دور حامض اللايبوتكوك المنقى جزئيا من بكتريا E.faecalis المعزولة محليا في الالتصاق

خمائل لطفي شاكر، مي طالب فليح و لينة عبد الكريم
قسم علوم الحياة، جامعة بغداد، كلية العلوم.

الخلاصة

اختبرت قابلية العزلة *E.faecalis* U12 في الالتصاق في الخلايا الطلائية الطلائية البولية، فتبين ان البكتيريا تلتصق بمعدل 81.25 خلية بكتيرية/ خلية طلائية، وعند اختبار دور الـــلايبوتكوك المنقى جزئيا في الالتصاق لوحظ انه يثبط الالتصاق عند تركيز 400 مايكروغرام/ مليلتر بنسبة 8.5 % و عند تركيز 500 مايكروغرام/ مليلتر بنسبة 10%، مما يشير الى ان الـــ LTA لا يلعب دوراً رئيسياً في التصاق بكتريا *E.faecalis* و في حالة الخلايا المعاملة مسبقاً بتركيز 500 مايكروغرام/ مليلتر من dLTA لم يتم الحصول على اي فعل تثبيطي للالتصاق، مما يشير الى دور الجزء الشحمي للـــ LTA في عملية الالتصاق.

الكلمات المفتاحية: الااللتصاق، حامض اللايبوتكوك، طلائية، العزلة U12.

المقدمة

يعرف الـــ Lipoteichoic acid بأنه حامض التكويك المرتبط بشحوم الغشاء، وهو الجزء المقابل للـــ Lipopolysacchride للبكتيريا السالبة لملون ك رام، المكون من بوليمر من تكرار وحدات Glycerol-Phosphate مرتبط عرضيا بوساطة أصرة 1-3 Phosphdiester، يقترب LTAللمكورات المعوية بما فيه الكفاية من سطح الخلية حتى نهايتها البعيدة ليعمل كمستضد لهذه المجموعة المصلية (مجموعة D)، اذ يحفز تكوين أضداد IgM، وIgG، وIgA [1،2].

يعد الـــ LTA عاملا " محفزا " للاستجابة الالتهابية للمضيف و من ثم دوره في الصدمة الأنتانية للبكتيريا الموجبة لملون كرام ، كما يمتلك الـــ LTA القدرة على الأرتباط بالخلايا المناعية و من ثم أنتاج Interleukines، وTNF α، و IFN γ، و Nitric Oxide [3،4]. يعمل الـــ LTA تأزريا مع الببتيدوكلايكان كعامل محفز للاستجابة الالتهابية للمضيف ، و ينتج عنها صدمة و فشل وظيفي للعديد من الأعضاء [5،6]. كما يمتلك الـــ LTA القدرة على تنشيط المتمم بالطريقه التقليدية و الطريقة البديلة [7].

يمتاز الـــ LTA بألفته العالية تجاه أغشية الخلايا، أذ يرتبط الـــ LTA بمختلف خلايا اللبائن بوساطة الجزء الشحمي، من الممكن أن يسبب الـــ LTAالتهاب نبيبات الكلية، و التهاب المفاصل في الحيوانات المختبرية بوساطة الارتباط بأغشية الانسجة و تحسين التفاعل الالتهابي الموضعي السام [8،9]. لهذا هدفت هذه الدراسة الى دراسة دور الـــ LTA المنقى جزئيا في التصاق بكتريا *Enterococcus faecalis* في الخلايا الطلائية البولية للانسان.

المواد وطرائق العمل

حامض اللايبوتكوك (LTA) المنقى جزئيا

استعمل الـــ LTA المستخلص والمنقى جزئيا من العزلة *E.faecalis* U12 وفق طريقة Fischer et al [10]، كما استعمل الـــ LTA المستخلص بالامونيا (dLTA) وفق طريقة Ofek et al[11] و الذي حصلنا عليه من خلال دراسة سابقة.

