تأثير السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* في الاستجابة المناعية للفئران المصابة تجريبيا بداء المقوسات

إبراهيم فارس علي **حنان صديق سعدون**

قسم علوم الحياة / كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

2011 / 01 / 10 **2011 / 03 / 02**

ABSTRACT

The present study was investigated the immunological effects of the lipopolysaccharide extracted from *Klebsiella pneumoniae* against experimental infection with toxoplasmosis in mice.

Immunological changes in treated mice were compared with the +ve (mice infected with *T.gondii* but not treated with LPS) and -ve (mice not infected with *T.gondii* and not treated with LPS) group at 3,14 and 30 days post infection with tissue cysts of *T.gondii* in the peritoneal cavity. Total and differential WBC count of peripheral blood and innate immune response represented by the phagocytic index were the criteria taken into consideration.

Results showed a significant increase in the total WBC count in mice treated with LPS after infection with *T.gondii*, compared with –ve and +ve control groups. For differential WBC count, an increase in lymphocytes and decrease in monocytes, neutrophils and eosinophils was noticed. Basophils were not considered because of their low number.For phagocytic index, an increase was noticed in treated mice compared with –ve and +ve control groups, and the highest rate was observed in cncentration 500 µg / 20 gm body weight at 30 days post infection.

It is concluded that, LPS extracted from *K.pneumoniae* may well be used as a active and non toxic immunomodulator against infection with toxoplasmosis in mice.

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية اختبار التأثيرات المناعية لل سكر المتعدد الدهني Lipopolysaccharide (LPS) المستخلص من البكتريا *Klebsiella pneumoniae* ضد الإصابة التجريبية بداء المقوسات Toxoplasmosis في الفئران.

تم ت متابعة التغييرات المناعية لداء المقوسات الكوندية التجريبي في الفئران البيض المعاملة بمادة السكر المتعدد الدهني مقارنة بفئران السيطرة الموجبة (المصابة بداء المقوسات وغير المعاملة بالسكر المتعدد الدهني) وفئران السيطرة السالبة (غير المصابة بداء المقوسات وغير معاملة بالسكر المتعدد الد هني) بعد 3, 14و30 يوما من الإصابة بالاكياس النسجية Tissue cysts للطفيل *Toxoplasma gondii* عبر التجويف الخلبي . اخذ في الاعتبار التغييرات الحاصلة في التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض في الدم المحيطي وكذلك الاستجابة المناعية الطبيعية والمتمثلة بمعامل البلعمة Phagocytic index. أظهرت النتائج حصول ارتفاع واضح في معدلات التعداد الكلي لكريات ا لدم البيض في الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة و الموجبة، وبالنسبة للتعداد التفاضلي ، فقد لوحظ حدوث ارتفاع واضح في النسبة المئوية للخلايا اللم فاوية وانخفاض في النسبة المئوية للخلايا وحيدة النواة والعدلات والحمضات في الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني ، في حين أهملت القعدات لقلة عددها , وبالنسبة لمعامل البلعمة ، فقد لوحظ ارتفاعها في ال فئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني بالمقارنة مع فئران السيطرة السالبة والموجبة، وسجل أعلى معدل في التركيز 500 مايكروغرام/20غرام من وزن الجسم الحي بعد 30 يوما من احداث الإصابة, تبين من الدراسة الحالية إمكانية استخدام LPS المستخلص من بكتريا *K.pneumoniae* كمعدل مناعي فعال وغير سام ضد الاصابة بداء المقوسات في الفئران.

المقدمة

داء المقوسات Toxoplasmosis من الأمراض الطفيلية التي تصيب الإنسان ومعظم الحيوانات ذوات الدم الحار كالطيور واللبائن , يسببه احد أنواع الاوالي الطفيلية المسمى بطفيل المقوسة الكوندية *T. gondii* التي تعد من الطفيليات الاجبارية داخل خلوية Intracellular obligatory parasites. للطفيل نسبة انتشار واسعة بين سكان العالم[1].

