيضاء من الأغنام فـي البكتريـا *E.coli* و *Staph.aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* وفي أنواع بكتيرية أخرى وكذلك فـي الـ *Candida albicans*. (Travis *et al*., 2000 ; Brogden *et al*., 2003; Treffers *et al*., 2005).

كما أوضح (Collee *et al*., 1996) بأن الببتيد Bac5 وهو من الببتيدات الموجبة المعزولة من دم الأغنام كان له تأثير كبير في أنواع متعددة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام، مثل *Staph. aureus* وتأثير قليل في البكتريا السالبة لصبغة كـرام، وهذا ما يتفق مع نتائج دراستنا.

وبالعودة إلى النتائج في (الجدول 3) يلاحظ أن الببتيدات المعزولة من دم الأبقار قد تباينت كذلك في تأثيرها فـي نمـو البكتريا المدروسة، وإن أعلى تأثير لها كان في حالـة بكتريـا *Staph.aureus* بقطـر تثبـيط (22) ملـم، تلاهـا بكتريـا *Entrococcus faecalis* بقطر تثبيط (21) ملم، وإن البكتريا السالبة هي الأقل تأثراً.

وتؤكد العديد من الدراسات على أهمية هذه الببتيدات وتأثيراتها المضادة للجراثيم، حيث أوضحت دراسات (Selsted *et al*., 1993; Tang and Selsted, 1993) إن الببتيدات الموجبة المعزولة من الخلايا العدلة من دم الأبقار كان لها دور مهم وقاتل ضد العديد من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام، من خلال تفاعلها مع طبقة الببتيدوكلايكان في جدار البكتريا، حيث كان لمجموعة ببتيدات β-defensins العائدة للببتيدات الموجبة تأثير كبير في بكتريا *Staph.aureus* و *E.coli*.

وكذلك أوضحت دراسات أخرى بأن هناك العديد من الببتيدات التي يمكن عزلها من خلايا العدلة لدم الأبقار ومنها ببتيدات Bac-7 and Bac-5 كان لهما دور قاتل وفعال ضد العديد من البكتريا المرضية مثل *E.coli* و *Staph.aureus* و *Pseudo.aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* و *Proteus vulgaris* من خلال الميكانيكيات المختلفة لهذه الببتيدات، (Romeo *et al*., 1988 ; Gennaro *et al*., 1989)

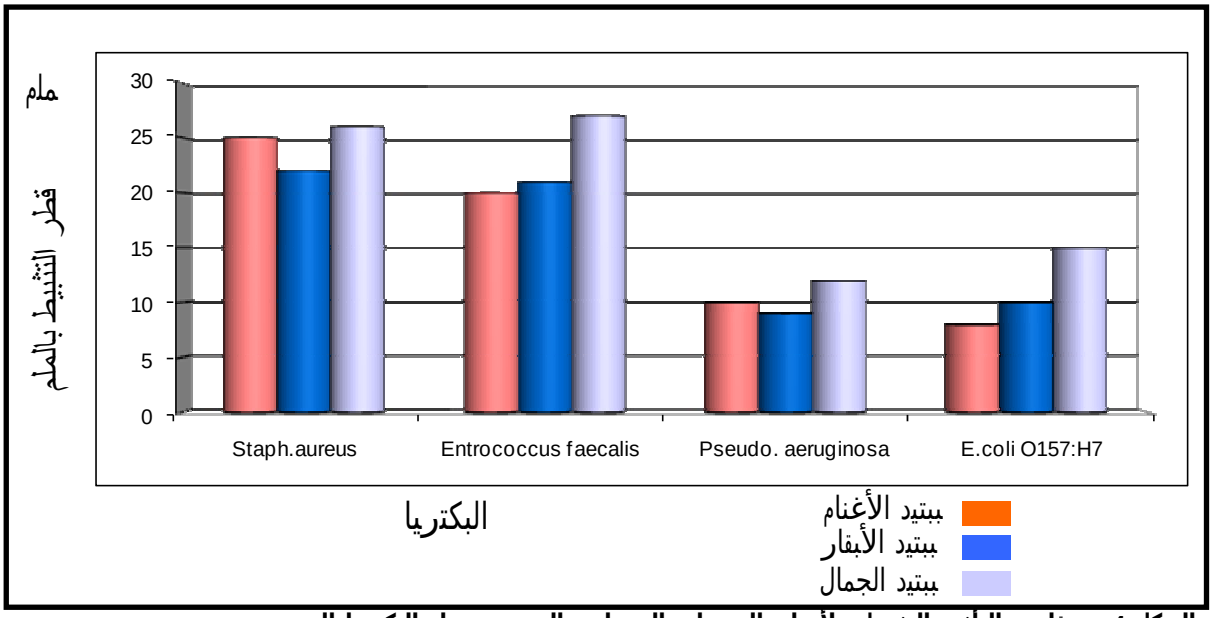
أما بالنسبة للببتيدات الموجبة المعزولة من دم الجمال فيلاحظ أنه كان لها تأثير مميز في جميع الأنواع البكتيرية المدروسة، وخصوصاً في البكتريا الموجبة لصبغة كرام وبأقطار تثبيط (26) و (27) ملم لبكتريا *Staph.aureus* و *Entrococcus faecalis* على التوالي.

