

تقييم فعالية الفايكوسيانين (Phycocyanin) كمضاد حيوي ضد البورفيروموناس اللثوية (*Porphyromonas gingivalis*)

ياوز حميد محمود

قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة سامراء، سامراء، العراق

الملخص

البورفيروموناس اللثوية (*Porphyromonas gingivalis*) (*P. gingivalis*) تعد واحدة من المهيمنة الرئيسية لالتهاب دواعم الأسنان المزمن عند البالغين وقد تؤدي في نهاية المطاف إلى مضاعفات صحية وفقدان الأسنان. تم في هذه الدراسة تقييم نشاط البروتين الخام من الفايكوسيانين (C-PC) المستخرج من (*Spirulina platensis*) بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing) كمضاد للميكروبات وفيها استخدمت سلالات ATCC 33277، W50 (Kgp)، W50 (Rgp)، المطفرة من (*P. gingivalis*) لتقييم عمل الفايكوسيانين الخام (Phycocyanin) في تثبيط نمو هذه البكتيريا وبتراكيز مختلفة، وأظهرت النتائج حدوث انخفاض في المساحة السطحية لنمو البكتيريا في سلالات المطفرة ل W50 حيث كانت النتائج أفضل عند استخدام تراكيز أعلى من البروتين الخام الفايكوسيانين (C-PC)، ومن هذا نستدل على انه يمكن استخدام الفايكوسيانين مستقبلا في العقارات التي تعمل على العناية بصحة الفم والأسنان.

المقدمة

تهرب البكتيريا من الجهاز المناعي بالإضافة انه يساعد في عملية البلعمة وبالتالي تزيد من قدرة البكتيريا على أحداث المرض [6].
3. السكريات متعددة الشحوم (LPS - Lipopolysaccharides): وهو عبارة عن احد مكونات الغشاء الخارجي في البكتيريا السالبة لصبغة غرام والتي له دور في عملية اتصال بين الخلايا البكتيرية ومقاومة المضادات الحيوية. وكذلك تعمل كمحفز للالتهابات ولها دورا هاما في مساعدة بقاء البكتيريا والتكيف في الجسم المضيف [1].
4. Gingipains: مجموعة من الأنزيمات التي تحلل البروتينات السيستين (Cysteine) وبذلك تقوم بتحلل بروتينات المضيف. تتواجد هذه البروتينات على سطح الخلية البكتيرية ويعمل على تحلل بروتينات المضيف المناعية والحركيات الخلوية فقد كشفت الدراسات المايكرو بيولوجية إن احد أهم أنواع البكتيريا المسببة للأمراض اللثوية (البورفيروموناس اللثوية) تفرز نوعين من الإنزيم (Gingipain (K and R) اللذين ينشطان آلية التخثر في دم الإنسان مما يساعد على تشكل الجلطات القلبية [7].

إن من الأمراض المهمة التي تحدث نتيجة التهابات في تجويف الفم أي التهاب اللثة (Gingivitis) الذي يسمى أحيانا بمرض اللثة (Gum Disease) أو مرض دواعم السن (Periodontal disease) تصف حالات تراكم طبقة من الجراثيم (Plaques) على سطوح الأسنان، وقد يؤدي في نهاية الأمر إذا لم تتم معالجتها بالطريقة الصحيحة إلى فقدان الأسنان عند البالغين، نتيجة للتلف الذي يصيب الطبقة التي تغلف الأسنان. والتي يمكن أن تسببها البكتيريا البورفيروموناس اللثوية [8] وتساهم العديد من العوامل في تطور أمراض اللثة بما في ذلك العدوى الفيروسية / الفطرية وتعاطي الكحول والتغذية والتوتر النفسي والأمراض المزمنة مثل أمراض القلب والأوعية الدموية (CD) وعدم العناية الكافية بالأسنان وذلك بسبب المستويات

البورفيروموناس اللثوية أو (*P. gingivalis*) هي بكتيريا لاهوائية، سالبة لصبغة غرام وتصنف ضمن البكتيريا التي تعيش في تجويف الفم بشكل طبيعي في حالة التعايش مع المضيف ولكن تكاثرها بأعداد كبيرة بسبب إصابات في النسيج الفموي ومن بينها الالتهاب اللثوي [1] يشكل مستعمرات سوداء اللون على الأسنان بسبب تراكم جزئيات الحديد على سطح الخلايا [2].

