

## اثر توکسین‌های A و B سبک وزن کلستریدیوم دیفیسیل در لوپ گره زده شده روده خرگوش و کشت سلولی رده BK

رضانعلی عطانی<sup>۱</sup> و دکتر قربان بهزادیان نژاد<sup>۲</sup>

### خلاصه

کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان عامل مهم کولیت با غشای کاذب شناخته شده است. این باکتری دو توکسین A و B تولید می‌کند. توکسین A یک آنروتوکسین - سیتوتوکسین است و توکسین B یک سیتوتوکسین قوی می‌باشد. این توکسین‌ها در ایجاد بیماری دخالت دارند. در این تحقیق اثرات هیستوپاتولوژیک توکسین‌های A و B با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰ kDa از طریق اندازه‌گیری زمان لازم برای ایجاد پاسخ توکسین‌ها در لوپ گره زده شده ایلئوم خرگوش و نیز کشت سلولی رده BK (bovine kidney) مطالعه شد. غلظت ۱-۱۰ μg/ml توکسین A با وزن مولکولی ۵۲ kDa در لوپ گره زده شده (۶ خرگوش که در هر یک حداکثر ۱۵ لوپ تشکیل داده می‌شد)، تغییرات هیستوپاتولوژیک را به دنبال داشت. این تغییرات شامل التهاب، تجمع مایعات غیر خونی و خونی و تخریب مخاط و پرزهای روده بود. اما غلظت‌های مختلف توکسین B با وزن مولکولی ۶۰ kDa باعث تجمع مایعات غیر خونی یا خونی در لوپ روده نشد، بلکه باعث خشک شدن و نکروز شدید آنها گردید. همچنین غلظت‌های مختلف (۱-۱۰ μg/ml) توکسین B در کشت سلولی باعث ایجاد اثرات سیتوپاتیک گردید. اثرات پاتولوژیک ایجاد شده در کشت سلولی شامل چروکیدن غشای سلولی، گرد شدن و کنده شدن آنها از بستر کشت بود. با افزایش غلظت توکسین شدت و سرعت ایجاد ضایعات پاتولوژیک نیز افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم دیفیسیل، کولیت با غشای کاذب، توکسین A و B، لوپ ایلئوم خرگوش، کشت سلولی

## مقدمه

عامل مهم اتیولوژی کولیت و کولیت با غشای کاذب در انسان کلسترییدیوم دیفیسیل است (۶،۱۴). بررسی‌های انجام شده در برخی کشورهای غربی نشان می‌دهد که ۹۰٪ کودکان با این باکتری آلوده می‌شوند و در ۷۸٪ موارد علائم اسهال، اسهال خونی، کولیت و کولیت با غشای کاذب را نشان می‌دهند. میزان مرگ و میر کودکان مبتلا به کولیت با غشای کاذب تا ۳۰٪ گزارش شده است (۲). در ۱۰٪ افراد مصرف کننده آنتی‌بیوتیک‌ها نیز ابتلا به کولیت و کولیت با غشای کاذب وجود دارد (۸).

عامل ایجاد کننده علائم بالینی، اگزوتوکسین‌هایی است که باکتری ترشح می‌کند و توکسین A (انترتوکسین - سیتوتوکسین) و توکسین B (سیتوتوکسین) نام گرفته‌اند. عقیده بر این است که توکسین‌ها هم در پاتونوز بیماری و هم در کلونیزاسیون باکتری در دستگاه گوارش دخالت دارند (۵). به علاوه نقش این باکتری در زمینه سازی سرطان‌های دستگاه گوارش، کبد و دستگاه تناسلی زنان نیز مطرح شده است (۱۰).

پژوهشگران مختلفی اقدام به خالص سازی توکسین‌های A و B نموده و وزن مولکولی بسیار متفاوتی برای این توکسین‌ها گزارش کرده‌اند (۲۳،۲۴). افزون بر این، اثرات پاتولوژیک و هیستولوژیک توکسین‌ها توسط افراد مختلفی مطالعه شده است. از جمله میشل (Mitchell) و همکاران که اثرات پاتولوژیک توکسین A با وزن مولکولی ۳۵۰ KDa و توکسین B با وزن مولکولی ۲۳۰ KDa را نشان داده‌اند (۱۹،۲۰،۲۱). همچنین در تحقیق دیگری اثرات پاتولوژیک و هیستولوژیک توکسین A با وزن مولکولی ۴۵۰ KDa در لوپ روده خرگوش و کشت سلولی نشان داده شده است (۱۵). بانو (Banno) و همکاران نیز اثرات پاتولوژیک توکسین A با وزن مولکولی ۵۰۰ KDa و توکسین B با وزن مولکولی ۶۰۰ KDa را نشان دادند (۳). با توجه به این که اوزان مولکولی به کار رفته بیش از ۱۰۰ KDa بوده است و تاکنون بررسی اثرات پاتولوژیک و هیستولوژیک توکسین‌های A و B با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰ KDa گزارش نشده است، هدف این تحقیق، بررسی پاتولوژیک و هیستولوژیک توکسین A (با وزن مولکولی ۵۲ KDa) و توکسین B (با وزن مولکولی ۶۰ KDa) کلسترییدیوم دیفیسیل در مدل حیوانی و نیز کشت سلولی رده BK می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