تنتقل الإصابة بطرائق عدة منها تناول الأكياس النسجية الموجودة في لحوم وانسجة المضائف الوسطية غير الـمطبوخة بشكل جيد ، شرب المياه وتناول الخضراوات والفواكه الملوثة بأكياس بيض الطفي ل Oocysts، شرب الحليب غير المبستر والملوث بالحوينات سريعة التكاثر Tachyzoites، فضلا عن التعامل مع التربة الملوثة ببراز القطط ، كذلك تحدث الإصابة عن

طريق الانتقال الم شيمي من الام المصابة الى الجنين [2], او عن طريق الجهاز التنفسي باستنشاق اكياس البيض المتبوغ ة[3]. تكون تأثيراتها المرضية محدودة في الأشخاص الاعتياديين ولكنها تصبح خطيرة في الأشخاص المثبطين مناعيا و يمكن ان تكون لها تأثيرات قاتلة للجنين في النساء الحوامل [4].لا يوجد علاج شاف لداء المقوسات على الرغم من تحسن بعض الحالات وان النسبة الحقيقية لحدوث المرض لا يمكن ان تعطى في اية منطقة من الع الم بسبب بعض الجوانب المبهمة المتعلقة بالمرض [5]. استخدم العديد من العقاقير لعلاج داء المقوسات مع ذلك لوحظ عدم كفاءة العقاقير المتوفرة بسبب تواجد الطفيل بمراحل متعددة خلال دورة حياته اذ ينتج الطفيل في كل مرحلة من مراحل حياته مجموعة متخصصة من المستضدات مما يساعد الطفيل على ال تهرب من الاستجابة المناعية للمضيف [6]. يعمل ال LPS كمعدل مناعي عند استخدامه بتراكيز واطئة لامتلاك ه تاثيرات محفزة لمكونات الجهاز المناعي للمضيف،اذ يؤدي الى تحفيز افراز السايتوكينات قبل الالتهابية مثل IL-1 , IL-6 و TNF-α اضافة الى IFN-δ وتعمل هذه السايتوكينات بدورها كوسائط لتنظيم عمل الخلايا المناعية [7].يقوم LPS بتحفيز التفاعل الالتهابي الذي ينتج عن ه ارتشاح خلوي كبيرشمل الخلايا وحيدة النواة ، العدلات والحمضات من الدم المحي طي .[8] كذلك يتواسط LPS عملية انتاج جزيئات ارتباط بالخلايا الاندوثلية المبطنة للاوعية الدموية مما يسهل هجرة الخلايا المتخصصة الى موقع الاصابة.[9]كذلك يحفز LPS الخلايا الوحيدة ,البلاعم الكبيرة والخلايا القاتلة الطبيعية (NK) Natural killer cells على افراز الوسائط المناعية ويتداخل مع عملية تمايز الخلايا الوحيدة الى انواع اخرى من ا لخلايا .[10] كما يحث LPS عوامل المصل القاتلة للبكتريا م ثل نظام المتمم و.C-Reactive Protein [11] من هنا جاء الدراسة الحالية لاختبار تاثير السكر المتع دد الدهني المستخلص من بكتريا *K.pneumoniae* على الاستجابة المناعية لفئران البيض المصابة تجريبيا بداء المقوسات من خلال دراسة التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض ومعامل البلعمة في الدم المحيطي مقارنة بفئران السيطرة السالبة و الموجبة.

المواد وطرائق العمل

عينة البكتريا:

جمعت عينات البكتريا *K.pneumoniae* من مختبرالبكتريولوجي/قسم المختبرات/مستشفى السلام في محافظة نينوى ، وقد تم إعادة عملية التشخيص في مختبر البكتريولوجي/قسم علوم الحياة /كلية التربية لغرض التأكد من البكتريا بواسطة اختبارات التحري والاختبارات الكيموحيوية. [12]

إنتاج السكر المتعدد الدهني:

استخدمت طريقة Marques *et al.*(1986) [13] في إنتاج السكر المتعدد الدهني.

استخلص السكر المتعدد الدهني وفق طريقة Learen *et al.*(1987) [14] مع اجراء بعض التحويرات واجريت عملية التنقية الجزئية للسكر المتعدد الدهني وفق طريقة Leathers *et al.*(1988) [15]

الكشوفات الكيميائية اللونية على السكر المتعدد الدهني:

تم الكشف عن الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والأحماض النووية حسب طريقة Plummer *et al.*(1978). [16]

تقدير مكونات السكر المتعدد الدهني :

- **تقدير كمية السكر في السكر المتعدد الدهني:**

قدرت كمية السكر في السكر المتعدد الدهني وفق طريقة Dubois *et al.*(1956)[17]

- **تقدير كمية الدهن في السكر المتعدد الدهني:**

قدرت كمية الدهن في السكر المتعدد الدهني وفق طريقة Toro and Ackermann (1975) [18] وبالاعتماد على المعادلة التالية :

التركيزالكلي للدهن (ملغم /100 مل) = $\frac{\text{امتصاصية النموذج}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي}}$ × تركيزالمحلول القياسي

الحيوانات المختبرية :

استخدمت الفئران البيض التي تم تربيتها في بيت الفئران في كلية التربية / جامعة الموصل، بمعدل 6 فئران لكل قفص بلاستيكي ، عزلت الذكور بعمر 4–5 اسابيع لاستخدامها في التجارب اللاحقة مع مراعا ة توفير الظروف الملائمة من درجات الحرارة 25 ± 2 مْ والماء والغذاء الذي تكون من عليقة الحبوب والذرة والبروتين الحيواني.

