✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۰، ۴۱ و ۴۲ بهار ۱۳۷۸

بررسی اثر سم طبیعی و نوترکیب *Pasteurella haemolytica* بر روی سلولهای خونی

● **مجتبی سعادتی**، دانشگاه امام حسین (ع)، پژوهشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۷۷

چکیده

سم نوترکیب و طبیعی تولید شده توسط باکتری *Pasteurella haemolytica* اثرات مختلفی بر روی سلولهای مختلف خونی از جمله نتروفیل انسان، خرگوش، خوکچه هندی، گاو، گوسفند، سلولهای سرطانی ماکروفاژ موش (J774.2) و نیز سلولهای سرطانی گاو (BL3) داشته است. سم قادر است سلولهای نتروفیل نشخوار کنندگان و سلولهای (BL3) (Bovine lymphoma) را تخریب نماید. ولی بر روی نتروفیل‌های خرگوش و خوکچه هندی و نیز سلولهای سرطانی ماکروفاژ موش (J774.2) اثری نداشته است (ارزیابی به روش Cell tracking assay و CL inhibition و Trypan blue dye exclusion) می‌باشد. اثر سم بر روی نوتروفیل‌های انسانی متفاوت است و حتی در غلظت بالای سم، مهار کامل رادیکال‌های آزاد مشاهده نگردید. مطالعات بعدی نشان داد که سم باعث تخریب نوتروفیل انسانی نشده ولی باعث تحریک مهاجرت سلول گردیده است. این مهاجرت با سرعت زیاد، شیب ثابت و با ضریب انتشار بالا انجام پذیرفته که از مشخصه‌های بارز این مهاجرت حرکت سلول در یک جهت برای مدتی طولانی بوده است (روش ارزیابی Cell tracking assay می‌باشد). در این تحقیق مشاهده گردید اگر چه میزان سم تولید شده از طریق نوترکیب تفاوتی در مقایسه با سم طبیعی داشت لیکن تغییری در اثرگذاری بر سلولهای هدف نداشته است.

مقدمه

باکتری *Pasteurella haemolytica* دارای عوامل بیماریزای متفاوتی می‌باشد که ممکن است در مراحل مختلفی که بیماری توسط این باکتری ایجاد می‌شود. نقش مهمی را ایفاء نمایند. این عوامل شامل لوکوتوکسین (Lkt)، لیپوپولی ساکارید (LPS)، کپسول، فیمبریا و نیز انواع مختلف پروتئین‌های غشاء خارجی می‌باشد و به نظر می‌رسد که لوکوتوکسین در ایجاد بیماری نقش مهمی را ایفا نماید و این بدان دلیل است که سم احتمالاً در از بین بردن سیستم دفاع ریوی مانندماکروفاژهای آلوئولار و نتروفیل‌ها مستقیماً شرکت می‌نماید.

Lkt جزء گروهی از سموم پروتئینی با وزن مولکولی بالا می‌باشد و فعالیت آنها وابسته به حضور کلسیم می‌باشد سم Lkt قادر است در سلولهای هدف سوراخ ایجاد نماید و بدینوسیله باعث تخریب آنها گردد (۲). این سم از لحاظ ساختمانی و پادگنی مشابه همولیزین بوده و به لحاظ داشتن واحدهای تکراری کربوکسیل در انتهای باکتری به نام repeats in toxin یا RTX نامیده می‌شود (۷).

سموم RTX در اثرگذاری بر روی سلولهای هدف دارای اختلافاتی می‌باشند. بعضی از این سموم بر روی انواع سلولهای یوکاریوتیک مؤثر بوده ولی بعضی دیگر اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. Lkt به طور اختصاصی روی گلبولهای سفید نشخوار کننده اثر می‌گذارد (۱۴). این سم با دو روش بر روی سلولهای هدف اثر می‌گذارد در مرحله اول باعث ترشح پتاسیم از داخل به خارج سلول شده و سپس با بزرگ شدن سلول و تخریب آن باعث از بین رفتن سلول می‌گردد. پس از اثر سم روی گلبولهای سفید که باعث تخریب سلولهای دفاعی می‌شود لیزوزیم و رادیکالهای آزاد سمی رها شده و به دنبال آن واکنشهای التهابی و ضایعات ریوی ایجاد می‌گردد. یکی از اثرات سم Lkt روی نتروفیلها از بین بردن انفجار تنفسی در آنها می‌باشد و این عکس‌العمل را می‌توان توسط بعضی از تحریک کننده‌های سلولی (مانند OZ) مشاهده نمود. گرچه تنها اختصاصی بودن اثر این پروتئین بر گلبولهای سفید نشخوارکنندگان گزارش گردیده و باعث تخریب آنها می‌گردد لیک اخیراً اثر این سم بر روی دیگر سلولها نیز مشخص شده است (۴، ۱۰، ۱۱ و ۱۶).