آزمایش بر روی ۶ خرگوش سفید آزمایشگاهی به وزن ۱/۲-۱/۵ کیلوگرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده

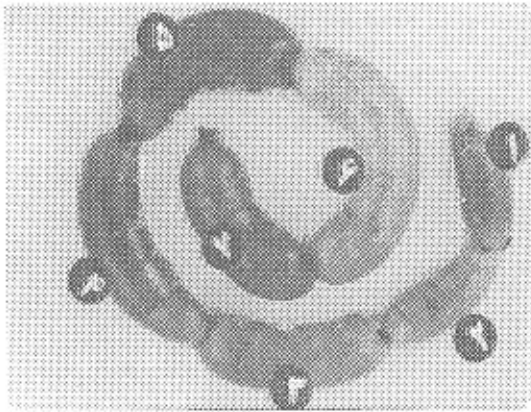
بودند، انجام گرفت. همچنین رده کشت سلولی BK از مؤسسه رازی، توکسین‌های A و B کلسترییدیوم دیفیسیل با وزن مولکولی ۵۲ و ۶۰ کیلودالتون، خالص شده در دانشگاه تربیت مدرس (۱)، اثر از کارخانه مرک، آنتی توکسین اختصاصی و سدیم نمبوتال (Sodium nembotal) از کمپانی سیگما، آمپول دیازپام ۵ واحدی، جنتامایسین ۴۰ واحدی، سرم قندی ۱۰٪، سرم فیزیولوژی، بتادین و الکل طبی از شرکت داروسازی رازی، فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرومتری از شرکت سارتریوس، نخ بخیه (Silk 2-0) و سرنگ با حجم‌های مختلف از شرکت سوپا تهیه گردید.

## بررسی اثرات پاتولوژیک توکسین‌های A و B در لوپ ایلئوم خرگوش

برای تعیین اثرات پاتولوژیک غلظت‌های مختلف توکسین‌های A و B، از لوپ گره زده شده ایلئوم خرگوش استفاده شد. در مجموع از ۶ خرگوش و در هر خرگوش حداکثر ۱۵ لوپ استفاده گردید. بدین ترتیب که حیوان به مدت ۱۲ ساعت تحت رژیم غذایی فقط آب قرار داده شد تا محتویات روده کوچک تخلیه گردد. پس از آن تحت شرایط بیهوشی (۶ ml/kg) محلول سدیم نمبوتال ۳۵ mg/ml و در ادامه با اثر شکم حیوان باز گردید و از ناحیه ایلئوم روده باریک به فواصل ۳-۵ سانتی متر با نخ سبک ۰-۲ گره‌هایی زده شد (حداکثر ۱۵ لوپ). سپس یک میلی لیتر از هر یک از غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر از توکسین‌های A و B تهیه و به طور جداگانه به لوپ‌های روده تزریق گردید. در هر مورد نیز یکی از غلظت‌ها به همراه هم حجم آن آنتی توکسین به یکی از لوپ‌های همان حیوان به عنوان کنترل منفی تزریق شد. در پایان، محل جراحی بخیه و پس از به هوش آمدن حیوان، هر ۲ ساعت ۰/۵ میلی لیتر دیازپام ۵ mg/ml و ۱۰ واحد جنتامایسین در ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی از طریق ورید بناگوشی که برانولی در آن قرار داده شده بود، به حیوان تزریق می‌گردید. پس از ۴ تا ۲۴ ساعت، تحت بیهوشی عمیق، بخیه‌ها مجدداً باز و لوپ‌های تیمار شده خارج گردید. محتویات آنها تخلیه و با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. لوپ‌ها در محلول ۱۰٪ فرمالدئید به مدت یک هفته فیکس شدند. سپس بافت‌های فیکس شده سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. آن گاه به منظور آب‌گیری، بافت‌ها به مدت یک ساعت در هر یک از غلظت‌های ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ اتانول قرار داده شدند. پس از آن برای شفاف کردن، بافت‌ها به مدت یک ساعت در گزیریل ۱۰۰٪ قرار گرفتند (این

توکسین نیز میزان تجمع مایعات افزایش یافت. چنانچه در شکل ۱ نشان داده شده است، غلظت‌های مختلف اثرات متفاوتی به جای گذاشته‌اند.

در مطالعه بافت‌شناسی، اثر پاتولوژیک ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر توکسین ۸ پس از ۴ ساعت، باعث تخریب مخاط سلول‌های اپی تلیال سطح پرزهای روده، ارتشاح سلول‌های نوتروفیل و منونوکلتر در مخاط سطحی و نیز تجمع مایعات خون‌آلود گردید (شکل ۲، تصویر ۱)، و پس از ۶ ساعت باعث شکستن پیل‌ها و تورم عروق خونی شد (شکل ۲،



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف توکسین ۸ در لوپ ایلئوم خرگوش. لوپ شماره ۱ با  $1\mu\text{g/ml}$  و لوپ شماره ۲ با  $5\mu\text{g/ml}$  توکسین ۸ و هم حجم آنتی توکسین تیمار شده‌اند. لوپ شماره ۳ با  $4\mu\text{g/ml}$  لوپ شماره ۴ با  $5\mu\text{g/ml}$  لوپ شماره ۵ و ۷ با  $10\mu\text{g/ml}$  و لوپ شماره ۶ با  $2\mu\text{g/ml}$  توکسین ۸ تیمار شده‌اند.