جمع العينات :

تم جمع 15 عينة سخد مصابة بطفيل المقوسة الكوندية معزولة من نساء مجهضات من مستشفى الخنساء التعليمي ، تم نقل العينات في حافظة مبردة تحتوي الحاويات فيها على محلول الملح الفسلجي الدارئ المتعادل Phosphate Buffer Saline (PBS) .

عزل الطفيل :

تم عزل الطفيل بصورته النقية من الاسخاد المصابة وفق طريقة Dubey *et al.* (1986) [19]

تشخيص الطفيل :

بعد ان تم عزل الطفيل في ا لمعلق السخدي اخذ 10 مايكروليتر منه ووضع على شريحة زجاجية وتركت الشريحة في الهواء لتجف ، بعدها ثبتت في الكحول الاثيلي بتركيز (70%) ثم صبغت بصبغة كمزا ، فحصت الشريحة المحضرة باستخدام العدسة الزيتية (×1000)، احصي عدد الأكياس النسجية في القطرة وتم تحديد جرعة الحقن.

حقن الفئران بالطفيل :

تم تحديد جرعة الحقن بحيث حقنت كل فارة بـ(100) كيس نسجي عبر التجويف الخلبي باستخدام محقنة طبية حجم (1) مل وذات ابرة قياس (G21).

تصميم التجارب :

استخدمت ذكور الفئران البيض بعمر 4–5 أسابيع وبواقع 6 فئران لكل قفص وقسمت إلى ثلاث مجاميع:

- **المجموعة الأولى:**

حقنت 6 الفئران بالسكر المتعدد الدهني عبر التجويف الخلبي وبالتراكيز (500,250,150) مايكروغرام/20 غرام من وزن الجسم الحي بجرعتين بينهما 72 ساعة وبواقع 6 فئران لكل تركيز، ثم خمجت كل فارة بـ100 كيس نسجي لطفيل *T.gondii* بعد 72 ساعة من الجرعة الثانية عبرالتجويف الخلبي أيضا.

- **المجموعة الثانية:**

خمجت 6 فئران بـ100 كيس نسجي لطفيل *T.gondii* عبر التجويف الخلبي كمجموعة سيطرة موجبة.

- **المجوعة الثالثة:**

استخدمت 6 فئران غير مصابة باكياس الطفيل وغير م عاملة بالسكر المتعدد الدهني كمجموعة سيطرة سالبة.سحب الدم من زاوية العين باستخدام انبوبة شعرية بعد 14،3 و30 يوما من تاريخ الاصابة بالاكياس النسجية للطفيل.

المعايير المختارة في الدراسة :

1. صورة الدم:

خدرت الفئران باستعمال Diethyl ether، واستخدمت انابيب شعرية لسحب الدم من زاوية العين [20]، جمع الدم في انابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر EDTA سعة 5 مل لغرض حساب التعداد الكلي والتفاضلي (التفريقي) لكريات الدم البيض.

2. الاستجابة المناعية الطبيعية :

تم دراسة الاستجابة المناعية الطبيعية المتمثلة بمعامل البلعمة ، اذ مزج 50 مايكروليتر من الدم مع نفس الحجم من صبغة Nitro Blue Tetrazolium(NBT) بتركيز 0.1% في أنابيب اختبار، حضن المزيج بدرجة 37مْ لمدة 30 دقيقة، تم عمل مسحات رقيقة من الدم Blood films، صبغت الشرائح بصبغة لشمان وتم حساب معامل البلعمة وفق المعادلة التالية [21].

$$\text{معامل البلعمة} = \frac{\text{عدد البلاعم المبتلعة لصبغة NBT}}{\text{عدد البلاعم الكلي}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

