



دراسة نسيجية مقارنة للجلد في ذكور الفئران البيض المعاملة بالعزلة الايشريكية القولونية *Escherichia coli* المقاومة و العزلة الحساسة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين Ciprofloxacin

زياد حميد فياض* احمد محمد تركي* حارث جبار فهد**

*كلية العلوم - جامعة الانبار

**كلية العلوم - جامعة بغداد

الخلاصة:

وجدت الدراسة الحالية أن التغييرات النسيجية لطبقات الجلد في ذكور الفئران (Mus muscular) المحقونة بالعزلة المقاومة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) الحاوية على جين *gyrA* الطافر و مع التركيز المثبط الأدنى للمضاد نفسه (512 مايكروغرام / مل) كانت اقل ضرر من الفئران المحقونة بالعزلة الحساسة للمضاد نفسه، مما يؤكد ان المضاد الحياتي له تأثير على الخلية البكتيرية حيث يعمل على منعها من انتاج عوامل الفوعة. في ذات الوقت لوحظ ان العزلة الحساسة احدثت تغييرات نسيجية مرضية شديدة في طبقات جلد الفئران اكثر مما احدثته العزلة الحاملة لمورثات المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin)، الامر الذي يؤكد ان العزلة الحساسة تمتلك عوامل فوعة اكثر و اشد من نظيرتها المقاومة.

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/01/09
تاريخ القبول: 2017/3/12
تاريخ النشر: 2017 /00 /00

DOI: 10.37652/juaps.2017.141402

الكلمات المفتاحية:

دراسة نسيجية،
الفئران البيض،
الايشريكية القولونية *Escherichia coli*
Ciprofloxacin.

المقدمة

ان سبب ارتفاع مقاومة البكتريا المرضية للمضادات الحياتية بشكل كبير نتيجة التغييرات الوظيفية والوراثية التي تحدث في البكتريا نتيجة الضغوط الانتخابية بسوء استعمال المضادات الحياتية في المعالجات الطبية خلال الأوقات الماضية (4). وتمتلك تلك هذه الانواع من البكتريا قدرة عالية على اكتساب محددات المقاومة للمضادات الحياتية وأصبحت العديد من سلالاتها مقاومة لهذه المضادات التي تستهدف جدرانها الخلوية وتختلف اليات المقاومة اعتمادا على السلالة والمضاد الحياتي المستعمل وتركيزه (5). أن المقاومة البكتيرية تشير الى عدم قدرة المضاد الحياتي على التأثير في البكتريا وأصبحت الأحياء تمتلك مقاومة متعددة اي أصبحت السلالة الواحدة تقاوم عدة انواع من المضادات مما ادى الى ظهور سلالات بكتيرية خطيرة من اهمها بكتريا *E. coli* (6). ومصدر تلك السلالات المقاومة هو المستشفيات والتي يطلق عليها (Hospital acquired infection) حيث تؤدي الى حدوث العديد من حالات الوفاة تصل الى 5000 حالة وفاة سنويا في بعض الدول المتقدمة واكثر من ربع مليون إصابة لمن يترددون على المستشفيات الكبيرة سنويا

تسبب الايشريكية القولونية (*Escherichia coli*) أمراضا عديدة في جسم الإنسان منها أخماج الجروح والحروق، و العين، والجلد، والمجاري البولية، والأذن الوسطى، وتجرثم الدم (Bacteremia)، وقد أكدت العديد من الدراسات أن البكتريا السالبة لصبغة جرام من المسببات الرئيسية للإسهال وخاصة التي تنتمي إلى العائلة المعوية (1) إذ غُزلت أنواع مختلفة من الممرضات المسؤولة عن حدوث الإسهال فوجد أن بكتريا *E. coli* تؤدي دوراً مهماً في وبائية الإسهال (2)، ويعود سبب صعوبة علاج الأصابة بهذه البكتريا الى مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية، مثل مضادات البيتا لاكتام β -Lactam والماكروليد والسبروفلوكساسين، فضلا عن مقاومتها العالية لمضادات فلوروكوينولونات (3).