در این تحقیق برای اولین بار فعالیت سم طبیعی و نوترکیب LKt بر روی سلولهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

باکتری‌ها: سویه‌های *P. haemolytica* و *E. coli* که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه گلاسکو، جز و HMS174 SY3271 pir به ترتیب از Gibco BRI, Novagen دکتر میلر از دانشگاه کالیفرنیا، لوس‌آنجلس، آمریکا تهیه گردید.

باکتری‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد در محیط BHIB (Oxoid) حاوی ۵۰٪ گلیسرول نگهداری شده بود. سم باکتری *P. haemolytica* بوسیله روشی که سعادتی و همکاران (۱۲) گزارش نموده‌اند تهیه و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

برای تهیه سم به روش نوترکیب از پلاسمیدی که

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 40, 41, 42 PP: 156-159**

Effect of natural and recombinant poison of *Pasteurella haemolytica* on blood cells.

By: Saadati M., University of Imam Hossein, Faculty of Basic Sciences.

Native and recombinant leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* have different effects on ruminant and non-ruminant neutrophils. Leukotoxin killed ruminant neutrophils and bovine lymphoma (BL3) cells by cell swelling and lysis, but it had no effect on rabbit and guinea pig neutrophils and a mouse macrophage cell line (J774.2) as judged by tripan blue dye exclusion and CL inhibition assay. This toxin partially inhibited the CL response of human neutrphils, although it did not kill the cells as judged by CL inhibition assay. The active toxin killed bovine neutrpohils, but caused the migration of human neutrophils. However, the same concentration of non-activated rLktA had no effect either on CL response or movement of human neutrophils as judged by cell tracking assay.

دارای قسمت‌های مختلف lKt بود (pGW64, pGW42 و pGW78) استفاده شد. این پلاسمیدها با همکاری Dr. Gareth Westrop در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه گلاسکو، انگلستان تهیه گردید.

از سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* برای تولید قسمتهای مختلف سم به شرح زیر استفاده شد.

الف) سویه HMS174 (حاوی پلاسمید pGW42) برای تولید سم فعال (active rLktA).

ب) سویه SY327λ pir (حاوی پلاسمید pGW64) برای تولید lktA.

ج) سویه SY327λ pir (حاوی پلاسمید pGW78) برای تولید lktC.

تهیه سلول آماده

در تولید سلول competent (آماده) از سویه‌های HMS174 و یا SY327λ pri در محیط (2 x YT) 2 x Yeast Extract Trypton و روشهای استاندارد استفاده شد (۱۳).

ترانسفورماسیون

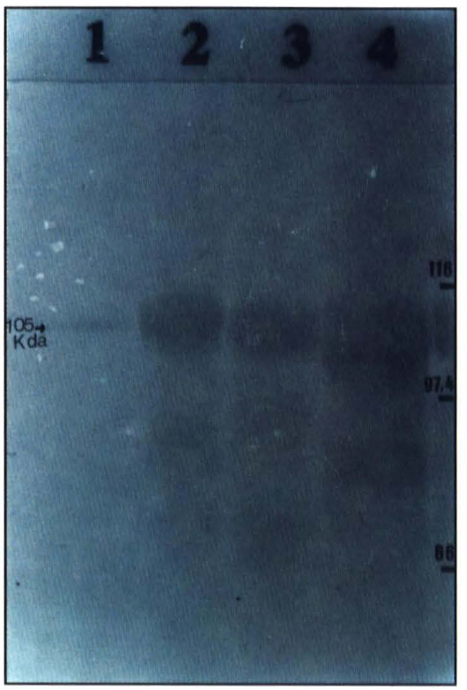
جهت ترانسفورم نمودن، از پلاسمیدهای pGW42، pGW64 و یا pGW78 سلولهای آماده شده استفاده گردید (Sambrook و همکاران، ۱۳).