يلاحظ من خلال الشكل (4) الذي يوضح مقارنة تأثير الببتيدات الحيوانية الثلاثة المدروسة (الأغنام، الأبقار، الجمال) بصورة عامة على كل نوع من الأنواع البكتيرية الأربعة قيد الدراسة ان تأثير هذه الببتيدات الحيوانية الثلاثة في البكتريا الموجبة لصبغة كرام كان أكبر وأكثر فعالية، مما هو علية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام. وقد يعود سبب ذلك إلى الاختلاف بين جدار البكتريا الموجبة لصبغة كرام وجدار البكتريا السالبة لصبغة كرام، ولكون تأثير هذه الببتيدات بصورة أساسية على الجدر والأغشية الخلويه للبكتريا.

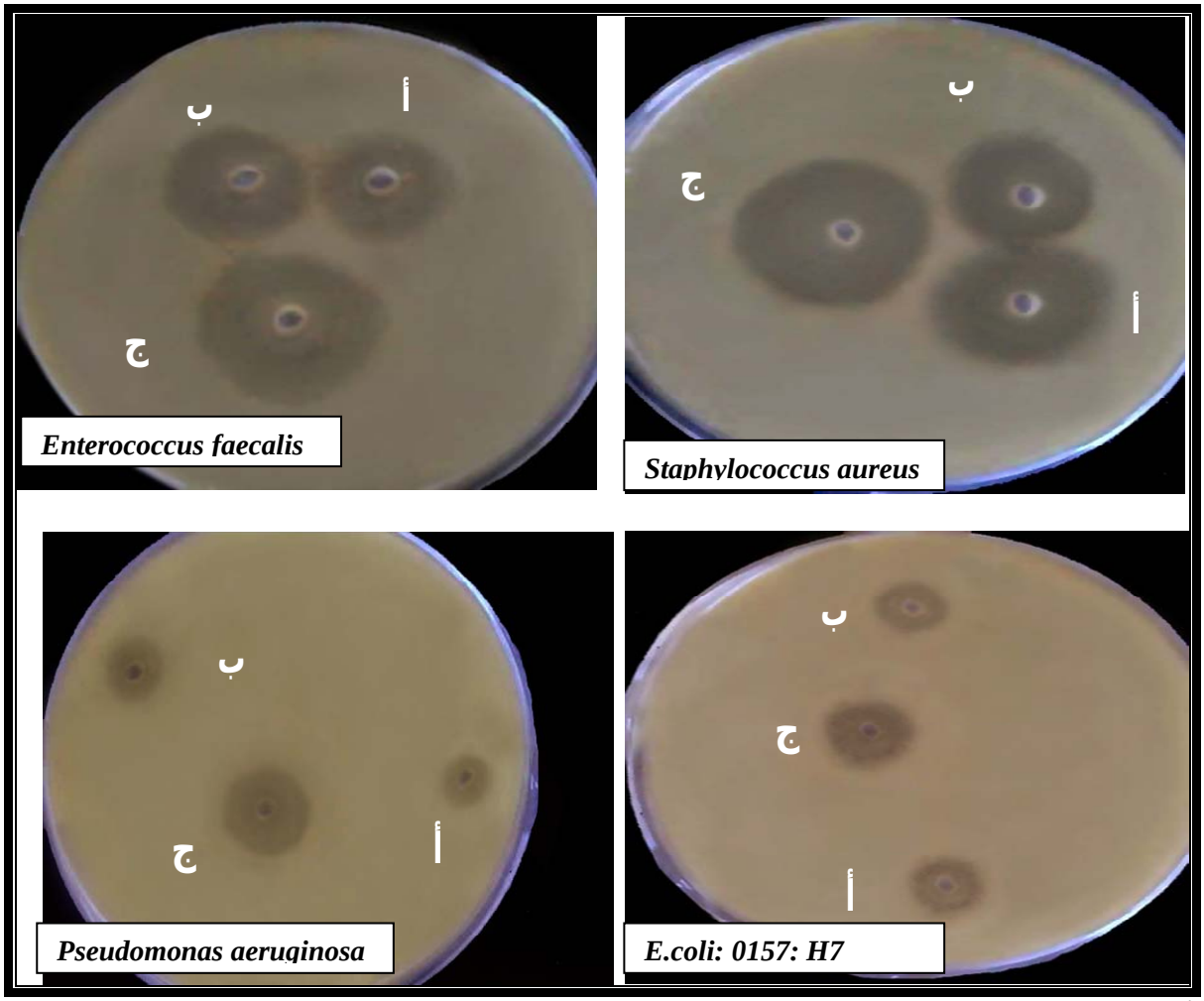
كما يلاحظ بأن الببتيد المعزول من الجمال كان من أكفا وأفضل الأنواع الببتيدية الحيوانية الثلاثة المدروسة، حيث يلاحظ تأثيره بصورة كبيرة وفعالة وبمستويات عالية وأقطار تثبيط كبيرة ضد كل الأنواع البكتيرية المدروسة الموجبة والسالبة لصبغة كرام وان زيادة تأثير الببتيدات الموجبة المعزولة من دم الجمال قد يكون بسبب زيادة عدد هذه الببتيدات في دم الجمال، حيث تم فصل ما يقرب من (21) قمة امتصاص مختلفة الأزمان والارتفاع والمساحة، فضلا عن فسلجية هذا الحيوان المختلفة عن الحيوانات المدروسة الأخرى.