* Corresponding author at: College of Science, University of Anbar
:E-mail address drahmed2013@yahoo.com

الحيوانات المختبرية

جمعت ذكور الفئران البيض من نوع *Mus musculus* بعمر 10-12 أسبوعاً و بواقع تسع حيوانات و كان معدل أوزانها 20 - 25 غراماً وبصحة جيدة، وتم الحصول عليها من وحدة البحوث التجريبية /التقنيات الاحيائية/ جامعة النهدين، و وضعت في أقفاص معدنية. و فرشت بنشارة الخشب مع العناية بنظافة الأقفاص وتستبدل كل ثلاث أيام. وضعت الحيوانات طوال مدة الدراسة عند ظروف مختبرية موحدة من حيث التهوية و درجة الحرارة التي كانت بحدود 20 ± 26 م. أعطيت الحيوانات عليقة خاصة والتي كانت محتوياتها عبارة عن علف مركز تم الحصول عليها من كلية الزراعة/قسم الثروة الحيوانية/جامعة بغداد. قسمت الحيوانات عشوائياً الى ثلاث مجاميع بواقع ثلاث حيوانات في كل مجموعة و على النحو الآتي :

مجموعة السيطرة: حقنت بالمضاد الحياتي السبروفلوكساسين بحجم 0.1 مليلتر وبتركيز 512 مايكروغرام / مل (و الذي يمثل التركيز تحت المثبط الادنى) مع محلول الملح الفسلجي.
مجموعة المعاملة الاولى : حقنت بعالق البكتريا *E. coli* الحاوية على الجين *gyrA* الطافر بحجم 0.1 مليلتر وبتركيز 1×10^8 وحدة مكونة للمستعمرة و بوجود مضاد السبروفلوكساسين بحجم 0.1 مليلتر وبتركيز 512 مايكروغرام / مل.
مجموعة المعاملة الثانية: حقنت بعالق البكتريا *E. coli* الحساسة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين بحجم 0.1 مليلتر و بتركيز 1×10^8 وحدة مكونة للمستعمرة.

Injection method

طريقة الحقن

تم عمل جرح (Transcutaneous) بطول 10 ملم بعد ان ازيل الشعر من ظهر الحيوان ولوث بعالق البكتريا *E. coli*. بعد مرور ثلاثة ايام على الحقن شرحت مجاميع الفئران و تم اخذ مقاطع من الجلد المصاب ووضع في مثبت هو فورمالين (10%) لمدة 24 ساعة، بعدها تم تحضير المقاطع النسيجية لدراسة التأثيرات المرضية فيها بالاعتماد على طريقة سيفارنا و جماعته (Survarna (2013).

إضافة الى انه سُجلت 9% من حالات الإصابة حدثت للمرضى الراقين في المستشفيات بالنسبة للبلدان المتقدمة (7) .
اشار العديد من الدراسات حول اكتساب البكتريا لحينات مقاومة المضادات الحياتية يؤدي ذلك الى فقدان جينات اخرى قد تشفر للموانع البيئية او جينات الفوعة. بينما اشارت بحوث اخرى ان وجود المضاد الحياتي قد يؤدي الى زيادة الفوعة وضرر النسيج، لذا هدفت هذه الدراسة لمقارنة امراضية بكتريا *E. coli* المنتجة لانزيمات البيتا لاكتاميز موسعة الطيف المقاومة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) مع بكتريا *E. coli* الحساسة له في ذكور الفئران البيض.

طرائق العمل

العزلات البكتيرية

تم الحصول على العزلات البكتيرية من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بغداد وكانت كالاتي:
عزلة بكتريا *E. coli* مقاومة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين (**Ciprofloxacin**) حاوية على الجين *gyrA* الطافر و عزلة اخرى لبكتريا *E. coli* حساسة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin).

حساب التركيز المثبط الادنى Minim

تم اعتماد طريقة التخفيف الدقيق (Microdilution) و ذلك باستعمال طبق المعايرة الدقيقة (Microtiter plate) للتحري عن العزلات البكتيرية المقاومة والحساسة لمضاد السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin). بعد ملء الحفر جميعها بـ 100 مايكروليتر من سائل مولر هنتون (مضاعف التركيز) بعدها تم اضافة 100 مايكروليتر من محلول السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) المعد سلفاً بتركيز 2048 مايكروغرام/مل في الحفرة رقم واحد والقيام بسلسلة التخفيف للحصول على تراكيز نصفية تتراوح من (0.5 - 1024 مايكروغرام/مل) قبل اضافة البكتريا المنشطة على وسط التريبتون السويا السائل قبل يوم ثم تم حضنها عند درجة 37 م لمدة 24 ساعة وقراءتها.