البورفيروموناس اللثوية لها القدرة على غزو الخلايا اللثة الطلائية تعمل هذه البكتيريا على إنشاء غشاء حيوي (Biofilm) في طبقة اللثة الباطنية [3] والذي يؤدي الى التهابات قد يتسبب في انفصال الأسنان عن اللثة [4]، ومن أهم العوامل الضراوة (القوقعة) التي تكون مسؤولة عن حدوث الأمراض في جسم المضيف والتمسك وتشكيل المستعمرات داخل التجويف الفموي هي:

1. الزوائد الشعرية (Fimbriae): البورفيروموناس اللثوية تملك نوعين من الزوائد الشعرية، النوع الأول (الكبيرة أو طويلة) التي لها دور في الاستعمار والغزو. وهو تتألف من بروتين تعرف باسم Fim A، أما النوع الثاني (صغير أو قصير) له القدرة على البلعمة وتتكون من بروتين يسمى Mfa [5]. وتساهم هذه الزوائد الشعرية في التصاق البكتيريا ببروتينات اللعابية، وتسهل عملية الغزو وتكاثر البكتيريا المبكرة وتساهم في نهاية المطاف في تشكيل هياكل Biofilm [1].

2. المحفظة متعددة السكريات (Capsule): يحمي مكونات الخلية البكتيرية عن طريق تشكيل غشاء صلب الذي يؤدي إلى تقليل الاستجابة المناعية للمضيف وبالتالي إلى ضعف المضيف. ويعتقد أن المحفظة في البكتيريا من العوامل الرئيسية التي تسبب التهاب اللثة، حيث انه تؤدي إلى عيش البكتيريا لفترة أطول وكذلك يساعد على

تم اخذ 1 مل من البورفيروموناس اللثوية (ATCC 33277, W50) واجريت عليه عملية الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بواقع 11000 دورة في الدقيقة ثم تم إزالة المحلول العالق وإضافة 800 ميكرو لتر من محلول كريبس رينغر الجلوكوز Krebs Ringer (Glucose) ومزج مع البكتريا بشكل جيد واجريت عملية الطرد المركزي لمدة 5 دقائق في 11000 دورة في الدقيقة ثم تم إزالة المحلول العالق وحفظ الراسب في درجة حرارة 37 مئوية لاستخدامها لاحقاً.

لتقييم قدرة البروتين الفايكوسيانين الخام (C-PC) التثبيطية بالنسبة لسلاسل البكتريا من البورفيروموناس اللثوية ATCC 33277, W50 (Kgp⁻)، W50 (Rgp⁻) تم زرعها على مزارع الدم بوجود البروتين وبدون البروتين الفايكوسيانين الخام (C-PC) المستخلص بطريقة الترسيب وبطريقة التجميد والذوبان وحضنت لمدة 6 أيام بدرجة 37 مئوية في ظروف لاهوائية. تم ملاحظة التثبيط والنقاط الصور بواسطة المجهر الضوئي Olympus (SZX9) بقوة تكبير (6.3X)، وقد أجريت تجارب البحث جميعها في مختبرات كلية العلوم بجامعة غازي عنتاب - تركيا.