پس از ترانسفورم کردن ۱۰۰ میکرولیتر از سلولهای ترانسفور شده روی محیط آگار YT x 2 که حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی‌سیلین در هر میلی‌لیتر (جهت انتخاب باکتریهایی که دارای پلاسمید pGW42 هستند) و یا ۱۰۰ میکروگرم کلرآمفنیکل در هر میلی‌لیتر (جهت و / انتخاب باکتری‌هایی که دارای پلاسمید pGW64 یا pGW75 هستند) بود کشت داده و به مدت ۱۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

ابراز ژن در سویه‌های *E. coli*

پس از رشد باکتریهای که پلاسمید به آنها منتقل شده بود از محیط آگار جدا و به محیط آبگوشتی که 2x YT حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی سیلین در هر میلی‌لیتر و یا ۱۰ میکروگرم کلرآمفنیکل در هر میلی‌لیتر بود منتقل گردید. در زمانی که در طول موج ۶۵۰ جذب نوری به ۰/۵ در ماده تحریک کننده رسید غلظت IPTG (Sigma) نهایی ۱ میلی مولار به محیط کشت اضافه شد. محیط کشت به مدت چهار ساعت دیگر در حرارت ۳۷ درجه نگهداری شد و سپس باکتریها بوسیله سانتریفوژ ۹۰۰۰ در دور محیط xg به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۴ درجه از TEN کشت جدا و ۱۰ برابر حجم باکتری‌ها به آن بافر سرد (Tris-HCl pH 8.0, 50 mM; NaCl, 150, mM; EDTA, 100 mM) اضافه و پس از تقسیم در حجم‌های کمتر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت خارج نمودن سم از داخل گنجیدگی معمولی (inclusion bodies) ابتدا باکتری در بافر TEN که حاوی لیزوزم (10 mg/ml) و گلیسرول بود به مدت ۱ ساعت در حرارت ۴ درجه قرار داده و در همان درجه حرارت سونیکیت شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۴ درجه با دور ۱۷۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید. آنچه در ته لوله باقی مانده شامل سلولهای شکسته شده inclusion bodies بود که به آن ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و ۳ بار شستشو داده شد. سم از inclusion bodies به وسیله قرار دادن pellet در ۱ میلی‌لیتر از بافر که (pH TC 8.0, 50 mM; CaCl2, 0.2 mM و Tris-HCl) دارای ۸ مولار اوره بود در حالی که در درجه حرارت ۴ درجه قرار داشت خارج گردید، **pellet موادی که قابل حل شدن نبود به وسیله سانتریفوژ در دور xg ۱۵۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد جدا شد.** مایع رویی که حاوی سم نوترکیبی بود در حرارت منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.



شکل شماره ۱- مایع رویی محیط کشت باکتری *P. haemolytica* و نیز سم به دست آمده از طریق نوترکیبی از باکتری *E. coli* به وسیله SDS-PAGE جدا و با روش ایمیونوبلاتینگ به نتروسلولوز منتقل گردید و سپس با استفاده از پادتن مونوکلنال موقعیت سم مشخص گردید. خط ۱- مایع رویی محیط کشت باکتری *P. haemolytica* خط ۲- سم نوترکیبی تولید شده از باکتری *E. coli* سویه SY327λ که دارای پلاسمید pGW64 بوده است (inactive rlkt). خط ۳- سم نوترکیبی تولید شده از باکتری *E. coli* سویه SY327λ که دارای پلاسمید pGW64 و پلاسمید pGW78 بوده است (active rlkt). خط ۴- سم نوترکیبی تولید شده از باکتری *E. coli* سویه SY327λpir که دارای پلاسمید pGW42 بوده است (active rlkt). محل وزن مولکول مارکر در سمت راست قرار دارد.

جهت جدا نمودن اوره از سم، مایع حاوی سم نوترکیب در مقابل حجم زیادی از بافر (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM CaCl) دیالیز گردید. این کار براساس روش گزارش شده توسط Brownlie و همکاران صورت پذیرفت (۳).