تصویر ۲). پس از ۹ ساعت تخریب کامل پرزهای روده به همراه نکروز و خون‌ریزی در ناحیه Lamina Propria دیده شد (شکل ۲، تصاویر ۳ و ۴).

تزریق غلظت‌های مختلف توکسین B پس از ۴ ساعت بدون تجمع مایعات یا مایعات خون‌ریزی دهنده باعث تخریب مخاط و نکروز پیل‌ها گردید و پس از ۶ ساعت بر شدت آن افزوده شد (شکل ۳). شدت تخریب و نکروز به حدی بود که رنگ طبیعی بافت کاملاً تغییر کرده بود.

اثر غلظت‌های مختلف توکسین B در لوپ روده خرگوش باعث تجمع مایعات نشد، بلکه در فاصله کمتر از ۴ ساعت باعث خشک شدن لوپ‌ها همراه با نکروز شدید پرزهای آن گردید (شکل ۳). بررسی بافت‌شناسی نشان می‌دهد، ۲ میکروگرم توکسین B پس از ۴ ساعت باعث تغییر شکل پیل‌ها، تخریب و

عمل سه بار تکرار گردید). بعد از آب‌گیری و شفاف کردن بافت‌ها با قرار دادن هر یک از آن‌ها به مدت یک ساعت در پارافین مذاب ( $50-60$  درجه سانتی‌گراد) بلوک تهیه گردید. برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون از هر یک از بلوک‌ها تهیه و با انتقال بر روی اسلاید و فیکس کردن آنها، با روش گیمسا - اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. با مشاهده میکروسکوپی، اثرات پاتولوژیک توکسین‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

### بررسی اثر غلظت‌های مختلف توکسین‌های A و B بر کشت سلولی رده BK

به منظور بررسی اثر این توکسین‌ها بر کشت سلولی، ابتدا استوک کشت سلولی را تریپسینه ( $4\text{mg/lit}$ ) کرده و سوسپانسیون حاوی  $10^5$  سلول در میلی لیتر تهیه گردید. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون فوق را در لوله‌های  $10 \times 1/2$  سانتی متری ریخته و به صورت خوابیده در اتاق کشت سلول به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن یک لایه سلول متراکم در ته لوله تشکیل شد. سپس سری‌های چهارتایی لوله کشت سلولی انتخاب و مایع رویی آنها تخلیه گردید. به هر یک از آنها غلظت‌های توکسین‌های A و B اضافه گردید. با حرکت دادن لوله تمام سطح سلول‌ها پوشانده شد. برای هر یک از سری‌ها، کنترل منفی (به هر یک از غلظت‌های توکسین هم حجم آن آنتی توکسین اضافه گردید)، همچنین یک سری چهارتایی لوله کشت سلولی بدون این که با توکسین تیمار شوند، به عنوان کنترل سلول نیز به کار رفت. پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری لوله‌های تیمار شده، محیط کشت سلول حاوی ۳٪ سرم گوساله به هر یک از لوله‌ها اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۵، ۲۵، ۱۰، ۱۰، ۲۰، ۲۰، ۱۲، ۲۴ ساعت با میکروسکوپ معکوس (اینورت) مورد بررسی قرار گرفتند. با مشاهده اثرات سیتوپاتیکی (Cytopathic effects) و شمارش تعداد سلول‌های گرد (دفرمه) شده، اثر هر یک از غلظت‌ها بر کشت سلولی بررسی شد.

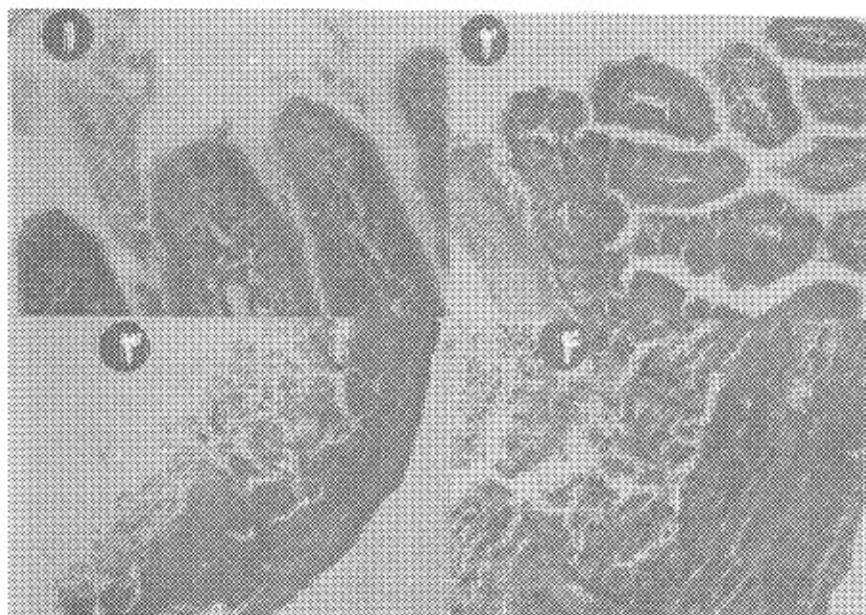
### نتایج

تزریق غلظت‌های  $10$ ،  $5$ ،  $4$ ،  $3$ ،  $2$ ،  $1$  میکروگرم توکسین A حداقل پس از ۴ ساعت باعث بروز اثرات پاتولوژیک گردید که با تجمع مایعات خون‌ریزی دهنده همراه بود و پس از ۱۲ ساعت بر شدت آن افزوده شد و تا ۲۴ ساعت بعد به حداکثر رسید (در هر لوپ ۷ میلی لیتر مایع جمع شد). همچنین با افزایش غلظت