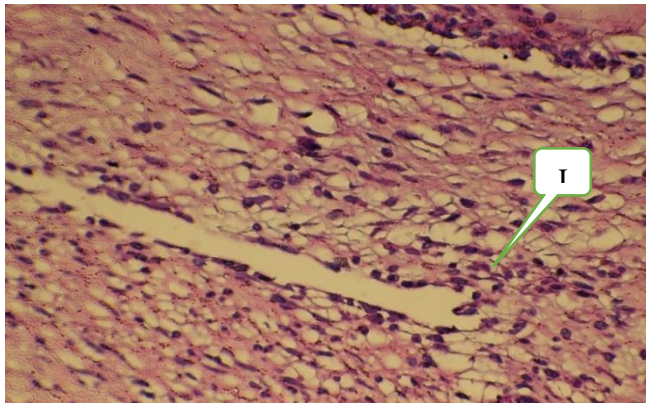
النتائج و المناقشة

تبين من خلال نتائج الدراسة الحالية ان العزلات البكتيرية اظهرت مقاومة عالية للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين، وكان التركيز المثبط الادنى 1024 مايكروغرام / مل.

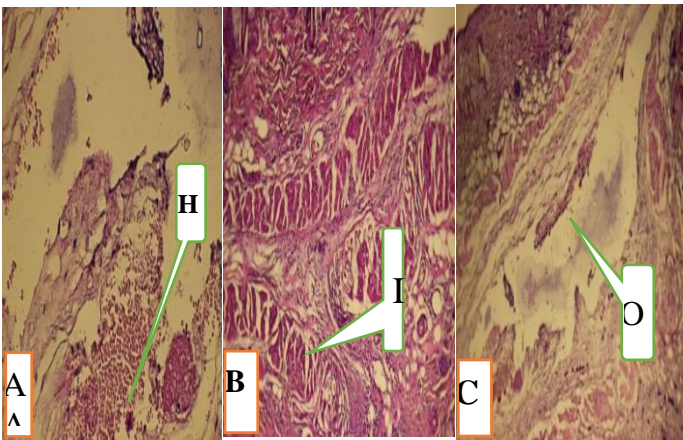
الدراسة داخل الجسم الحي:

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لحيوانات مجموعة السيطرة و الموضحة بالشكل 1، ان طبقات الجلد (Skin Layers) لم يطرأ عليها اي تغيير بل ظهرت بصورتها الطبيعية. (شكل 1) بينت المقاطع النسيجية للجلد لذكور فئران المعاملة الاولى و المحقونة بعالق بكتريا *E. coli* الحاوية على الجين *gyrA* الطافر و المضاد الحياتي السبروفلوكساسين وجود ارتشاح بسيط للخلايا الالتهابية (Inflammatory cells) ضمن النسيج الضام (Connective tissue) فقط. (شكل رقم 2).

شكل 2: مقطع عرضي مار خلال جلد ذكر فأر معاملة بعالق بكتريا *E. coli*



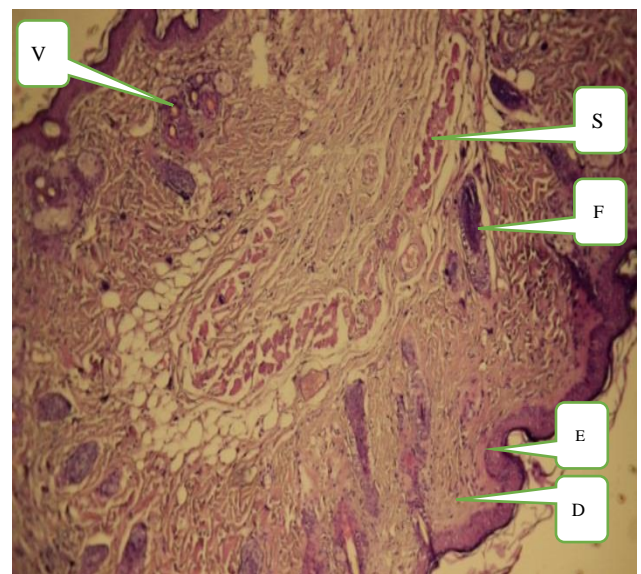
الحاوية على الجين *gyrA* الطافر بتركيز 10×8 وحدة مكونة للمستعمرة /مل و الحاوي على التركيز المثبط الادنى من مضاد السبروفلوكساسين . لاحظ ارتشاح بسيط للخلايا الالتهابية (I) (هيماتوكسيلين - ايوسين) $(40\times)$.