بينت نتائج الدراسة الحالية حصول ارتفاع واضح وبدرجات معنوية مختلفة في معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الدم المحيطي للفئران المعاملة بالسكر ال متعدد الدهني مقارنة بفئران السيطرة الموجبة والسالبة ، اذ سجل التركيز 250 مايكروغرام /20غرام من وزن الجسم الحي ارتفاعا معنويا عاليا بلغ 12533.33 بعد 14 يوما من الإصابة بالطفيل تلا ه التركيزان 500 و150 مايكروغرام اللذان سجلا 10200 و9000 بعد 30 و14 يوما من أحداث الإصابة، على التوالي , (جدول 1). اشار Ye *et al.*(2001) [22] بان مكونات جدار البكتريا *K.pneumoniae* وبالاخص LPS يعمل على حث افراز IL-17 والذي يقوم بدوره بتحفيز توالد اسلاف الخلايا الحبيبية Granulocyte precursors في الطحال ونخاع العظم , كما سجل Kolodjaschna *et al.*(2004) [23] ارتفاعا في التعداد الكلي لكريات الدم البيض بنسبة 49 % بعد 4 ساعات من حقن LPS المستخلص من بكتريا *E.coli* في دم أشخاص متطوعين رافقته زيادة في قطر الوريدات الدموية في شبكية العين .استخدم Hubner *et al.*(2008) [24] السكر المتعدد الدهني لتحفيز الاستجابة المناعية في الفئران المصابة بمايكروفلاريا الدودة *Litomosoides sigmodontis* وأظهرت النتائج حدوث ارتفاع في تركيز

IFN-δ IL-12, TNF-α وكذلك زيادة معنوية في اعداد كريات الدم البيض والبلاعم الكبيرة في الدم المحيطي عند التركيز 80 مايكروغرام /20 غرام من وزن الجسم الحي.

يظهر جدول (1) حدوث زيادة معنوية في معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الدم المحيطي لفئران السيطرة الموجبة ، وسجل اعلى معدل 7100 بعد 14 يوما من احداث الاصابة, في حين سجلت مجموعة السيطرة السالبة 2800. أشار Titus *et al*. (1991) [25] بان الاصابة بالابتدائيات الطفيلية يؤدي الى زيادة افراز IL-6 , IL-1, TNF-α وتعمل الوسائط المذكورة على إحداث الحمى وارتفاع في التعداد الكلي لكريات الدم البيض Leukocytosis وانتاج بروتينات الطور الحاد مثل C.Reactive Proteins. تؤدي الاصابة بطفيل *T.gondii* الى زيادة التعداد الكلي لكريات الدم البيض وايضا ارتفاع في معدلات الخلايا اللمفاوية[26] . سجل Mosallanejad *et al*. (2007) [27] ارتفاعا معنويا في معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في القطط المصابة بداء المقوسات الكوندية وبلغ 19500، في حين كانت الارتفاع في معدلات الخلايا اللمفاوية والخلايا وحيدة النواة غير معنوية.

جدول (1): التغيرات الحاصلة في معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني وبجرعتين (كل 72 ساعة) بعد 14,3 و 30 يوما من الإصابة بالطفيل مقارنة بفئران السيطرة السالبة والموجبة.

التعداد الكلي لكريات الدم البيض /سم^3			
التراكيز	الأيام		
	اليوم الثالث	اليوم الرابع عشر	اليوم الثلاثين
	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي
C^-	**200.00 ±2800.0**	**200.00 ± 2800**	**200.00 ±2800.0**
C^+	**±5400.0 39.230**	**±7100.0 624.499****	**±4800.0 400.000**
150	**±7266.86 1101.514***	**±9000.0 1311.487***	**±8133.22 1700.980****
250	**±9333.33 503.322****	**±12533.33 1137.248****	**±11200 916.515****
500	**±7666.66 2003.33****	**±9200 1311.487****	**±10200 1400.000****

C- :

فئران السيطرة السالبة غير المصابة بالطفيل وغير المعاملة بالسكر المتعدد الدهني

C^+ : فئران السيطرة الموجبة المصابة بالطفيل وغير المعاملة بالسكر المتعدد الدهني

* : الفروق المعنوية عند مستوى ($P< 0.05$)

** : الفروق المعنوية عند مستوى ($P< 0.01$)

بالنسبة للتعداد التفاضلي لكريات الدم البيض، لوحظ حدوث ارتفاع معنوي وبدرجات عالية في معدلات اعداد الخلايا اللمفاوية في الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني وفي جميع التراكيز.