النتائج والمناقشة

بينت النتائج زراعة السلالات المختلفة لبكتريا *P. gingivalis* (ATCC 33277, W50) والمطفرة (W50 (Kgp⁻), W50 (Rgp⁻)) على مزارع الدم مع الفايكوسيانين الخام (C-PC) وبدونه المستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing) حيث تم ملاحظة نمو البورفيروموناس اللثوية بشكل المستعمرات وتكوين Biofilm من قبل البورفيروموناس اللثوية (ATCC 33277) ولاحظ تثبيط بسيط من قبل الفايكوسيانين لسلاسل من نوع (ATCC 33277) عند زيادة تركيز من 1 ملغم/مل إلى 2 ملغم/مل المستخلص بطريقة التجميد والذوبان (FT) مقارنة بالبروتين المستخلص عن طريق الترسيب (P) كما في الشكل (1)، على العكس من ذلك حيث بينت النتائج تثبيط نمو البورفيروموناس اللثوية في سلسلة المطفرة (W50 (Kgp⁻)) مقارنة مع السلسلة (ATCC 33277, W50) وخصوصاً تم ملاحظة انخفاض كبير في المساحة السطحية لنمو البورفيروموناس اللثوية عند زيادة التركيز الفايكوسيانين الخام (C-PC) من 1 ملغم/مل إلى 2 ملغم/مل المستخلص بطريقة التجميد والذوبان (FT) مقارنة بالبروتين المستخلص عن طريق الترسيب (P)، بالإضافة الى حدوث تثبيط في سلسلة المطفرة (W50 (Rgp⁻)) مقارنة مع السلسلة (ATCC 33277, W50) وكذلك انخفاض في المساحة السطحية البورفيروموناس اللثوية عند زيادة التركيز البروتين من 1 ملغم/مل الى 2 ملغم/مل المستخلص بطريقة التجميد والذوبان (FT) أيضاً ولكن بالنسبة اقل مقارنة مع (W50 (Kgp⁻)) كما موضح في المخطط الإحصائي الشكل D-2.

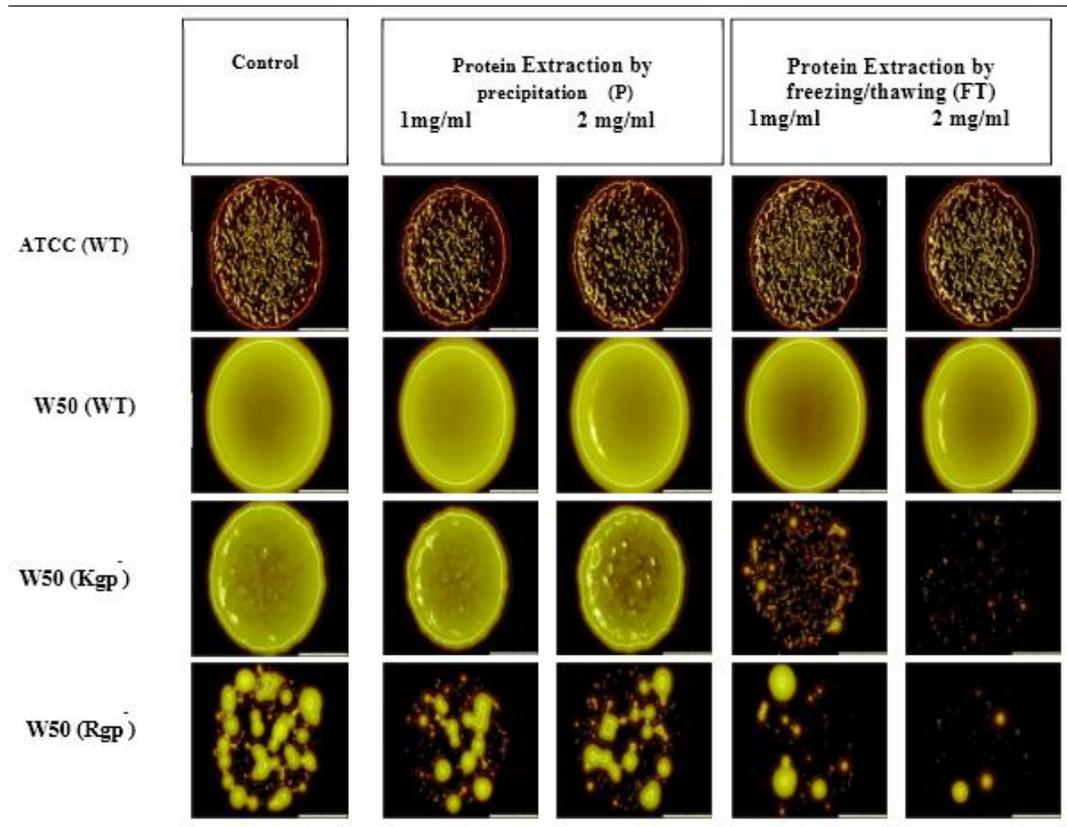
التعليم والفقر (الوضع الاقتصادي والاجتماعي) وعادات التدخين والتي يمكن أن تسبب الحد من وصول الأوكسجين إلى اللثة والأنسجة الفموية المحيطة بها، وبالتالي تمكين البكتريا من غزو هذه المناطق في أي مرحلة من العمر [9]. وتعد البورفيروموناس اللثوية احد الانواع البكتريا التي تسبب امراض اللثة المزمنة، حيث أظهرت الدراسات أن 85% من أمراض اللثة سببها هو البورفيروموناس اللثوية [10].