أختبار التصاق بكتريا *E. faecalis* في الخلايا الطلائية البولية للانسان

1- تحضير الخلايا

- تحضير خلايا البكتيريا

نشطت العزلة *E.faecalis* U12 على اكار تربتك صويا لمدة 24 ساعة، ثم نقلت مستعمرتان الى مرق تربتك صويا و حضنت عند درجة 37 م لمدة 18 ساعة، نبذت الخلايا بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، اعيد تعليق الخلايا بـــ Phosphate Buffer Solution ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 و أعيدت عملية النبذ مرتين، ثم علقت الخلايا بـــ PBS، ضبط عدد

الخلايا الى (1×10^8) خلية مكونة لمستعمرة/ مليلتر باجراء طريقة العد الحي للخلايا (Viable Count)، ثم سحب العالق عدة مرات بوساطة محقنة ذات ابرة 21- gauge لغرض تفكيك السلاسل.

- تحضير الخلايا الطلائية البولية

أعتمد ت طريقة Eden et al [12] و Gauzman et al [13]:

- جمعت عينة ادرار صباحية من نساء سليمات (مع التأكد من عدم وجود حالة التهاب للمجاري البولية) نبذت الخلايا الطلائية بسرعة 1500 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقيقة.
- سكب الرائق و أعيد تعليق الراسب الحاوي على الخلايا الطلائية بـــ PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7. و رجت رجاً خفيفاً ثم أعيدت عملية النبذ (3-4) مرات ثم اعيد تعليق راسب الخلايا بـــ PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7.2، و ضبط عدد الخلايا الى (1×10^5) خلية/ مليلتر باستعمال الـــ Hemocytometer.

2- أختبار الالتصاق البكتيري

مزج حجم من العالق البكتيري (1×10^8) خلية مكونة لمستعمرة / مليلتر مع حجم مساو من عالق الخلايا الطلائية (1×10^5 خلية / مليلتر) في انبوبة اختبار. مع ترك أنبوبه بدون أضافة العالق البكتيري كسيطره و حضنت الانابيب عند درجة 37م لمدة 60 دقيقة في حاضنة هزازة بسرعة 70 دورة/دقيقة. نبذ العالق بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 5 دقيقة، أهمل الرائق، و حضرت شريحة زجاجية (مكرران) بنشر القطرة المتبقية على الشريحة الزجاجية برقة ثم تركت لتجف في الهواء. ثبتت الشريحة الزجاجية بقطرة من الميثانول المطلق لمدة 5دقائق، ثم صبغت بملون Wright Giemsa تركت لمدة ساعة ثم غسلت، تركت لتجف، ثم فحصت بالمجهر الضوئي بقوة تكبير 100x باستعمال الزيت، سجلت النتائج بحساب عدد البكتريا الملتصقة بـــ 40 خلية طلائية، ثم حسب معدل التصاق البكتريا/ خلية طلائية [12].

دور الـــ LTA في التصاق بكتريا *E.faecalis* بالخلايا الطلائية البولية للانسان

أتبعت طريقة[Ofek et al 8]:

حضرت الخلايا الطلائية للانسان بتركيز (1×10^5) خلية/ مليلتر. غسلت الخلايا مرتين بـــ PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 بنبذها بسرعة 1500 دورة/ دقيقه لمدة 5 دقائق. سكب الرائق و أعيد تعليق الخلايا بـــ 1 مليلتر من تراكيز الـــ LTA المنقى جزئياً (500,400,200) مايكروغرام/ مليلتر، و 1 مليلتر من تراكيز الـــ LTA المستخلص بالامونيا (500) مايكروغرام/مليلتر و حضنت الانابيب عند درجة 37 م، لمدة 30 دقيقة. غسلت مرتين بـــ PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7.2، أعيد تعليق الخلايا بـــ 1 مليلتر من PBS، ثم اضيف حجم مساوي من العالق البكتيري 1×10^8 خلية مكونة لمستعمرة/ مليلتر. حضنت عند درجة حرارة 37 م، لمدة 60 دقيقة في حاضنة هزازة بسرعة 70 دورة/دقيقة. نبذ بسرعة 1500 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق، و حضرت شريحة زجاجية (مكرران) بنشر القطرة المتبقية على الشريحة الزجاجية برقة (للحفاظ على الخلايا و عدم تكسيرها) ثم تركت لتجف في الهواء. ثبتت الشريحة الزجاجية بقطرة من الميثانول المطلق لمدة 5 دقائق، ثم صبغت بملون Wright Giemsa تركت لمدة ساعة ثم غسلت، تركت لتجف، ثم فحصت بالمجهر الضوئي بقوة تكبير 100x باستعمال الزيت، سجلت النتائج بحساب عدد البكتريا الملتصقة بـــ 40 خلية طلائية [12].