جدا سازی سلول‌های خونی (نتروفیل از دیگر سلولها) با استفاده از روش سعادتی و پورشفیع (۱) و ارزیابی فعالیت سم به روش کمولومینسانس براساس (CL) و میزان عکس‌العمل CL به روش سعادتی و همکاران انجام شد (۱۲).

پادتن مونوکلنال که بر علیه سم استفاده گردیده بود توسط دکتر داناکی (انسیتو تحقیقاتی مردان، انگلستان) تهیه گردید.

اثر سم بر روی شکل و حرکت لوکوسیت

جهت مشاهده حرکت نتروفیل (انسانی و گاوی) از روش Chettibi و همکاران (۵) استفاده شده است در این روش سم فعال و غیر فعال در مجاور نتروفیل قرار گرفت. حرکت سلولها زیر یک میکروسکوپ معکوس که دارای یک جعبه جهت کنترل درجه حرارت بود (۳۷ درجه) بوسیله یک دوربین که به یک کامپیوتر متصل بود مورد بررسی قرار گرفت. کامپیوتر به گونه‌ای برنامه‌ریزی شده بود که ۸۰ سلول را انتخاب می‌نمود. پس از دو دقیقه نتایج را بوسیله مداومت حرکت (P) و حرکت (S) مورد بررسی قرار می‌داد و سپس مقدار ضریب انتشار (D) از معادله $D=S^2$ (1+P) محاسبه گردید.

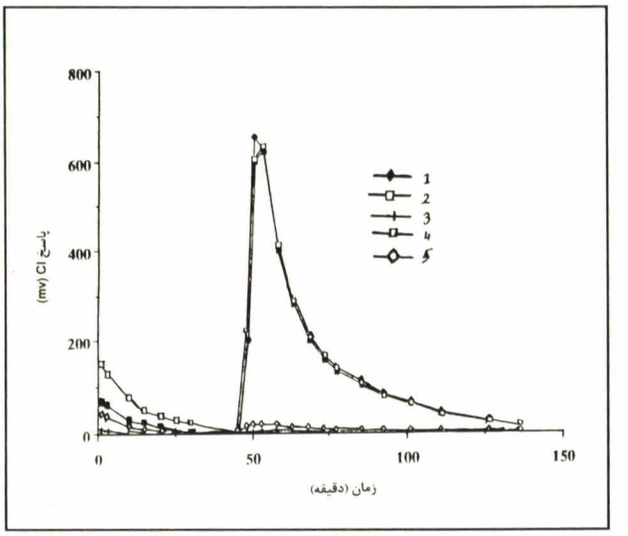
نتایج

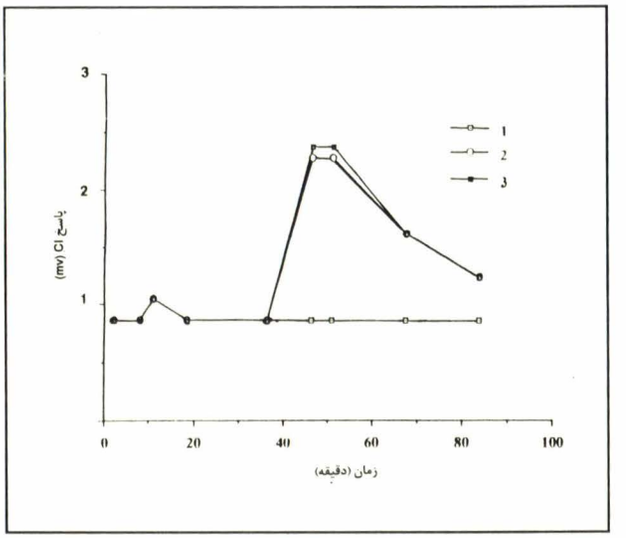
تهیه سم نوترکیبی (rLktA)