مادة الفايكوسيانين Phycocyanin هي المادة الزرقاء المميزة لطحلب سبيرولينا ومن هنا جاء اسم الطحالب الخضراء (لوجود الكلوروفيل) المزرق (لوجود الفايكوسيانين) والتي أصبح يعزى إليها العديد من فوائد تناول سبيرولينا وكما أثبتت الدراسات الحديثة أهميتها كمضاد طبيعي للأكسدة وفي دورها في مقاومة والحماية من الجذور الحرة المسببة للعديد من المشاكل الصحية. الفايكوسيانين هو في الأساس phycobiliprotein المنتجة من قبل *Arthrospiraplatensis* المعروفة سابقاً باسم *Spirulina platensis* (S. platensis). وغالبا ما يطلق عليها الطحالب الخضر المزرق التي تستخدم التمثيل الضوئي كمصدر للطاقة [11]. تستخدم الفايكوسيانين في مجالات مختلفة منها في المواد الغذائية وفي صناعة مستحضرات التجميل وكعلاج وفي البحوث الطبية الحيوية. وأثبتت الدراسات السابقة أن الفايكوسيانين له القابلية على منع التهابات [12]. أجريت دراسة حديثة في عام 2013 على الاثر السريري لسبيرولينا المنتجة طبييا على التهابات اللثة، ووجد أن تناول كمية من الفايكوسيانين لها التأثيرات في الوقاية من أمراض الفم مثل التهابات اللثة وتسوس الأسنان، دون أي تأثيرات جانبية ملحوظة على المرضى [13].

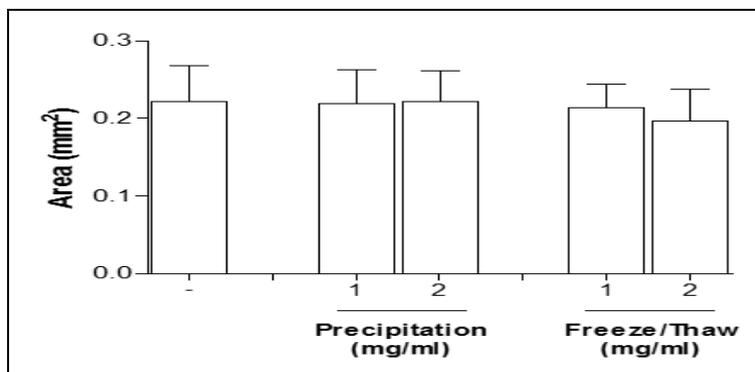
تهدف الدراسة الحالية الى تقييم فعالية الفايكوسيانين الخام (C-PC) والمستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing) كمضاد حيوي ضد سلالات مختلفة من البورفيروموناس اللثوية.

المواد وطرائق العمل

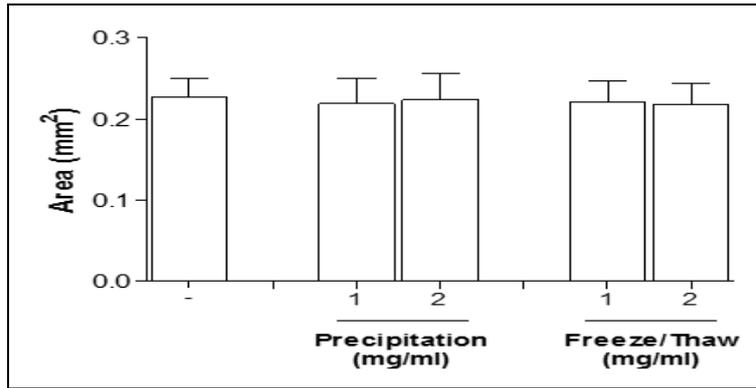
انواع السلالات البكتيرية الطبيعية W50 و ATCC 33277 والسلالات المطفرة (W50 (Kgp⁻)) و (W50 (Rgp⁻)) حيث يفقد الاول الحامض اميني لايسين والثاني الحامض أميني الارجنين بطريقة إسقاط المورثة أو ألجين (knock down) والتي تم الحصول عليها من مستشفى جامعة غازي عنتاب ومزارع الدم التي تم استخدامها تم الحصول عليها من كلية الطب في جامعة غازي عنتاب، اما البروتين المستخدم في البحث (الفايكوسيانين الخام) المستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) بواسطة كبريتات الامونيا وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing) فقد تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة غازي عنتاب.