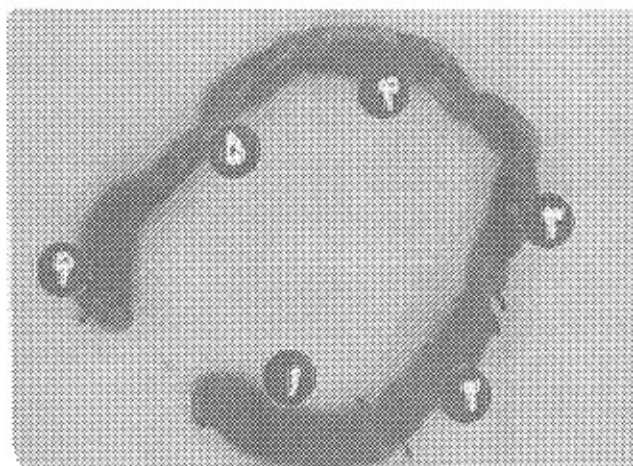
نکروز آنها می‌گردد (شکل ۴).

اثر غلظت‌های مختلف توکسین B بر کشت سلولی نشان داد که با افزایش غلظت سم بر سرعت و شدت ظهور علائم سیتوپاتیک (گرد شدن سلول‌ها و کنده شدن آن‌ها از بستر) افزوده می‌گردد، چنانچه تیمار کشت سلولی با ۱ میکروگرم توکسین B پس از ۱۵ دقیقه باعث ایجاد علائم پاتولوژیک در سلول‌های رده BK گردید و پس از ۳۰ دقیقه باعث مرگ ۵۰٪ سلول‌ها شد و پس از ۶۰ دقیقه تقریباً کل سلول‌ها را از بستر کشت کنده و از بین برد

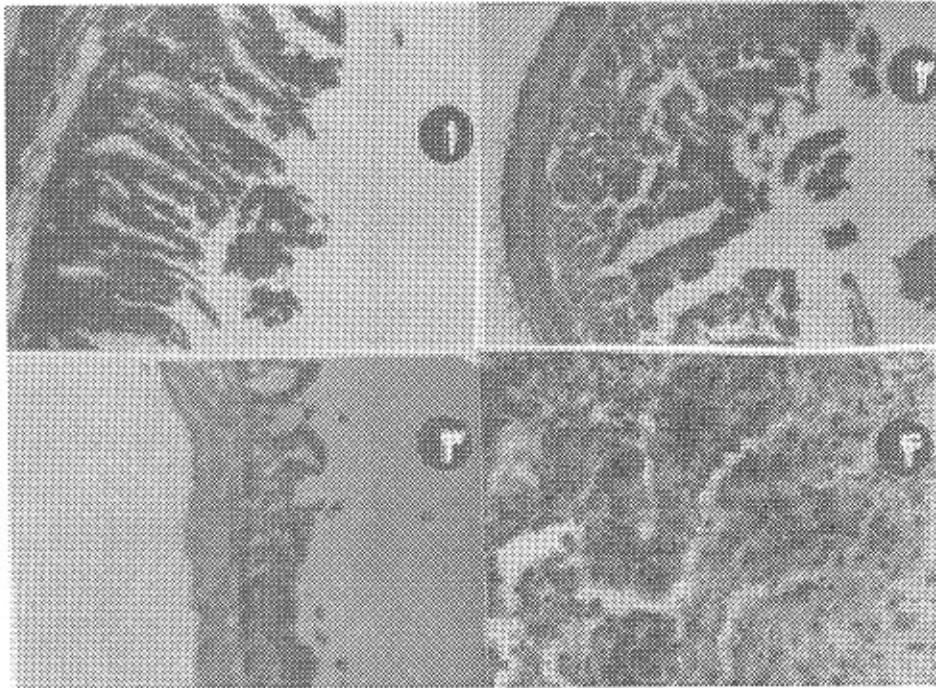
(شکل ۵، تصاویر ۱ تا ۴). اثر غلظت‌های بیش از ۱ میکروگرم توکسین B اثرات مشابهی، اما در مدت زمان کمتر به جای گذاشت. به طوری که ۱۰ میکروگرم توکسین B بعد از ۱۵ دقیقه باعث گرد شدن (Rounding) صد درصد سلول‌ها گشت. افزون بر این، اثرات مشابهی نیز با غلظت‌های مختلف توکسین A، اما در زمان طولانی‌تر مشاهده گردید. در حالی که در لوله‌های کنترل سلول و کنترل منفی اثر سیتوپاتیک مشاهده نشد.