جدول (2): التغيرات الحاصلة في معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني وبجرعتين (كل 72 ساعة) بعد 3 ايام من الإصابة بالطفيل مقارنة بفئران السيطرة السالبة الموجبة.

التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض%				
التراكيز	Lymphocy	Monocyte	Neutrophil	Eosinophil
	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي
C^-	4.16±26.66	1.00±8.00	4.16±60.33	1.00±5.00
C^+	3.05±61.33 **	1.73± 5.00 *	1.52±29.66 **	1.00±4.00
150	4.00±70.00 **	1.00±4.00 **	3.60±23.00 **	2.08±2.64
250	3.60±81.00	0.57±2.33 **	3.78±13.66 **	1.15± 2.66
500	4.16±73.33 **	0.57±3.66 **	2.51±19.66 **	2.08± 3.33

سجلت الخلايا اللمفاوية اعلى معدل 85 %في التركيز 500 مايكروغرام بعد30 يوما من احداث الإصابة(جدول4), اما التركيزان 150و250مايكروغرام فقد سجلا(83 , 81)% بعد30 و3 ايام من احداث الإصابة، على التوالي , (جدول 4 و2). اشار (2000).Balasa *et al* [28] الى قدرة LPS على تحفيز المناعة الطبيعية والمكتسبة وحث توالد الخلايا اللمفاوية T بالاعتماد على IFN-δ, وتوصل (2005) Singbartl *et al*. [29] الى قدرة LPS على تنشيط وتحفيز توالد الخلايا اللمفاوية T وهذه العملية تتطلب تفاعلات معتمدة على التداخل بين خلايا CD_{14} والخلايا وحيدة النواة,كما يعمل LPS كمنشط للخلايا اللمفاوية B متعددة النسيلة Polyclonal Lymphocytes B وكذلك يعمل LPS على تثبيط عملية القتل الخلوي المبرمج للخلايا اللمفاوية B الناضجة والمحفزة بصورة تلقائية او بواسطة العلاجات الكميائية [30], كما يمتلك LPS القدرة على حث زيادة الخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي بعد 24 سا عة من حقنه بالإضافة الى قدرته على حث افراز IL-17 و IFN-δ اللذين يقومان بدور ايجابي في عملية

الحماية من الممرضات داخل خلوي [31] .اظهرت فئران السيطرة الموجبة ارتفاعا معنويا في معدلات الخلايا اللمفاوية، وسجل اعلى معدل 62.66 % بعد 30 يوما من احداث الاصابة، في حين سجلت مجموعة السيطرة السالبة 26.66 % (جدول 4). يعمل البروتين 30 المشتق من الطفيل *T.gondii* على تحفيز الخلايا T من نوع CD_8^+ وزيادة قدرتها على انتاج IL-2 و IFN-δ كما تمتلك الخلايا المذكورة فعالية قاتلة للطفيل بصورة مباشرة .[32] ذكر Liu *et al.*(2010b) [33] بان المستضد SAG1 لطفيل *T.gondii* يحفز توالد الخلايا اللمفاوية وانتاج الاجسام المضادة و IFN-δ في الفئران واشار Suzuki *et al.* (2010)[34] بان IFN-δ المفرز من قبل الخلايا اللمفاوية المحفزة بواسطة مستضدات الطفيل *T.gondii* يعد الوسيط الرئيسي لمنع تكاثر الحيوا نات سريعة التكاثر Tachyzoites خلال المرحلة الحادة من الاصابة.

اتضح من الدراسة الحالية حدوث انخفاض واضح وبدرجات معنوية مختلفة في معدل الخلايا وحيدة النواة في الفئران المعاملة بالتراكيز المختلفة من السكر المتعدد الدهني مقارنة بفئران السيطرة الموج بة والسالبة .سجل ادنى معدل 2.33 % في التركي زين 250 و150 مايكروغرام بعد 3 و30 يوما من احداث الاصابة ،على التوالي , (جدول 2،4) في حين سجل التركيز 500 مايكروغرام 3 % بعد30 يوما من احداث الاصابة (جدول4). يعمل LPS لبكتريا *E.coli* على خفض معدل الخلايا وحيدة النواة والخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي [35] .يؤدي LPS الى افرازالبروتين الكيميائي الجاذب للخلايا وحيدة النواة بمساعدة الخلايا T عند حقنها في التجويف الجنبي للفئران بعد 6 ساعات من الحقن رافقته نقصان في الخلايا الحمضة [36]. سجلت فئران السيطرة الموجبة انخفاضا معنويا في معدلات الخلايا وحيدة النواة، وبلغ ادنى معدل 5.00 % بعد 3 ايام من احداث الخمج التجريبي مقارنة بفئران السيطرة السالبة التي سجلت معدل 8 %(جدول 2)، قد يعزى ذلك الى هجرة الخلايا وحيدة النواة من الدم المحيطي الى موقع الاصابة بالطفيل لكونها جزء من الجهاز ا لبلعمي النخاعيني ، وهذا ما اكده Dunay *et al.*(2010) [37] اذ اشارو بان هجرة الخلايا وحيدة النواة من الدم المحيطي في المراحل المبكرة من الخمج بالطفيل *T.gondii* ضرورية للسيطرةعلى الاصابة في الفئران. في حين ذكر Seipel *et al.* (2009) [38] بان الخلايا وحيدة النواة و البلاعم الكبيرة المصابة بالطفيل *T.gondii* تتاثر قابليتها على افراز الوسائط المناعية لكن تبقى محتفظة بقدرتها على الهجرة.