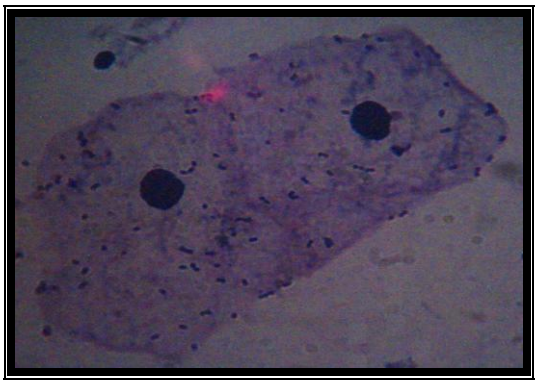
النتائج و المناقشة

أختبار التصاق *E.faecalis* في الخلايا الطلائية البولية للانسان

أختيرت العزلة*E.faecalis* U12 لاجراء أختبار الالتصاق البكتيري لمقاومتها العديد من المضادات الحيوية و أنتاجها لعوامل الضراوة (Protease، و Gelatinase،وHemolysin). أوضح Guzman و جماعته(13) ان عزلات الادرار الممرضة تلتصق بشكل أكبر على الخلايا الطلائية البولية من خلايا القلب مع ألفة واطئه تجاه خلايا الكلية مقارنةًبعزلات القلب التي تلتصق بشكل أكبر على خلايا القلب من خلايا الادرار مع ألفة ايضاً واطئه تجاه خلايا الكلية، كما أوضح كل من Shiono و Ike [14] ان

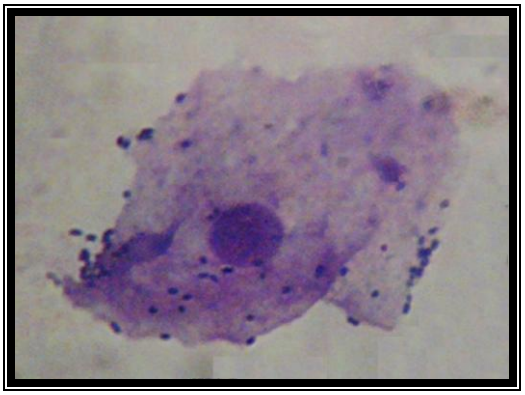
عزلات الادرار الممرضة تلتصق بخلايا الادرار و خلايا الامعاء في حين عزلات الخروج من اشخاص اصحاء لا تلتصق بخلايا الادرار. تم التاكد من عدم وجود بكتريا ملتصقة في الخلايا الطلائيةالبولية قبل أجراء أختبار التصاق بكتريا *E.faecalis* شكل (1)، في حالة وجود بكتريا ملتصقة في الخلايا يتم أهمال الادرار. اظهرت النتائج ان العزلة *E.faecalis* U12 تلتصق بمعدل 81.25 خلية بكتيرية / خلية طلائية و الشكل(2).

الشكل (1) الخلايا الطلائية البولية غير المعاملة بالبكتريا. قوة تكبير (100X).