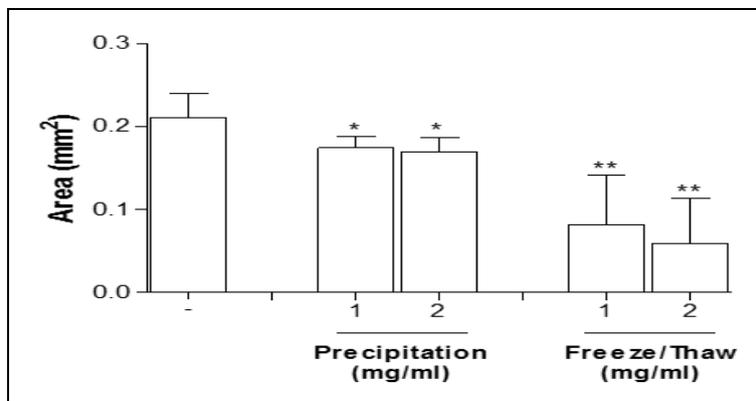
شكل رقم (1): فعالية الفايكوسيانين الخام (C-PC) في تثبيط نمو السلالات البكتريا من البورفيروموناس اللثوية ATCC33277 ، W50 (WT) والمطفرة W50 (Kgp⁻)، W50 (Rgp⁻) المزوعة على مزارع الدم مع الفايكوسيانين الخام (C-PC) وبدونه المستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing)



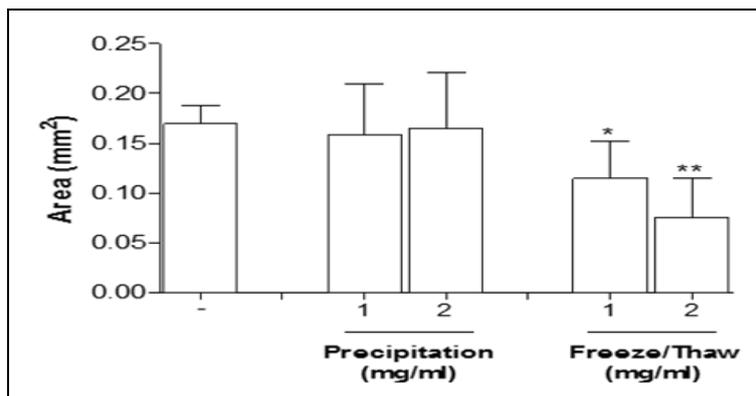
شكل رقم (A-2): الاشرطة البيانية لفعالية الفايكوسيانين الخام (C-PC) في تثبيط البورفيروموناس اللثوية (ATCC) المزوعة على مزارع الدم مع الفايكوسيانين الخام (C-PC) وبدونه المستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing)



شكل رقم (B-2): الاشرطة البيانية لفعالية الفايكوسيانين الخام (C-PC) في تثبيط البورفيروموناس اللثوية (W50) المزوعة على مزارع الدم مع الفايكوسيانين الخام (C-PC) وبدونه المستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing)



شكل رقم (C-2): الاشرطة البيانية لفعالية الفايكوسيانين الخام (C-PC) في تثبيط البورفيروموناس اللثوية (W50 (Kgp) المزوعة على مزارع الدم مع الفايكوسيانين الخام (C-PC) وبدونه المستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing)



شكل رقم (D-2): الاشرطة البيانية لفعالية الفايكوسيانين الخام (C-PC) في تثبيط البورفيروموناس اللثوية (W50 (Rgp) المزوعة على مزارع الدم مع الفايكوسيانين الخام (C-PC) وبدونه المستخلص بطريقة الترسيب (precipitation) وبطريقة التجميد والذوبان (freezing/thawing)