Eosinophil	Neutrophil	Monocyte	Lymphocyte	
المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	
1.00±5.00	4.16±60.33	1.00±8.00	4.16±26.66	C^-
1.15±4.66	4.58±44.00*	1.00±6.00	4.16±45.33*	C^+
1.00±3.00	3.60±16.00 **	1.00±5.00 **	3.46±76.00 **	**150**
0.57±2.33*	2.64±13.00 *	0.57±4.33 **	2.00±80.00**	**250**
0.57±3.33	2.64±24.00 **	1.15±5.33 **	3.51±67.33**	**500**

جدول (3): التغيرات الحاصلة في معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني وبجرعتين (كل 72 ساعة) بعد 14 يوما من الاصابة بالطفيل مقارنة بفئران السيطرة السالبة و الموجبة.

اظهرت الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني انخفاضا وبدرجات معنوية مختلفة في معدلات العدلات ، اذ سجل التركيز 500 مايكروغرام انخفاضا معنويا عاليا 10 %بعد 30 يوما من احداث الاصابة (جدول 4). في حين سجل التركيز ان150 و250 مايكروغرام معد ل 11.64% و13.00 % بعد 30 و14 يوما من احداث الاصابة ،على التوالي , (جدول 3،4). تعد العدلات جزء من الجهاز المناعي الطبيعي ضد الممرضات الغازية لج سم الانسان والحيوان ولها القابلية على الانتقال عبر انسجة الجسم المختلفة . اشار Blakwell *et al.*(1999) [39] بان عوامل الجذب الكيميائي CXC يزداد افرازها اثناء خمج القنوات التنفسية بالبكتريا السالبة لصبغة كرام والتي تعمل بدورها على جذب العدلات الى الاسناخ الرئوية وسجل وا ايضا اختزالا في اعداد العدلات في الدم المحيطي عند حقن LPS 0.1 ملغم/كغم من وزن الجسم الحي عبر التجويف الخلبي للجرذان .يعمل LPS المستخلص من بكتريا *E.coli* على تحفيزالخلايا التشجرية المشتقة من نخاع العظم بمساعدة مستقبلات TLR-4 وانتاج TNF-α الذي يع د من السايتوكينات قبل الالتهابية الجاذبة للخلايا المناعية الى موقع الخمج بما فيها العدلات [40]. يقوم LPS بتحفيز الخلايا Th17 على انتاج IL- 17 الذي يعمل بدوره على تنشيط العدلات وحثها على الهجرة من الدم المحيطي عند الخمج بالبكتريا والفطريات [41], وسجل (Zhang *et al.* (2010 [42] تثبيط هجرة العدلات اثناء المعاملة المسبقة ب LPS للفطر *Aspergillus fumigatus*. اظهرت فئران السيطرة الموجبة انخفاضا في معدلات العدلات في الدم المحيطي ،

وسجلت انخفاضا معنويا عاليا 27.00 % بعد 30 يوما من احداث الاصابة مقارنة بفئران السيطرة السالبة التي سجلت 60.33 %(جدول 4). تتدفق العدلات الى التجويف الخلبي للفئران عند حقنها بحيوانات سريعة التكاثر وتصل هجرة العدلات ذروتها بعد 8 ساعات من الحقن وترافقه زيادة في تركيز IL-12 و TNF-α في الدم المحيطي [43]. اشار Bohannon *et al.* (2010) [44] بان الحيوانات التي تعاني من استنزاف للعدلات لا تستطيع توليد استجابة مناعية موثرة ضد الطفيل *T.gondii*، اضافة الى نقصان تركيز IL-12 و TNF-αمقارنة بفئران السيطرة.