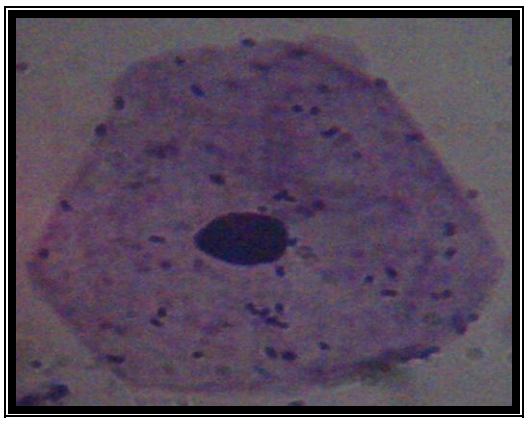


الشكل(2) التصاق بكتريا *E.faecalis* (1×10^{8} خلية بكترية/ مليلتر) في الخلايا الطلائية البولية (1×10^{5} خلية طلائية / مليلتر)

وعند معاملة الخلايا مسبقاً بالـ LTA المنقى جزئياً و بتراكيز 200، 400، 500 مايكروغرام/ مليلتر لوحظ حدوث تثبيط في عملية الالتصاق يبدأ عند التركيز 400 مايكروغرام/ مليلتر بنسبة 8.5 % و بتركيز500 مايكروغرام/ مليلتر بنسبة تثبيط 10% الشكل(3) و في حالة الخلايا المعاملة مسبقا بالـ dLTA بتركيز 500 مايكروغرام/ مليلتر لم يتم الحصول على اي تأثير تثبيطي لالتصاق بكتريا *E.faecalis* في الخلايا الطلائية البولية الشكل(4).



الشكل (3) التصاق بكتريا *E.faecalis* في الخلايا الطلائية البولية المعاملة مسبقاً بتركيز 500 مايكروغرام LTA / مليلتر. قوة تكبير (100X).



الشكل (4) بكتريا *E.faecalis* في الخلايا الطلائية البولية المعاملة مسبقاً بـــ 500 مايكروغرام dLTA / مليلتر. قوة تكبير (100X).

يلاحظ ان الـــ LTA عامل التصاق للعديد من البكتريا، اذ لوحظ دوره و الجزء الشحمي في التداخلات ما بين البكتريا – المضيف و التي تتطلب الفة تجاهالاغشية و بالتالي دوره في الضراوة لمختلف البكتريا الممرضة [8]. اذ من الممكن ان لا يعد عاملاً اساسياً في عملية الالتصاق، اذ لوحظ انه يقوم بتثبيط الالتصاق بنسبة (0 – 7.8) % لـــ *Candida albicans* و بكتريا *Streptococcus sanginus* بنسبة 40% (15) كما من الممكن ان يعد الـــ LTA احد العوامل المساهمة في عملية الالتصاق، اذ يثبط التصاق Group B Streptococci بنسبة 76.2% عند تركيز 400 مايكروغرام LTA / مليلتر و بنسبة 76.8% عند تركيز 500 مايكروغرام LTA / مليلتر بمدى يتراوح ما بين (72.1 – 91.2) % (16) كما لاحظ Teti و جماعته[17] ان مستخلص الـــ LTA لبكتريا *S. saprophyticus* يثبط

الالتصاق في الخلايا الطلائية البولية بنسبة تتراوح ما بين (66.8-67.9)% عند تركيز100مايكروغرام/ مليلتر.

اوضح Ofek و جماعته[8] ان معاملة الـLTA بالامونيا تسبب تحرير الشحوم المرتبطة بوساطة الاصرة الاستيرية من البوليمر، و ان هذه الشحوم مسؤولة عن الارتباط بمختلف الخلايا الطلائية. كما اوضح Teti و جماعته [16]ان الـ dLTA لا يمتلك اي فعالية تثبيطية لالتصاق بكتريا Group B treptococci في الخلايا الطلائية، اما Chugh و جماعته [15] بين ان الـ LTA يفقد فعالته في تثبيط التصاق *S.epidermidis* بـ Fibrin-platelet clot في حالة معاملته بالامونيا (dLTA) [18].