و كان تأثير الببتيدين المعزولين من الأغنام والأبقار بمستوى متقارب إلى حد ما ضد جميع الأنواع البكتيرية الأربعة المدروسة، وقد يكون السبب ما ذكرته بعض المصادر في تشابه هذه الببتيدات في عملها وأنواعها إلى حد كبير، (Brogden *et al*., 2003 ; Wang , 2010). فضلا عن عدد قمم الامتصاص المتقاربة للببتيدات المعزولة من كليهما في هذه الدراسة، حيث ظهر (6) قمم امتصاص من ببتيدات الأغنام و(7) قمم امتصاص من ببتيدات الأبقار.

إن نتائج هذه الدراسة تعد مهمة جداً إذا ما أخذنا بنظر الاعتبار الأهمية المرضية للبكتريا المدروسة وانتشار سلالاتها المقاومة للعلاجات وبالتالي إمكانية طرح هذه الببتيدات كبدائل علاجية فعالة للسيطرة على الأمراض المرتبطة بهذه البكتريا وغيرها، بعد إجراء الدراسات العلاجية الملائمة حولها بما يضمن استخدامها الأمين والفعال.



الشكل 4 : مقارنة التأثير التثبيطي لأنواع الببتيدات الحيوانية الموجبة تجاه البكتريا المدروسة



(أ) ببتيد الأغنام / (ب) ببتيد الأبقار / (ج) ببتيد الجمال

الصورة 1: التأثير التثبيطي لأنواع الببتيدات المعزولة تجاه البكتريا المدروسة

المصادر

Anderson, R.C. ; Yu, P. (2003). Isolation and characterization of proline/ arginin-rich chathelicidin peptides from ovine neutrophils. *Bioch. Bioph. Res. Comm .,* **321**(13), 1139- 1146.

Anderson, R.C.; Wilkinson, B.; Yu, P. (2004). Ovine antimicrobial peptides, new products from an age-old industry. *Aust. J. Agr. Res.,* **55**(1), 96-75.

Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat. Rev. Microb.*, **3**(3), 238-250.