اظهرت الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني انخفاضا في معدلات الخلايا الحمضة ، سجل التركيز 500 مايكروغرام ادنى معدل 2 % بعد 30 يوما من احداث الاصابة (جدول 4)، اما التركيزان 250 و 150 مايكروغرام فقد سجلا انخفاضا بلغ 2.33 و 2.64 بعد14 و 3 ايام، على التوالي , (جدول3 و2). توصل Saliva *el al.*(2009) [45] الى تدفق الحمضات بعد 24 ساعة من حقن LPS في التجويف الصدري بتركيز 250 نانوغرام حيث سجلوا انخفاضا في معدلات الحمضات في الدم المحيطي في حين تعمل مادة Bradykinin على تثبيط عملية تراكم الحمضات المحفزة بواسطة LPS عند حقنها في التجويف الصدري او الخلبي. اتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه Stein *et al.* (2009)[46] اذ سجلوا انخفاضا في معدلات الخلايا الحمضة نتيجة هجرة الخلايا المذكورة من الدم المحيطي الى موقع الخمج في الفئران الملق حة بمستخلص الدودة الطفيلية *Strongyloides stercoralis*.تؤدي تفاعلات الحساسية المحفزة بواسطة LPS الى ترشيح الحمضات والخلايا Th2 الى الممرات التنفسية حيث تعمل Th2 على افراز IL-4 والذي يعمل بدوره على تحفيز الخلايا B لانتاج IgE وIL-5 وتراكم الحمضات [47]. اظهر ت مجموعة السيطرة الموجبة انخفاضا غير معنو ي في معدلات الحمضات 4.00 % بعد 3 ايام من الخمج مقارنة بالسيطرة السالبة التي سجلت 5.00 % (جدول 2) وهذا اتفق نوعا ما مع ما توصل اليه Brogi and Cibas (2000) [48] اذ سجلوا انخفاضا غير معنوي في معدلات الحمضات بلغ اقل من 3% عند الاصابة بالطفيل *T.gondii*، في حين اشار Fenoy *et al.*,(2009) [49] بان الاصابة بالطفيل *T.gondii* يعمل على ترشيح الحمضات والخلايا وحيدة النواة الى اغشية الممرات التنفسية وهذا قد يساهم في تقليل اثار التهاب الحساسية في الفئران.

جدول (4): التغيرات الحاصلة في معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني وبجرعتين (كل 72 ساعة) بعد 30 يوما من الاصابة بالطفيل مقارنة بفئران السيطرة السالبة والموجبة.

التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض%				
التراكيز	Lymphocyte	Monocyte	Neutrophil	Eosinophil
	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي
C^-	4.16±26.66	1.00±8.00	4.16±60.00	0.57 ±5.00
C^+	5.0 3±62.66**	2.00±6.00	3.00±27.00**	0.57±4.33
150	3.00±83.00**	0.57±2.33**	1.52±11.64**	1.00±3.000
250	2.00±76.00**	1.15±2.66**	1.00±19.00**	1.57±2.33*
500	3.60±85.00**	1.00±3.00**	3.60±10.00**	1.00±2.00*

يتضح من النتائج الحالية حصول ارتفاع واضح وبدرجات معنوية مختلفة في معدلات معامل البلعمة في الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني . سجل التركيز 250 مايكروغرام ارتفاعا معنويا عاليا بلغ 80 % بعد 30 يوما من احداث الاصابة , تلاه التركيزان 500 و 150 مايكروغرام اللذان سجلا76 % و60 % بعد 14 يوما من احداث الاصابة , على التوالي , (جدول 5). تزداد القدرة البلعمية للبلاعم الكبيرة والخلايا وحيدة النواة اثناء الخمج الرئوي بالبكتريا السالبة لصبغة كرام ، في حين يعمل بروتين السطيحات الرئوية A على تقليل حساسية هذه الخلايا لل . LPS وقد يكون هناك تاثيرات مماثلة على البلاعم الصغيرة لكونها من مكونات الجهاز البلعمي النخاعيني[50] .

جدول رقم(5): التغيرات الحاصلة في معدلات معامل البلعمة في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني وبجرعتين (كل 72 ساعة) بعد 3،14 و 30 يوما من الاصابة بالطفيل مقارنة بفئران السيطرة السالبة والموجبة.