شكل 3: مقطع عرضي مار خلال جلد ذكر فأر المحقون بعالق بكتريا *E. coli* الحساسة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين بتركيز 10×1 وحدة مكونة للمستعمرة /مل. (هيماتوكسيلين - ايوسين) $(40\times)$ لاحظ:

A - نزف دموي شديد (H). B - ارتشاح للخلايا الالتهابية (I).
C - استسقاء (O).

وجد من خلال الدراسة الحالية أن التغييرات النسيجية المرضية للجلد في ذكور الفئران (المعاملة الاولى) المحقونة بعالق البكتريا المقاومة للمضاد الحياتي السبروفلوكساسين الحاوية على جين *gyrA* الطافر مع المضاد الحياتي ذات التركيز المثبط الادنى (512 مايكروغرام / مل)



شكل 1: مقطع عرضي مار خلال جلد ذكر الفأر لمجموعة السيطرة يوضح طبقات الجلد، لاحظ: البشرة (E) و الادمة (D) و تحت الادمة (S) و بصيلة الشعر (F) و الاوعية الدموية (V). (هيماتوكسيلين - ايوسين) $6 (10\times)$.

لدخول الممرض و يتحقق بزيادة حركة البلازما والخلايا البيض (Leucocytes) من الدم الى الانسجة المصابة الامر الذي يؤدي الى احتقان هذه الاوعية بالدم بسبب زيادة الدفق الدموي و توسع هذه الاوعية. هذه التغيرات ممكن ان تظهر في المقاطع النسيجية على شكل احتقان (Congestion) او نرف دموي (Hemorrhage) (11). ان توسع الاوعية الدموية و احتقانها بالدم يؤدي الى زيادة في نفوذية بروتينات البلازما و السوائل الاخرى الى الانسجة مما يقود الى خلخلة الضغط الازموزي في السائل البيني و بالتالي انجذاب الماء و الايونات الاخرى مكونة ما يدعى بالاستسقاء (Odema) (12). وهذا ما تم ملاحظته في المقاطع النسيجية للدراسة الحالية.

المصادر

1. رميض, عبدالقادر كريم.(2015). التحري عن العلاقة بين أنواع جين KPC و تكوين الغشاء الحياتي و الامراضية في *Klebsiella pneumoniae*. اطروحة دكتوراه، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد.
2. Abbas, A.B. and Lichtman A.H. (2009). "Ch.2 Innate Immunity". Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system (3rd ed.).
3. Andersson, D.I. and Hughes, D.(2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat. Rev.Microbiol.8:260–71.
4. حمادي، علي حسون . (2015). دور اجهاد المضادات الحيائية في امراضية الممرضة البولية الايشريكية القولونية المنتجة للبيتا لاكتاميز موسعة الطيف في الفران المختبرية . اطروحة دكتوراه، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الانبار.
5. Dasilva N. A. and Bailey J. E. (1986). Theoretical growth-yield estimates for recombinant cells. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 741–746. 10.1002/bit.260280514.
6. Ferrero-Miliani, L.; Nielsen, O.H.; Andersen, P.S. and Girardin, S.E. (2007). "Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation". *Clin. Exp. Immunol.* 147 (2): 061127015327006.
7. Goldsby, R.; Kindt, T.; Osborne, B. ;and Janis, K. (2003). *Immunology*. (5th ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
8. ياسين, نجلاء نيهان (2015). دراسة مقارنة بين المقاومة العالية والحساسية العالية لبكتريا الايشيريشية القولونية المسببة لخمج

كانت اقل ضرر من ذكور الفران المحقونة بالعزلة الحساسة (المعاملة الثانية) للمضاد نفسه، مما يؤكد ان المضاد الحياتي له تأثير على الخلية البكتيرية حيث يعمل على منعها من انتاج عوامل الفوعة. في ذات الوقت لوحظ ان العزلة الحساسة احدثت تغييرات نسيجية مرضية شديدة في طبقات جلد الفران اكثر مما احدثته العزلة الحاملة لمورثات المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين، الامر الذي يؤكد ان العزلة الحساسة تمتلك عوامل فوعة اكثر و اشد من نظيرتها المقاومة.