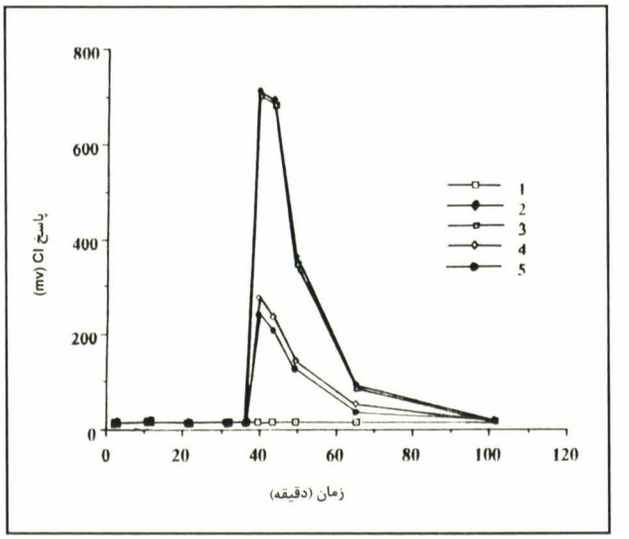
جهت تولید انبوه سم، ژنهای کلون lktA و lktC در سویه‌های مختلف باکتری تولید *E. coli* گردید. سویه HMS175 (دارای پلاسمید pGW42) تولید با وزن پروتئینی مولکولی ۱۰۵ کیلودالتون کرد که این پروتئین با پادتن مونوکلنال که بر علیه سم بوجود آمده واکنش نشان داد (شکل ۱: ستون ۴). سویه SY327λpir (دارای پلاسمید pGW64) تولید سم غیر فعال نمود که این سم از لحاظ وزن مولکولی مشابه وزن مولکولی سم فعال بود (شکل ۱: ستون ۳). زمانی که lktC به همان باکتری منتقل شد سم فعال تولید گردید که باز هم از لحاظ وزن مولکولی تغییری در آن مشاهده نگردید (شکل ۱: ستون ۲). مایع رویی محیط کشت باکتری *P. haemolytica* به عنوان کنترل مورد استفاده گردید (شکل ۱: ستون ۱).

فعالیت سم نوترکیبی

فعالیت سم نوترکیبی که از باکتری *E. coli* به دست آمده بود به وسیله CL-inhibition مورد ارزیابی قرار گرفت. سم پس از مجاورت با نتروفیل گاو به مدت ۴۵ دقیقه به وسیله OZ تحریک گردید. سم فعال قادر به مهار عکس العمل CL نتروفیل بود. هر چند سم غیر فعال در همان غلظت و یا بیشتر (۱-۳۵ µg/ml) قادر به مهار CL نبود. جهت نشان دادن عوامل دیگر باکتری بر CL نتروفیل، rLKtC از باکتری *E. coli* که تنها دارای پلاسمید pGW78 بود تهیه گردید در تمام این آزمایشات اوره در همان غلظتی که در هنگام تهیه سم نوترکیبی وجود داشت به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت تولید سم فعال از سویه HMS174 و یا







شکل ۲- اثر سم تولیدشده از طریق نوترکیبی با استفاده از سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* بر روی CL نتروفیل گاو ۱- عکس‌العمل CL نتروفیل به OZ سم اضافه نشده‌است،کنترل) ۲-عکس‌العمل CL نتروفیل به OZ پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی لیتر سم غیر فعال (PGW64) مجاور شده بود. ۳- عکس‌العمل CL نتروفیل به OZ پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی لیتر سم فعال (pGW42) مجاور شده بود. ۴- عکس‌العمل CL نتروفیل به OZ پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی‌لیترسم غیرفعال (pGW78) مجاور شده بود. ۵- عکس‌العمل CL نتروفیل به OZ پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر سم فعال pGW64 و pGW78) مجاور شده بود.

شکل شماره ۳- اثر مایع رویی محیط کشت باکتری *P. haemolytica* به PMA روی عکس‌العمل CL سلول‌های سرطانی ماکروفاژ موش ۱- محیط کشت BHIB (کنترل) ۲- محیط کشت BHIB همراه با PMA ۳- مایع رویی محیط کشت باکتری *P. haemolytica* همراه با PMA

شکل شماره ۴- اثر سم طبیعی و نیز سم تولید شده از طریق نوترکیبی بر روی CL نتروفیل انسان ۱- عکس‌العمل CL نتروفیل به PMA ۰سم اضافه نشده بود) ۲- عکس‌العمل CL نتروفیل به PMA پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر سم غیر فعال (pGW64) مجاور شده بود. ۳- عکس‌العمل CL نتروفیل به PMA پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر سم غیر فعال (pGW78) مجاور شده بود. ۴- عکس‌العمل CL نتروفیل به PMA پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر سم فعال (pGW42) مجاور شده بود. ۵- عکس‌العمل CL نتروفیل به PMA پس از زمان مشخص که با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر سم فعال (pGW64) همراه با پلاسمید pGW78) مجاور شده بود.