يساهم الـLTA في عملية الالتصاق بمختلف خلايا اللبائن بوساطة الجزء الشحمي أما بوساطة مستقبلات خاصة أو بزيادة الطبيعة الكارهة للماء لسطح البكتريا[12،19،20]. اذ يساهم الـ LTA في التصاق المسبحيات لمجموعة A المصلية بالـ Fibronectin لاسطح الخلايا الطلائية البولية[4]، كما أوضح Chan و جماعته [21] بأن الـ LTA يلعب دورًا رئيسياً في التصاق بكتريا *Lactobacillus* في خلايا الادرار بوساطة مستقبلات خاصة تختلف عن تلك التي تستغل بوساطة الممرضات، أذ يرتبط الـLTA بسطح الخلايا و يمنع أرتباط البكتريا الممرضة و لكن بدرجة اقل من الفعل التأزري LTA مع الببتيدوكلايكان. يرتبط الـLTA بأغشية الخلايا بوساطة تداخل الجزء الشحمي مع الطبقة الشحمية الثنائية للخلايا عن طريق تشكيل أصرة كارهة للماء مع الجزء الشحمي[20].

تشير نسبة التثبيط الواطئة للالتصاق التي الحصول عليها عند معاملة الخلايا بالـLTA الى ان الـLTA يعد احد العوامل المساهمة في عملية الالتصاق بكتريا *E. faecalis* و ليس كعامل التصاق رئيسي في الخلايا الطلائية البولية. اذ اشار العديد من الباحثين الى العديد من العوامل التي من الممكن ان تلعب دوراً في عملية الالتصاق لبكتريا *E. faecalis* منها : Agreggation substance، و Enterococcal surface proteins، اذ اوضح Toledo-Arana و جماعته[22] ان ESP يساهم في الارتباط الاولي و تكوين biofilm لعزلات *E. faecalis* على الاسطح الحية، و عامل كاربوهيدراتي D-mannose-D-glucose في عزلات الادرار و D-galactose-D-fructose في عزلات القلب[23].

References:

[1] Wicken A.J. and Knox K.W. Lipoteichoic Acid: A New Class of Bacterial Antigen . Science. 187:1161-1167. (1975).

[2] Simpson W.A.; Ofec I.; and Beachey E.H. Binding of Streptococcal Lipoteichoic Acid to the Fatty Acid Binding Sites on Serum Albumin.J.Bio.Chem. 225 (13):6092-6097. (1980).

[3] Morath S.; Geyer A.; Spreitzer I.; Hermann C. and Hartung T.. Structural Decomposition and Heterogenecity of Commerical Lipoteichoic Acid Preparations. Infect.Immun. *70*(*2*):938-944. (2002)

[4] Amersfoort E.S.V.; Van Berkel T.J.C. and Kuiper J. Receptors, Mediators and Mechanisims Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. Clin. Microbiol. Rev. *16(3)*: 379-414. (2003).

[5] Heumann D.; Barras C.; Severin A.; Glauser M.P. and Tomasz A.. Gram-Positive Cell Wall Stimulate Synthesis of Tumer Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6 by Human Monocytes. Infect. Immun. *62*(*7*): 2715-2721. (1994).

[6] Leemans J.C.; Heikens M.; Kessel K.P.M.; Florquin S. and Poll T.V.D. . Lipoteichoic Acids and Peptidoglycan from *Staphylococcusaureus* Synerginistically Induce Neutrophil Influx in to the Lung of Mice. Clin.Diag.Lab. Immun. *10* (*5*):950-953. (2003).

[7] Fiedel B.A. and Jackson R.W.. Immunogenicity of a Purified and Carrier-Complex Streptococcal Lipoteichoic Acid. Infect.Immun. *13* (*6*): 1585-1590. (1976).

[8] Ofek I. Beachey; E.H.; Jefferson W. and Campbell G.L.. Cell Membrane –Binding Properties of Group A Streptococcal Lipoteichoic Acid. J.Exp.Med. *141*:990-1002. (1975).

[9] Joyanes P.; Pascual A.; Martinez-Martinez L.; Hevia A. and Perea E.J.. In vitro Adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to Urinary Catheters. Eur.J.Clin .Microbiol. Infect.Dis. *19*(*2*): 124-127. (2000).

[10] Fischer W.; Koch H.U. and Haas K.. Improved Preparation of Lipoteichoic Acid .Eur .J .Biochem. *17* :523-530 . (1983).

[11] Ofek I.; Beachey E.H.; Jefferson W. and Campbell G.L.. Cell Membrane –Binding

johnsonii La1 to Human Enterocyte-Like Caco-2 Cells. Appel. Enviro. Microbiol. *65*(*3*):1071-1077. (1999).