ان المقاومة للمضادات الحيائية قد تحصل نتيجة حصول طفرات معينة تؤدي الى اخلال ببعض العمليات الوظيفية الطبيعية في الخلية مؤدية الى حصول تأثيرات جانبية ضارة. حيث ان هذه الطفرات تساعد الخلية على تصنيع بروتينات و احماض نووية جديدة مؤدياً بذلك الى صرف طاقة (13).

ذكر (14) ان اكتساب البكتريا طفرات المقاومة سواء عن طريق الانتقال العمودي للجينات او حدوث طفرة في الكروموسوم يتعلق بما يسمى تكلفة المواءمة (Fitness cost) والتي ينتج عنها انخفاض في معدل النمو و قدرة البكتريا على التنافس مع نظيراتها الحساسة (بغياب المضادات الحيائية) و كذلك فقدان جينات الفوعة.

وهذا ما وجده الباحثون حمادي (4) و رميض (1) و ياسين (8) عند دراستهم على عزلات بكتيرية محلية حيث ان العزلات البكتيرية الحساسة تحدث ضرراً كبيراً في الانسجة من العزلات البكتيرية التي تمتلك جينات مقاومة و كلما زادت جينات المقاومة المكتسبة قلت الفوعة.

يعد الالتهاب (Inflammation) جزءاً من استجابة بايولوجية معقدة والتي عن طريقها يحاول المضيف التخلص من الممرضات و العوامل الاخرى للبدأ بعملية الشفاء (7). وان عملية الالتهاب هي ليست عملية مرادفة للخمج حتى وان كان الالتهاب يحصل بسبب الخمج (9).

عند دخول المستضد (Anigen) الى داخل المضيف تبدأ عملية الالتهاب بأول خطوة على التعرف على المادة الغريبة ومن ثم تبدأ الاوعية الدموية بالتوسع ويرتشح منها السوائل والخلايا الالتهابية الى الانسجة الغريبة اذ تنجذب الى موقع الإصابة لطرد الكائن الغريب (10).

ينقسم الالتهاب الى نوعين حاد و مزمن اعتماداً على الاطار الزمني التي تحصل فيه الاعراض. فالالتهاب الحاد هو الاستجابة الاولى

- Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. journal of proteomics. 9 7 :8 8 – 9 9 .
12. Johnson, L,V.;Anderson, D.H.; Mullins, R.F.; and Hageman, G.S.(2002). A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. Am J Ophthalmol. 134(3):411-31.
 13. Koo, H.J. and Woo G.J.(2011) . Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. Int J Food Microbiol;145:407-13 .
 14. Kumar, k.D.V.; Jayaveera, K.N.; and Kumar, G.S.(2007). Anti inflammatory and antinociceptive properties of *Tephrosia falciformis* root extract. *Pharmacologyonline* 2: 371-384.
 - المجاري البولوية والتابعة لمجموعة البيتا لاكتاميز. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم, جامعة بغداد.
 9. HoPL, C.; Lo, W.U.; Law, P.Y. and LiZ,L. (2013).Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance fosA3 among multidrug-resistant *Escherichia coli* from ivestock and other animals. J.Appl Microbiol; 114:695–702.
 10. Ines, M.; Carmen, T.; Nuno S. Sergio S.; Gilberto I. and Patr, i. P. (2013). Genomic Description of Antibiotic Resistancein *Escherichia coli*and *Enterococci* Isolates from Healthy Lusitano Horses Journal of Equine Veterinary Science : (33) 1057-1063.
 11. Iosif, V.; Ioannis, G.; Anna, P.; b, Vassilio, S.; Yannis, T.; Kris G. and Georgios T. (2014).

A comparative histopathological study of the skin in male white mice that treated with resistant *Escherichia coli* and sensitive to the ciprofloxacin antibiotic.

Ziyad Hameed F. Ahmed M. Turkey Harith J. Fahad

E.mail: drahmed2013@yahoo.com

Abstract

The current study established that the histopathological changes in the skin of male mice injected with resistant isolate to ciprofloxacin harbouring *gyrA* mutant mixed with the ciprofloxacin at sub minimum inhibitory concentration (512 micrograms / ml) was less severe than what it was noticed in the mice injected with the sensitive isolate, which confirms that the antibiotic imposed a stress on the bacterial cell to prevent the production of virulence factors. Simultaneously, it was observed that the sensitive isolate caused severe histological changes in the mice skin layers than wrought by the isolate bearing resistance genes for ciprofloxacin, which confirms that the sensitive isolate owns more virulence determinants than its counterpart; resistant one.