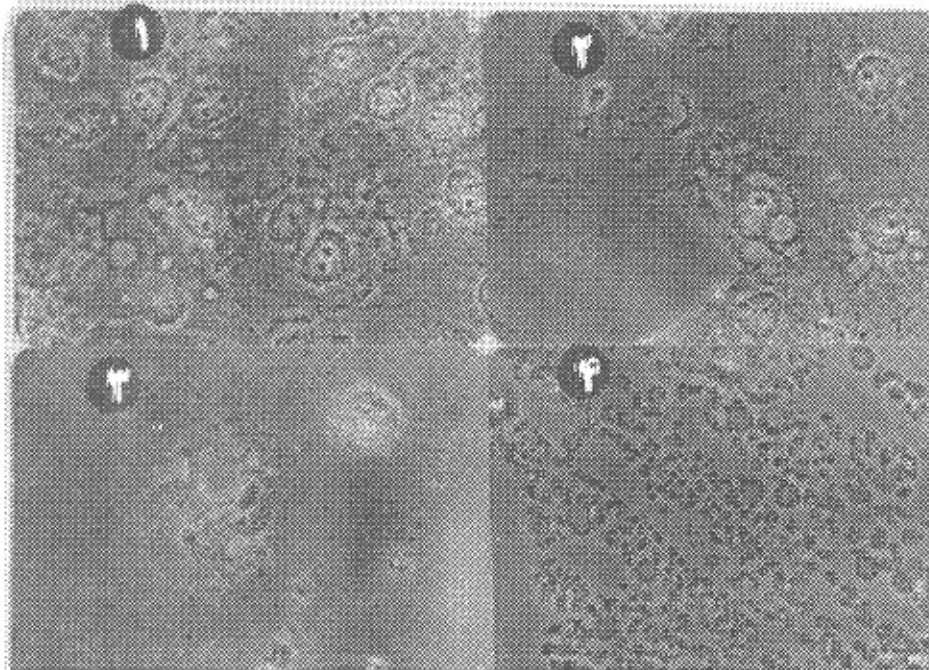
شکل ۲: اثر ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توکسین A در لوب ایلئوم خرگوش پس از ۹، ۶، ۴ ساعت. تصویر ۱: لوب تیمار شده پس از ۴ ساعت، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. تصویر ۲: لوب تیمار شده پس از ۶ ساعت، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر. تصویر ۳: لوب تیمار شده پس از ۹ ساعت، بزرگنمایی ۴۰ برابر. تصویر ۴: لوب تیمار شده پس از ۹ ساعت، بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر.



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف توکسین B در لوب ایلئوم خرگوش. لوب‌های شماره ۱ و ۶ با ۱ μg/ml، لوب شماره ۲ با ۲ μg/ml، لوب شماره ۳ با ۳ μg/ml، لوب شماره ۴ با ۴ μg/ml و لوب شماره ۵ با ۵ μg/ml توکسین تیمار شده‌اند.



شکل ۴: اثرات هیستوپاتولوژیک توکسین B در لوپ اپیتوم خرگوش پس از ۴ ساعت را نشان می‌دهد. تصویر ۱ لوپ تیمار شده با  $2 \mu\text{g/ml}$  توکسین B بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. تصویر شماره ۲ لوپ تیمار شده با  $2 \mu\text{g/ml}$  توکسین B، بزرگنمایی ۳۰۰. تصویر شماره ۳ لوپ تیمار شده با  $4 \mu\text{g/ml}$ ، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر و تصویر شماره ۴ لوپ تیمار شده با  $5 \mu\text{g/ml}$  توکسین B، بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر.



شکل ۵: اثر  $1 \mu\text{g/ml}$  توکسین B بر کشت سلولی رده BK در زمان‌های مختلف. تصویر ۱: بعد از ۱۵ دقیقه، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. تصویر ۲: پس از ۳۰ دقیقه، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. تصویر ۳: پس از ۶۰ دقیقه، بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر. تصویر ۴: سلول‌های تیمار شده بعد از ۱ ساعت از بسترننده شده و به صورت غوطه‌ور در مایع رویی قرار گرفته‌اند، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر.

## بحث

نتایج اثرات هیستوپاتولوژیک توکسین های A و B کلستریديوم ديفيسيل در لوپ ایلئوم گره زده شده خرگوش نشان داد که غلظت های مختلف توکسین A اثرات هیستوپاتولوژیک شدیدی در روده حیوان به جای می گذارند و این اثرات با تجمع مایع یا مایعات خون آلود همراه است (شکل ۱). در حالی که غلظت های مختلف توکسین B بدون تجمع مایعات باعث تخریب سلول های مخاطی و نکروز پیلای ها می شود (شکل های ۳ و ۴). در این زمینه نتایج تحقیقات پژوهش گران متفاوت است. چنانکه لیما (Lima) و همکاران نشان دادند  $10 \mu\text{g/ml}$  توکسین A با وزن مولکولی  $450 \text{ KDa}$ ، بعد از ۲ ساعت بدون تجمع مایعات، اثرات پاتولوژیک (تخریب مخاط و ارتشاح سلولی) ایجاد می کند و برای ایجاد ضایعات همراه با تجمع مایعات به  $50 \mu\text{g/ml}$  توکسین A نیاز است، ولی هیچ یک از غلظت های توکسین B با وزن مولکولی  $500 \text{ KDa}$  در لوپ روده خرگوش اثرات پاتولوژیک به جای نمی گذارد (۱۵). در حالی که لایرلی (Lyerly) و همکاران نشان دادند که توکسین A با وزن مولکولی  $550 \text{ KDa}$  بدون ایجاد ضایعات پاتولوژیک، بعد از ۹۰ دقیقه اثرات ترشحي به جای می گذارد (۱۶). مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج سایر پژوهش ها نشان می دهد، برای بروز علائم پاتولوژیک در روده خرگوش به مقدار کمتری سم نیاز است. این امر مؤید آن است که توکسین با وزن مولکولی  $52 \text{ KDa}$  فعال تر است. در هر حال علت تفاوت وزن مولکولی توکسین ها در سویه های مختلف ناشناخته است که شاید به دلیل ویژگی سویه های تولید کننده باشد.