[21] Chan R.C.Y.; Reid G.; Irvin R.T.; Bruce A.W. and Costerton J.W.. Competitive Exclusion of Uropathogens from Human Uroepithelial Cells by *Lactobacillus* Whole Cells and CellWall Fragments. Infect. Immun. *47*(*1*):84-89. (1985).

[22] Toledo-Arana A.; Valle J.; Solano C.; Arrizubieta M.J.; Cucarella C.; Lamata M.; Amorena B.; Leiva J.; Penades J.R. and Lasa I..The Enterococcal Surface Protein, ESP, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. Appl.Enviro.Microbiol. *67*(*10*): 4538-4545. (2001).

[23] Guzman C.A.; Pruzzo C.; Plate M.; Guardati M.C. and Calegari L.. Serum Dependent Expression of *Enterococcus faecalis* adhesions Involved in the Colonization of Heart cells. Microb.Pathog. *11*(*6*):399-409. (1991).

Abstract

The isolate *E.faecalis* U12 was tested for adhesion to Uroepithelial cells, the bacteria adhere in average of 81.25 (bacterial cell/ epithelial cell) .When the role of partial purified LTA was tested The adherence was inhibited by using 400 µg/ml LTA and 500 µg /ml LTA in a percentage of 8.5% and 10% respectively, these results refered to the secondary role of LTA in the adherence of *E.faecalis*. While it could not inhibit the adherence in 500 µg/ ml dLTA, this refered to the role of lipid part of LTA in the adherence.

Properties of Group A Streptococcal Lipoteichoic Acid. J.Exp.Med.*141*:990-1002. (1975).

[12] Eden C.S.; Eriksson B., and Hanson. Adhesion of *Escherichia coli* to Human Uroiepithelial cells In vitro.Infect.Immun . *18*(*3*): 767-774. (1977).

[13] Guzman C.A.; Pruzzo C.; Lipira G. and Calegari L. Role of Adherence in Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* Urinary Tract Infection and Endocarditis .Infect.Immun. *57*(*6*):1834-1838. (1989).

[14] Shiono A. and Ike Y. Isolation of *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates That Efficiently Adhere to Human Bladder Carcinoma T24 Cells and Inhibition of Adhesion by Fibronectin and Trypsin Treatment. Infect. Immun.*67*(*4*):1585-1592. (1999)

[15] Chugh T.D.; Burns G.J.; Shuhaiber H.J. and Bahr G.M.. .Adherance of Staohylococcus epidermidis to Fibrin-Platelet Clots In Vitro Mediated by Lipoteichoic Acid .Infect.Immun. *58*(*2*): 315-319. (1990).

[16] Teti G.; Tomasello F.; Chiofalo M.S.; Orefici G. and Mastroeni P. .Adherance of Group BStreptococci to Adult and Neonatal Epithelial Cells Mediated by Lipoteichoic Acid. Infect.Immun. *55*(*12*):3057-3064. (1987).

[17] Teti G.; Chiofalo M.S.; Tomasello F.; Fava C. and Mastroeni P. Mediation of *Staphylococcus saprophyticus* Adherence to Uroepithelial Cells by Lipoteichoic Acid. Infect.Immun. *55*(*3*):839-842. (1987).

[18] Nealon T.J. and Mattingly S.J. Role of Cellular Lipoteichoic Acid in Mediating Adherance of Serotype III Strains of Group B Streptococci to Human Embryonic, Fetal,and Adult Epithelial Cells. Infect.Immun .*43*(*2*):523-530. (1984).

[19] Gibbons R.J. and Houte J.V.. Selective Bacterial Adherance to Oral Epithelial Surface and Its Role as an Ecological Determinant. Infect. Immun. *3* (*4*):567-573. (1971).

[20] Granato D.; Perotti F.; Masserey I.; Rouvet M.; Golliard M.; Servin A. and Brassart D..Cell Surface-Associated Lipoteichoic Acid Acts as an Adhesion Factor for Attachment of *Lactobacillus*