بطريقة التجميد والذوبان اكبر مقارنة بالفايكوسيانين المستخلص بطريقة الترسيب حيث تم استخدام المادة الكيميائية كبريتات الأمونيوم التي قد اثرت سلبا على فعلية البروتين وهذا يدل على أن البروتين المستخلص بطريقة التجميد والذوبان كانت أكثر فعالية وبالإضافة إلى أنه كلما زاد

اظهرت نتائج الدراسة الحالية قدرة الفايكوسيانين على تثبيط البكتريا بنسب متفاوتة وكانت نسب التثبيط الاكبر عند معاملة البكتريا بتركيز 2ملغم/مل نسبة إلى تركيز 1ملغم/مل. حيث كانت نسبة التثبيط في سلالة (W50) باستخدام الفايكوسيانين تركيز 2 ملغم/مل والمستخلص

أظهرت نتائج دراسة قام بها [16] Antelo et al. في عام 2010 أن أفضل تركيز ونقاء لاستخلاص البروتين الفايكوسيانين (C-PC) تم الحصول عليه باستخدام الأنظمة ذات مرحلتين المائية (Aqueous Two-Phase Systems)، ووفقاً لهذه الأدلة إلى جانب النتائج التي تم الحصول عليها، يمكننا أن نفترض أن عملية تنقية البروتين الفايكوسيانين له دور كبير وفعال في الحصول على نتائج أفضل في تثبيط نمو البكتريا والذي يؤدي إلى تحقيق تقدم في الحفاظ على صحة الأسنان في المجتمع بتكاليف بسيطة وبدون الحاجة إلى عمليات جراحية باهظة الثمن. وتشير منظمة الصحة العالمية إلى أن علاج المشاكل التقليدية التي تصيب الأسنان تشكل عبئاً اقتصادياً فادحاً على عائق الكثير من البلدان ذات الدخل المرتفع، حيث يشكل نفقات صحة الفم حوالي 5% إلى 10% من مجموع النفقات الصحية العامة أما في البلدان ذات الدخل المنخفضة والمتوسطة فإن البرامج العامة لصحة الفم لا تزال نادرة أو غير موجودة ويمكن باتخاذ تدابير جادة في مجال الوقاية وتعزيز الصحة تلافياً للتكاليف الباهظة المرتبطة بعلاج الأسنان بالإضافة إلى التخلص من العوامل الخطرة ذات صلة بالأمراض المزمنة الرئيسية الأربعة الأمراض القلبية الوعائية والسرطان والأمراض التنفسية المزمنة والسكري، وكثيراً ما توجد علاقة بين أمراض الفم والأمراض المزمنة التي تسببها التهابات اللثة والتي قد يصعب علاجها، حيث أن معدل انتشار أمراض الفم أكثر ارتفاعاً نسبياً بين الرجال والمسنين والفئات ذات المستوى التعليمي المتدني والدخل المنخفض [17].

تركيز الفايكوسيانين كانت النتائج عملية تثبيط نمو البكتريا أفضل، وبينت الدراسات الجينية التي أجريت على سلالات المختلفة من البورفيروموناس اللثوية مثل (ATCC 33277, 381, W50, W83) إلى وجود تشابه في الكروسومات بنسبة 93% وهنالك اختلاف بينهما بنسبة 7% [14].

أوضحت الدراسة الحالية، أن الفايكوسيانين (C-PC) يمكن استخدامها كعلاج للقضاء على *P. gingivalis*، والتي تعد واحدة من الأسباب الرئيسية للتهاب اللثة، وأن وجود كل من (Arg-X, Lys-X) البروتينات السيستين يؤدي إلى ضعف في الجهاز المناعي للمضيف وعدم وجوده يقلل من عملية غزو البكتريا *P. gingivalis* لتجويف الفم وهذا دليل واضح على أن كل من (Arg-X, Lys-X) هي من عوامل الضراوة (الفوعة) الأساسية التي تسبب المرض.

أثبتت إحدى الدراسات التي أجريت على مجموعة مختلفة من أنواع البكتيرية مثل (*Escherichia coli*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*) المسببة للأمراض المختلفة قابلية الفايكوسيانين (C-PC) على تثبيط نمو جميع أنواع البكتريا المذكورة ولكن بدرجات مختلفة [15]، ولابد من إشارة إلى إن الفايكوسيانين (C-PC) التي تم استخدامها في هذه الدراسة هو من النوع الخام (crude) وليس من النوع النقي (pure) وقد يكون ذلك اثر سلبي على نشاط الفايكوسيانين كمادة مثبطة بما يحوي هذا النوع الخام (crude) على مواد كيميائية قد تؤثر على نشاط البروتين في عملية تثبيط نمو البكتريا.