در هر حال نشان داده شده است که تجمع مایعات یا مایعات خون ریزی دهنده در روده ناشی از تغییرات بافتی است. با توجه به اطلاعات موجود، نمی توان ادعا کرد، که دفع سدیم و مایعات ناشی از تحریک مکانیسم های فعال یا ضایعات بافتی ایجاد شده است. چند آنزیم توکسین / سیتوتوکسین دیگر که باعث تغییراتی مشابه تغییرات حاصل از توکسین A و نیز انتقال یون ها می گردند وجود دارد. به نظر می رسد تغییرات ساختمانی بافت روده (شکل های ۲ و ۴) منجر به القاء تخریب بافت و ترشح مایعات گردد. ورنه (Vernet) و همکاران نیز نشان دادند که توکسین B در سکوم هامستر باعث ایجاد ضایعه ای نمی گردد در حالی که توکسین A کشنده است (۲۶). افزون بر این لایرلی و همکاران نشان دادند با آن که توکسین A مسؤول ایجاد علائم پاتولوژیک است ولی اگر مقدار کمی توکسین B نیز همراه آن باشد، اثرات پاتولوژی شدیدی به وجود می آید (۱۷). با آن که این پژوهش گران اثر هم افزایی توکسین ها را در هامستر نشان دادند،

اما دلیلی بر عدم وجود ضایعات پاتولوژیک در روده حیواناتی که هر دو توکسین وجود دارند، ارائه ندادند. افزون بر این، علاوه بر تفاوت حساسیت حیوانات، معلوم نیست، چرا بچه هایی که غلظت توکسین ها در آنها معادل غلظت توکسین ها در افراد بزرگسال مبتلا به کولیت با غشای کاذب است، فاقد علائم بالینی اند. به علاوه معلوم نیست چرا حدود نیمی از بچه هایی که ناقل کلستریديوم ديفيسيل سم زا در روده هستند سالم می باشند (۱۳، ۲۵). از این رو می توان تولید سم با وزن مولکولی متفاوت را توضیح داد و آن را ناشی از اختلاف سویه ای دانست. با وجود این مشاهده تفاوت در فعالیت و مقدار سم لازم برای ظهور علائم پاتولوژیک نیاز به تحقیقات بیشتری دارد زیرا با آن که وزن مولکولی سموم به کار رفته در تحقیقات مختلف متفاوت بوده است اما اثرات پاتولوژیک یکسانی به جای می گذارند و تفاوت اصلی در مقدار سم و شدت ضایعات به جای مانده است.

اثرات هیستوپاتولوژیک توکسین های A و B کلستریديوم ديفيسيل بر کشت سلولی با تخریب غشای هسته، گرد شدن و مرگ سلولی نشان داده شده است. در واقع سه مرحله در این روند وجود دارد: در اولین مرحله حالت چسبندگی سلول ها از بین رفته و اسکلت سلولی در هم می ریزد. در مرحله دوم هسته سلول پلاریزه می گردد و در مرحله سوم هسته سلول به شکل بیضی در آمده و نکروز سلولی را در پی دارد (شکل ۵). نشان داده شده است که با تغییر الفا-اکتین ( $\alpha$ -actin) به اف-اکتین (F-actin) اسکلت سلولی در هم می ریزد (۲۲). در نتیجه پروتئین های اتصال که به چسبیدن سلول کمک می کنند از بین می روند و سلول حالت طبیعی خود را از دست می دهد. علاوه بر این، توکسین A با اثر بر پروتئین Tau، که یک فعال کننده مونتاژ میکروتوبولی و پایدار کننده آنها است، به طور غیر مستقیم بر ساختار میکروتوبولی اثر می کند. همچنین، برخی یافته ها مؤید آن است که پروتئین های سیتوپلاسمی برای فعالیت توکسین A ضروری اند. به طوری که اگر این پروتئین ها را با کموتاتین (Chemotatin) مهار کنند، عمل سم متوقف می گردد (۹). بنابر این دو نکته قابل تأمل یکی وزن مولکولی توکسین و دیگری حساسیت میزبان می باشند. تاکنون مطالعات هیستوپاتولوژیک با توکسین های A و B با وزن مولکولی بیش از  $100 \text{ KDa}$  بوده و اغلب در رده سلولی Hella و CHO و یا فیبروبلاست انسانی مطالعه شده است. اما در این تحقیق از توکسین A با وزن  $52 \text{ KDa}$  و توکسین B با وزن مولکولی  $60 \text{ KDa}$  و کشت سلولی رده BK استفاده شده است. به علاوه مقدار توکسین به کار رفته در این تحقیق ( $1-10 \mu\text{g/ml}$ ) کمتر از غلظت های مورد استفاده توسط