Sy327λ که دارای پلاسمید pGW42 بود بیشتر از سویه‌هایی بود که دارای دو پلاسمید (pGW64، همراه pGW78) بودند (شکل ۲).

فعالیت سم بر روی تولید CL در سلول‌های خونی

جهت نمایش اختصاصی بودن سم بر روی سلولهای خونی نشخوارکنندگان، سلول‌های مختلفی از انسان و حیوانات تهیه و به عنوان سلول هدف در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. سلول گاو، گوسفند و سلول سرطانی لنفومای گاو (BL3) نشخوارکنندگان در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفت. سم توانست که پس از مجاورت با این سلول‌ها در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنها را از بین ببرد (ارزیابی به روش Trypan blue) سلولهای دیگری که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت سلول‌های خونی انسانی، خرگوش، خوکچه هندی و سلولهای سرطانی ماکروفاژ موش (J774.2) بود. اگر چه سلول طبیعی و J774.2 تولید CL ضعیفی ولی منظم نمود لیکن سم طبیعی و نوترکیبی هیچکدام قادر به تخریب این سلولها نبودند (شکل ۳). همچنین این سم هیچ اثری بر نتروفیل‌های خرگوش و خوکچه هندی نداشت (آمار نشان داده نشده است) هر چند گزارشات قبلی دلالت بر اختصاصی بودن این سم بر علیه لوکوسیت نشخوار کنندگان می‌نمود ولی محیط کشت باکتری *P. haemolytica* (مرحله لگاریتمی) و یا سم نوترکیبی بیش از ۵۰٪ عکس‌العمل CL نوتروفیل انسانی را مهار نمود (شکل ۴).

اثر سم بر مهاجرت سلولها

لوکوسیت جدا شده از خون (۸۵٪ نتروفیل و ۱۵٪ مونوسیت و لنفوسیت) در مجاورت غلظتهای مختلفی از سم فعال و غیر فعال قرار داده شد، اما هیچ کدام از این غلظت‌ها روی حرکت نتروفیل‌های گاو اثر مشخصی نداشت. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود پس از مجاورت سم با سلول در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، متورم شدن سلول آغاز و تخریب سلولی شروع شده است (شکل C ۵).

پس از ۵ دقیقه بیش از ۵۰ درصد سلولها تخریب گشته (شکل d ۵) و در کمتر از ۱۵ دقیقه تمام سلولها بوسیله سم فعال تخریب شده‌اند. هر چند سم غیر فعال باهمان غلظت پروتئینی در طی این زمان اثری بر روی سلولهای نتروفیل گاو نداشته است (شکل a ۵) سم قادر به از بین بردن مونوسیت و نتروفیل بود لیکن بر لنفوسیت اثری نداشت و آنها تنها سلولهایی بودند که پس از ۱۵ دقیقه هنوز زنده بودند (شکل C ۵).

اثر سم بر روی سلولهای انسانی متفاوت بود اگر چه سم قادر به از بین بردن نتروفیل انسانی نبود لیکن این سم توانست منجر به حرکت این سلولها شود (جدول ۱). پس از مجاورت سم با نتروفیل انسانی حرکت سلول با سرعت بالا، مداومت حرکت و با ضریب انتشار بالا صورت پذیرفت و این در حالی است که سم غیر فعال باعث شد که نتروفیل انسانی با سرعت نصف سرعت بالا حرکت داشته که این حرکت، فاقد مداومت حرکت و ضریب انتشار بود.