Brogden, K.A.; Ackermann, M.; McCray, P.B.; Tack, B.F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. *J. Intern. Antimicrob. Agents.,* **22**(5), 465-478.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P.; Simmon, A. (1996). "Practical Medical Microbiology". 14th ed., Churchill Livingstone, Inc., New York.

Epand, R.M.; Epand, R.F. (2010). "Biophysical Analysis of Membrane-targeting Antimicrobial Peptides: Membrane Properties and the Design of Peptides Specifically Targeting Gram-negative Pacteria". Advances in molecular and cellular microbiology 18. University of Nebraska Medical Center Omaha, Nebraska, USA. pp. 116-126.

Gennaro, R.; Skerlava, J.B.; Romeo, D. (1989). Purification, composition and activity of two bactenecins, Antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect. Immuni.,* **57**, 3142-3146.

Ghai, C.L. (2005). "A text book of practical physiology". 6th ed. Jaypee brothers-medical publishers (P) LTD, New Delhi, India. 1-25p.

Huttner, K.M.; Lambeth, M.R.; Burking, H.R.; Burkin, D.J.; Broad, T.E. (1998). Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes. *Gene.* **206**(1), 85-91.

Koneman, E.W.; Allen, S.P.; Janda, W.C. (2006). "Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology". 6th ed. Lippincott-Willams and Wilkins publishers, Philadelphia, USA.

Langham, A.A.; Ahmad, S.A.; Kaznessis, Y.N. (2008). On the nature of antimicrobial activity: A model for Protegrin- 1 pores. *J. Am. Chem. Soc.,* **130**(13), 4338-4346.

Lehrer, R.I.; Rosenman, M.; Harwing, S.S.L.; Jackson, R.; Eisenhauer, P. (1991). Ultra sensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*., **137**,167-173.

Oliveria, S.M.S.; Falcao-Silva, V.S.; Siqueira-Junior, J.P.; Costa, M.J.D.; Dinix, M.D.F. (2011). Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by extract of mango (*Mangifera indical L*., Anacardiaceae) peel. *Rev. Bras. Farmac*., **21**(1), 1-5.

Pelegrinl, P.B.; Del Sarto, R.P.; Silva, O.N.; Franco, O.L.; Grossi, M.F. (2011). Antibacterial peptides form plants: What they are and how they probably work. *Bioch. Res. Intern*., **9**, 1155.

Romeo, D.; Skerlava J.B.; Bolognesi, M.; Gennaro, R. (1988). Structure and bactericidal activity of an antibiotic peptide purified from bovine Neutrophils. *J. Bio. Chem*., **263**(20), 9573-9675.

Selsted, M.E.; Tang, Y.; Morris, W.; McGure, P.A.; Novotny, M.J.; Smith, W.; Henschen, A.H.; Cullor, J.S. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of B-defensins, anew family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem*., **268**(9), 6641-6648.

Sergio, H.M.; Gloria A. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biotechnol.,***19**, 271-282.

Shamova, O.; Brogden, K.A.; Zhao, H.; Nguyen, T.; Kokryakov, V.N.; Lehrer, R. (1999). purification and properties of proline-Rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect. Immun*., **67**(8), 4106-4111.

Tang, Y.; Selsted, M.E. (1993). Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial B-defensin peptide from bovine neutrophils. *J. Bio. Chem.*, **268**(9), 6649-6653.

Travis, S.M.; Anderson, N.N.; Forsyth, W.R.; Espiritu, C.; Conway, B.D.; Lehrer, R.I.; Welsh, M.J.; Tack, B.F. (2000). Bactericidal activity of mammalian cathelicidin- derived peptides. *Infection and Immunity*., **68**(5), 2748-2755.

Treffers, H.; Chen, L.; Anderson, R.C.; Yu, P. (2005). Isolation and characterization of antimicrobial peptides from deer neutrophils. *J. Intern. Antimicrob Agent*., **26**(2), 165-169.

Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P.; Heuk, C.C. (2003). "Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology". World Health Organization. Geneva.

Wang, G. (2010). "Antimicrobial Peptides Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies". Advances in molecular and cellular Microbiology 18. University of Nebraska Medical Center Omaha, Nebraska, USA. pp. 1-21.

Zhao, C.; Ganz, T.; Lehrer, R.I. (1995). Structure of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptide: Prophenin-2 and PR-39. *Letters.*, **376**(3), 130-134.