پروتئین‌ها برای سمیت توکسین‌های A و B کلاستریدیوم دیفیسیل لازم باشد (۷). بنابر این به نظر می‌رسد هر چه وزن مولکولی توکسین‌ها کمتر باشد بیشتر تحت تأثیر این پروتئین‌ها قرار می‌گیرند و سمیت آنها افزایش می‌یابد. هر چند در این تحقیق ما قادر به نشان دادن پروتئین Rha در رده کشت سلولی BK نبودیم ولی نتایج بررسی اثر توکسین‌های A و B کلاستریدیوم دیفیسیل روی این رده سلولی مؤید آن است که این سلول‌ها ابزار مناسبی برای بررسی سینتوتوکسیسته توکسین‌های باکتریایی هستند و با استفاده از آنها می‌توان عوامل میزبانی مؤثر در پاتوژن باکتری‌ها را نشان داد (۱۱). در هر حال با آن که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های کلاستریدیوم دیفیسیل منطقی به نظر می‌رسد (۴)، با این حال برای جلوگیری از ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی و در نتیجه مهار تولید عامل ویرولانس با فعالیت زیاد، ضرورت دستیابی به شیوه‌های جدیدی برای جلوگیری از بیماری‌زایی باکتری‌ها اجتناب‌ناپذیر است. افزون بر این با فایده آمدن بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و دستیابی به روش‌های جدید درمان از بروز کولیت با غشای کاذب نیز جلوگیری می‌شود. تحقق این امر نیاز به بررسی‌های بیشتری در زمینه اثر سموم این باکتری در مدل‌های حیوانی و نیز کشت سلولی دارد.

سایر پژوهش‌گران است. در هر حال نتایج این تحقیق نشان می‌دهد حداقل غلظتی از توکسین B که در فاصله کمتر از ۲ ساعت باعث مرگ صردرصد سلول‌ها می‌گردد برابر  $1 \mu\text{g/ml}$  است. در حالی که در تحقیقات انجام شده با توکسین با وزن مولکولی بیش از  $100 \text{KDa}$ ، عمدتاً ۵ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توکسین B گزارش شده است.

با آن که توکسین‌های A و B کلاستریدیوم دیفیسیل در سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های Hella، McCoy و CHO باعث نشت نوکلئوتیدها نمی‌گردند، اما با استفاده از اسیدهای آمینه نشاندار، کاهش سنتز پروتئین نشان داده شده است. به طوری که برای مهار سنتز پروتئین و ایجاد ضایعات سینتوپاتیک در سلول‌های Hella به  $1 \text{mg/ml}$  ( $1000 \mu\text{g/ml}$ ) توکسین A نیاز است، در حالی که برای مهار سنتز پروتئین در سلول‌های McCoy به  $20 \mu\text{g/ml}$  توکسین A نیاز است (۱۸). واضح است که علاوه بر تفاوت فعالیت سموم به کار رفته، حساسیت رده‌های سلولی مختلف نیز متفاوت می‌باشد. چنانکه نشان داده شده است کاهش پروتئین Rha مانع فعالیت توکسین C۳ کلاستریدیوم بوتولینوم می‌گردد و علاوه بر این تزریق این پروتئین به سلول‌های تیمار شده با توکسین A و B کلاستریدیوم دیفیسیل مانع از در هم ریختن اکترین می‌شود (۱۲). بنابر این به نظر می‌رسد اثر این

## Summary

The Effect of Clostridium Difficile Toxins A and B on Ligated Rabbit Ileal Loop and Cultured Cell Line BK RA. Ataee, MS<sup>1</sup> and Q. Behzadian Nejad, PhD<sup>2</sup>

1. Instructor in Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Baghiatollah (a.s) University of Medical Sciences and Health Services 2. Associate Professor of Microbiology, Medical Faculty, University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran.

*Clostridium difficile* has been recognized as the major cause of pseudomembranous colitis. This bacterium produces two toxins (an enterotoxin-cytotoxin and a potent cytotoxin called toxin A and toxin B respectively). These toxins have implicated in pathogenesis of the disease. However, histopathological effects of their molecular mass less than 100KDa have been essayed. In the present study, we examined the dose response and time course of these toxins in ligated rabbit ileal loop and cell culture line BK (bovine kidney). The 1-10 $\mu\text{g/ml}$  toxin A, with molecular weight of 52 KDa, in ligated rabbit ileal loop (6 rabbits with maximum of 15 loops in each animal) showed a series of histopathological changes leading to inflammation, fluid or bloody fluid accumulation, mucous and villi disruption in lamina propria. Different concentration of toxin B (MW=60 KDa) had no effect on fluid accumulation in striped rabbit ileal loop but caused driness and necrosis intensively. Cultured cells exposed to 1 $\mu\text{g/ml}$  toxin B showed a series of cytopathologic changes leading to cell retraction and rounding accompanied by the marginalization of the cell membrane. Enhancement of toxin concentration caused increment of cytopathic effects.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1999; 6(4): 205-213