بحث

جهت تولید مقدار زیاد سم ژنهای lktA و lktC به باکتری *E. coli* منتقل گردید. این ژنها مسؤولیت تولید سم فعال را دارا می‌باشند. باکتری در عدم حضور lktC تولید سم غیر فعال می‌نماید. در این مطالعه lktA تنها و یا همراه با lktC به سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* جهت تولید سم نوترکیبی فعال و یا غیر فعال منتقل گردید. سم فعال باعث مهار عکس‌العمل نتروفیل‌های گاو گردید هر چند سم غیر فعال که به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت توانایی مهار CL را نداشته است. تحریک CL در ابتدا به دلیل وجود سم نبوده زیرا همان نتایج با rlktC که فاقد سم می‌باشد به دست آمد. این تحریک باید به دلیل وجود اجزاء باکتری *E. coli* باشد. به دلیل آنکه اوره در تمام مراحل استخراج سم از inclusion body وجود داشت این تحریک باز هم نمی‌تواند به دلیل حضور اوره باشد زیرا اوره به عنوان کنترل در تمام مراحل مورد استفاده قرار گرفت. از آنجایی که غلظت بالای سم منجر به مهار CL می‌شود اثر دیگر اجزاء باکتری *E. coli* که ممکن است توانایی تحریک CL را داشته باشد از بین می‌برد. رقت‌های متوالی از سم توانایی تحریک CL نتروفیل گاوی را نداشت و این باز این عقیده را تقویت می‌کند که تحریک نتروفیل به وسیله اجزاء دیگر باکتری ۰ بروت می‌پذیرد. نتایج فوق با مطالعاتی که Czuprynski و همکارانش در سال ۱۹۹۱ روی سم طبیعی انجام داده‌اند، مطابقت دارد (۸).

فعالیت سم به دست آمده از باکتری *E. coli* که دارای یک پلاسمید بوده بیشتر از باکتری که دارای دو پلاسمید جداگانه بوده‌اند می‌باشد و دلیل آنکه فعالیت سم کم بوده احتمالاً ناشی از وجود دو پلاسمید و دو پروموتر برای ژنهای lktA و lktC می‌باشد. عدم توانایی سم در تخریب این سلولها در خوک، اسب (O'Brien Duffus, ۱۹۸۷) و (۱۱) و نیز در انسان (Kaehler, ۱۹۸۰ و همکاران) (۹) گزارش شده بود. اگر چه در گزارشات قبلی اشاره شده که سم اختصاصاً بر روی لوکوسیت‌های نشخوارکنندگان مؤثر است ولی در این تحقیق نشان داده شد که سم بر روی CL نتروفیل‌های انسانی اثر مهاری داشته است. هر چند اثر آن روی نتروفیل‌های انسانی با اثری که بر روی نتروفیل‌های نشخوارکنندگان داشت متفاوت بوده و حتی دوز بالای سم هم قادر به مهار کامل CL نبود. با استفاده از روش‌های trypan blue dye exclusion و cell tracking assay مشخص گردید که این مهار به دلیل تخریب سلولهای انسانی نبوده است. سم غیر فعال که به عنوان کنترل در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت اثر مهاری و یا تحریکی بر سلولهای انسانی نداشت.

سم طبیعی و یا نوترکیبی اثر مشخص بر حرکت نتروفیل گاوی نداشته است. بلکه باعث تخریب سلولها گردید. Clinkenbeard و همکاران در سال ۱۹۸۹ (۶) با اندازه‌گیری آنزیم لاکتیک دهیدروژناز نشان داده‌اند که سم باعث متلاشی شدن سلول BL3 شده است. در این مطالعه مشاهده شد که سم علاوه بر کشتن نتروفیل باعث مرگ مونوسیت شده ولی اثری بر لنفوسیت‌ها نداشته و اصولاً تنها سلولی بوده که پس از ۱۵ دقیقه زنده مانده بود. این تحقیق نشان می‌دهد که تنها لنفوسیت‌ها مقاوم به سم می‌باشند. چنین اثری از سم تاکنون گزارش نشده است هر چند Majury و Shewen در سال ۱۹۹۱ (۱۴) اثر مهاری سم بر تکثیر لنفوسیت‌ها را گزارش نموده‌اند.