المصادر

1. Bostanci, N. & Belibasakis, G. (2012). *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiol. Lett., 333, 1-9.
2. Smalley, J. W., Birss, A. J., Szmigielski, B., & Potempa, J. (2006). The HA2 haemagglutinin domain of the lysine-specific gingipain (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* promotes micro-oxo bishaem formation from monomeric iron (III) protoporphyrin IX. Microbiology, 152, 1839-1845.
3. Katz, J., Onate, M. D., Pauley, K. M., Bhattacharyya, I., & Cha, S. (2011). Presence of *Porphyromonas gingivalis* in gingival squamous cell carcinoma. Int. J. Oral, Sci., 3, 209-215.
4. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J. Clin. Microbiol. 43, 5721-5732.
5. Enersen, M., Nakano, K., & Amano, A. (2013). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. J. Oral Microbiol. 5-11.
6. Singh, A., Wyant, T., Anaya-Bergman, C., Aduse-Opoku, J., Brunner, J., Laine, M. L., Lewis, J. P. (2011). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. Infect Immun, 79, 4533-4542.
7. Genco, C. A. P. J. M. Pawlinska, J. & Travis, J. (1999). Role of Gingipains R in the Pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis*-Mediated Periodontal Disease. CID, 28, 456-465.
8. Genco, R. J., & Williams, R. C. (2010). Periodontal Disease and Overall Health: A Clinician's Guide. Pennsylvania, USA: Professional Audience Communications, Inc.
9. Dyke, T. E. V. & Dave, S. (2005). Risk Factors for Periodontitis. J. Int. Acad. Periodontol., 7, 3-7.
10. Tribble, G. D. Kerr, J. E., & Wang, B.Y. (2013). Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. Future Microbiol., 8, 607-620.
11. Vincent, W. F. (2009). Cyanobacteria. QC, Canada: Elsevier Inc. Wenk, Markus R, & Fernandis, Aaron Zefrin. (2007). Protein Purification. A manual for Biochemistry protocols (Vol. 3, pp. 1-11): World Scientific Publishing Co. Ptc. Ltd.
12. Ramirez, D., Ledon, N., & Gonzalez, R. (2002). Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. Med. Inflamm. 11, 81-85.
13. Mahendra, J., Mahendra, L., Muthu, J., John, L., & Romanos, G. E. (2013). Clinical effects of subgingivally delivered spirulina gel in chronic

periodontitis cases: a placebo controlled clinical trial. J. Clin. Diag. Res. 7, 2330-2333.

14. Chen, T., Hosogi, Y., Nishikawa, K., Abbey, K., Fleischmann, R. D., Walling, J., & Duncan, M. J. (2004). Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol, 186, 5473-5479.

15. Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M., & Selvakumar, G. (2012). Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin

from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. J. Algal Biomass, 3, 7-11.

16. Antelo, F. S., Anschau, A. Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2010). Extraction and Purification of C-phycocyanin from *spirulina platensis* in conventional & integrated aqueous Two-Phase systems. J. Braz. Chem. Soc., 21, 921-926.

17. World Health Organization (WHO). (2012). Oral Health, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318>

Evaluation the effectiveness of Phycocyanin as antibiotic against *Porphyromonas gingivalis*

Yawooz Hameed Mahmood

Biology Department , Education College , Samarra University , Samarra , Iraq

Abstract

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) is considered as one of the major causes for periodontitis that eventually lead to health complications and teeth loss. In this study, crude protein extract of phycocyanin (C-PC) from *Spirulina platensis* that extract by precipitation and freezing/thawing methods, was assessed for its antimicrobial activity against its growth ATCC 33277, W50 wild type and W50 (Kgp⁻) W50 (Rgp⁻) mutant type *P. gingivalis* strains were used to evaluate C-PC action in the bacterial inhibition at different concentrations. The results showed that there was a decrease in ratio of the surface area for growth of bacteria has encountered in the W50 mutation strain at higher concentrations. This knowledge can be useful for the development of new oral hygienic treatments containing C-PC in the future.