**Key Words:** *Clostridium difficile*, *Pseudomembranous colitis*, *Toxin A and B*, *Rabbit ligated ileal loop*, *Cell culture*

### منابع

1. عطائی، رمضانعلی، معظمی، نسرین، ریاضی، غلامحسین و فرهادی، محمد: تولید و خالص سازی توکسین‌های A و B کلستریدیوم دیفیسیل، مجله پزشکی کوثر، ۱۳۷۶، سال دوم، شماره ۲، ص ۱۲۵-۱۱۷.
2. Bacon AE, Fekety R, Schaberg DR and Faix RG. Epidemiology of *Clostridium difficile* colonization in newborns: Results using a bacteriophage and bacteriocin typing system. *J Infect Dis* 1988; 158(2): 349-354.
3. Banno Y, Kobayashi T, Kono H, Watanabe K, Ueno K and Nozawa Y. Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. *Rev Infect Dis* 1984; 6: s11-s19.
4. Bartlett JJ. Treatment of antibiotic associated pseudomembranous colitis. *Rev Infect Dis* 1984; 6(1): s235-s241.
5. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL and Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *New Engl J Med* 1978; 298(10): 531-534.
6. Burdson DW. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *J Infect Dis* 1987; 60: 223-227.
7. Dillon ST, Rubin EJ, Yakubovich M, et al. Involvement of ras-related Rho proteins in the mechanisms of action of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Infect Immun* 1995; 63(4): 1421-1426.
8. Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M and Silva J. Epidemiology of antibiotic-associated colitis. *Amer J Med* 1981; 70: 906-908.
9. Fiorentini C, Malorni W, Paradisi S, Giuliano M, Mastrantonio P and Donelli G. Interaction of *Clostridium difficile* toxin A with cultured cells: Cytoskeletal changes and nuclear polarization. *Infect Immun* 1990; 58(7): 2329-2336.
10. Gerding DN. Disease associated with *Clostridium difficile* infection. *Ann Intern Med* 1989; 110(4): 255-257.
11. Guandalini S, Fasano A, Migliavacca M, et al. Pathogenesis of postantibiotic diarrhoea caused by *Clostridium difficile*: an *in vitro* study in the rabbit intestine. *Gut* 1988; 29: 598-602.
12. Hecht G, Pothoulakis C, LaMont JT and Madara JL. *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1988; 82(5): 1516-1524.
13. Larson H.E, Barclay F.E, Honour P and Hill I.D. Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants. *J Infect Dis* 1982; 146(6): 727-733.
14. Larson HE, Price AB, Honour P and Borriello SP. *Clostridium difficile* and the etiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1978; 1(8073): 1063-1066.
15. Lima MAA, Lyerly DM, Wilkins TD, Innes DJ and Guerrant RL. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine *in vivo* and on cultured cells *in vitro*. *Infect Immun* 1988; 56(3): 582-588.
16. Lyerly DM, Krivan HC and Wilkins TD. *Clostridium difficile*: Its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1(1): 1-18.
17. Lyerly DM, saum KE, MacDonald DK and Wilkins TD. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 1985; 47(2): 349-352.
18. Mitchell TJ, Ketley JM, Burdon DW, et al. The effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on membrane integrity and protein synthesis in intestinal cells *in vivo* and *in vitro* and in McCoy cells *in vitro*. *J Med Microbiol* 1987; 23(3): 205-210.
19. Mitchell TJ, Ketly JM, Burdon DW, et al. Biological mode of action of *Clostridium difficile* toxin A: a novel enterotoxin. *J*



- Med Microbiol* 1987; 23(3): 211-219.
20. Mitchell TJ, Ketly JM, Burdon DW, *et al.* The effects of clostridium difficile crude toxins and purified toxin A on stripped rabbit ileal mucosa in ussing chambers. *J Med Microbiolo* 1987; 23(3): 199-204.
  21. Mitchell MJ, Laughon BE and Lin S. Biochemical studies on the effect of Clostridium difficile toxin B on actin *in vivo* and *in vitro*. *Infect Immun* 1987; 55(7): 1610-1615.
  22. Popoff M.R, Rubin E.J, Gill D.M and Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. *Infect and Immun* 1988; 56(9): 2299-2306.
  23. Pothoulakis C, Sullivan R, Melnick DA, *et al.* Clostridium difficile toxin A stimulates intracellular calcium release and chemotactic response in human granulocytes. *J Clin Invest* 1988; 81(6): 1741-1745.
  24. Seddon SV, Hemingway I and Borriello SP. Hydrolytic enzyme production by clostridium difficile and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *J Med Microbiol* 1990; 31(3): 169-174.
  25. Sherman ME, DeGirolami PC, Thorne GM, Kimber J and Eichelberger K. Evaluation of latex agglutination test for diagnosis of clostridium difficile-associated colitis. *Amer J Clin Phatol* 1988; 89(2): 228-233.
  26. Vernet A, Corthier G, Dubos-Ramare F and Parodi AL. Relationship between levels of Clostridium difficile toxin A and Toxin B and cecal lesions in gnotobiotic mice. *Infect Immun* 1989; 57(7): 2123-2127.