از مجاورت سم با گلبولهای سفید انسانی نتایج بسیار جالبی به دست آمد. اگر چه سم قادر به مهار بخشی از CL نتروفیل‌های انسانی بود لیکن سلولها تخریب نشده بودند در حقیقت سم باعث تحریک مهاجرت این سلولها شده بود. مشابه همین تحریکات که منجر به حرکت نتروفیل شده است با fMLP گزارش شده است (۵). این دلالت براین دارد که سم فعال باعث حرکت سلول در یک جهت در مدت معینی قبل از تغییر جهت شده است. این مهاجرت می‌تواند هم به علت کاهش چسبندگی سلول به آلبومین پوشانده شده و نیز افزایش حرکت سلول باشد. در حالی که سلول در مجاورت سم غیر فعال به سختی به سطح چسبیده و قادر به جابجایی از محل اولیه خود نمی‌باشد.

واکنش‌های ضد التهابی می‌توانند به وسیله گلوکوستروئیدها از طریق جلوگیری از تجمع نتروفیل در محل التهاب سرکوب شوند (۵). احتمالاً اثر سم روی مهاجرت نتروفیل‌های انسانی به عنوان یک ماده ضدالتهاب نیاز به تحقیقات بیشتری دارد زیرا ممکن است حرکات غیر اختصاصی را در میزبان با ممانعت از تجمع آرام در محل التهاب ایجاد نماید.

تشکر و قدردانی

از دکتر G. D. Westrop به دلیل اهداء پلاسمید و دکتر W. Donachie به دلیل اهداء پادتن و دکتر علی هاتف سلمانیان به خاطر مطالعه مقاله و ارائه نظرات اصلاحی تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱- سعادتی، مجتبی؛ پورشفیع، محمدرضا؛ ۱۳۷۶. مطالعه سم تولید شده توسط *P. haemolytica*. پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، زمستان، صفحه ۷۲-۷۷.

2- Baluyut C.S., Simonson R.R., Bemrick W.J. & Maheswaran S.K., 1981. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. American Journal of veterinary Research 42, 1920-1926.

3- Brownlie R.M., Coote J.G., Parton R., Shultz J.E., Rogel A. & Hanski E., 1988. Cloning of the adenylate cyclase genetic determinant of *Bordetella pertussis* and its expression in *E. coli* and *Bordetella pertussis*. Microbia Ipathogenesis 4, 335-344.

4- Chang Y.F., Renshaw H.W. & Augustine J.L., 1985. Bovine pneumonic pasteurellosis: Chemiluminescent response of bovine peripheral blood leukocytes to living and killed *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *E. coli*. American journal of veterinary Research 46, 2266-2271.

5- Chettibi S., lawrence A.J. & Stevenson R.D., 1993. A factor released by monocytes in the presence of dexamethasone stimulates neutrophil locomotion. British journal pharmacology 108, 248-254.

6- Clinkenbeard K.D., Mosier D.A. & Confer A.W., 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infection and immunity 57, 420-425.

7- Coote J.G., 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. Fems microbiology reviews 88, 137-162.

8- Czuprynski C.J., Noel E.J., Ortiz-Carranza O. & Srikumaran S., 1991. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infection and immunity 59, 3126-3133.

9- Kaehler K.L., Markham R.J.F., Muscoplat C.C. & Johnson D.W., 1980. Evidence of species specificity in the cytocidal effeects of *Pasteurella haemolytica* .Infection and immunity 30, 615-616.

10- Murphy G.L., Whitworth L.C., Clinkenbeard K.D. & Clinkenbeard P.A., 1995. Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infection and immunity 63, 3209-3212.

11- O'brien J.k. & Duffus W.P.H., 1987. *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Relative susceptibility of bovine leukocytes. Veterinary microbiology 13, 321-334.

12- Saadati M., Gibbs H.A., Parton R. & Coote J.G., 1997. Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of *Pasteurella haemolytica*. Journal of medical microbiology 46, 1-9.

13- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold spring Harbor laboratory press, cold spring harbor, N.. Shewen, P.E. & Wilkie, B.N. 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. Infection and immunity 35, 91-94.

14- Shewen P.E. & Wilkie B.N., 1982. Cytotoxin of *Pasteurella heamolytica* acting on bovine leukocytes. Infection and immunity 35, 91-94.

15- Strathdee C.A. & Lo R.Y.C., 1989. Regulation of epression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. Journal of Bacteriology 171, 5955-5962.

16- Walker R.D., Hopkins F.M., Schultz T.W., Mccracken M.D. & Moore R.N., 1985. Changes in leukocyte population in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. American Journal of veterinary Research 49, 2429-2433.