يحفز LPS والببتيد وكلايكان الخلايا وحيدة النواة في النمط المعتمد على البروتين الرابط للسكر المتعدد الدهني ومستقبلات CD_{14} وحثها على افراز المونوكينات Monokines وبالتالي زيادة

معامل البلعمة%			
التراكيز	الايام		
	اليوم الثالث	اليوم الرابع عشر	اليوم الثلاثين
	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي	المعدل±الانحراف القياسي
C^-	200.000±10.00	200.000±10.00	200.000±10.00
C^+	4.000±28.00	5.033±40.22*	5.291±18.00
150	6.245±37.00	9.165±60.00**	11.590±49.66**
250	12.490±50.00**	6.658±62.33**	4.000±80.00**
500	9.848±55.00**	8.185±76.00**	10.535±53.02**

قدرتها على ابادة الجراثيم والطفيليات [51].يشارك IL-1 و TNF-α المفرزان من البلاعم الكبيرة المنشطة في العديد من الفعاليات الحيوية المهمة مثل تنشيط البلاعم الصغيرة وبلاعم كبيرة اخرى [52]. تكون سلسلة السكر المتعدد لجزيئة السكر المتعدد الدهني المسؤولة عن تنشيط العدلات بـينما يعمل الدهن -A على زيادة فعالية اوكسيد النترات في الخلايا البلعمية [53]. سجل Ali and Ali (2010) [54] زيادة معنوية عالية في معدلات معامل البلعمة في الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني ضد الإصابة بداء المشوكات الحبيبية.

يتضح من الجدول (5) حصول ارتفاع واضح في معدلات معامل البلعمة في فئران السيطرة الموجبة ، وسجلت ارتفاع معنوي بلغ 40.22 % بعد 14 يوما من احداث الاصابة مقارنة بفئران السيطرة السالبة التي سجلت 10%. قد يعزى ذلك الى قدرة المستضدات المفرزة خلال مراحل مختلفة من الاصابة للطفيل *T.gondii* الى تنشيط الخلايا البلعمية ، اذ ذكر Hauser and Remington (1981) [55] بان الاجسام المضادة احادية النسيلة Monoclonal Antibodies تقوم بتعزيز عملية البلعمة بواسطة البلاعم الكبيرة وزيادة مقاومة المضيف للطفيل *T.gondii* وقتله . يعمل الطفيل *T.gondii* على تحفيز انتاج IFN-δ من خلايا T وكذلك يعمل على تنشيط الخلايا القاتلة الطبيعية في بداية الإصابة, كما يعمل IFN-δ بدوره على تنشيط الخلايا البلعمية وحثها على افراز IL-12 واوكسيد النترات المضاد للاحياء المجهرية الممرضة [56].

References

1) Luder C. G. K. and Gross U. Parasitol. Today, 14:43-45(1989).

2) Hiramoto R. M., Borges M. M., Galisteo A. S., Meirelesz L. R., Macre M. S. and Radem H. F. Chess. Rev. Saude Pubica, 35(2):113-11(2001).

3) Bagley C.V. J. Infec. Dis., 31:162-171(2001).

4) Nematollahi A. and Moghddam G. Am. J. An. Vet. Sci., 3: 40-42 (2008).

5) Prescott L. M., Harley J. P. Klein D. A. Microbiology (5^{th} ed.). McGraw Hill. New York(2002).

6) Bougdour A., Maubon D., Baldacci P., Ortet P., Bastien O., Bouillon A., Barale J. C., Pelloux H., Menard R. and Ali-Hakimi M. J. Exp. Med., 206(4):953-966(2009).

7) Liu J., Abate W., Xu J., Corry D. Kaul B. and Jackson S.K.(2010a). Innate Immun., 23:1-5(2010a).

8) Rosen-Zweig H. L., Lessov N. S., Henshall D. C., Minami M., Simon R. P. and Stenzel M.P. Stroke, 35:2576-2581(2004).

9) Elson G., Dunn-Siegrist I., Daubeuf B. and Pugin J. J. Blood, 109(4): 1574-1583(2007).

10) Bettina R., Herder C., Loffer H., Kolb H. and Martin S. J. Leukoc. Biol., 75:624-630(2004).

11) Schultz H., Hume J. Zhang D. S., Gioannini T. L. and Weiss J. P. J. Immunol., 179:2477-2484(2007).

12) Benson H. J. Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 8th ed., McGraw-Hill com., Inc., pp.167-180(2002).

13) Marques A. M., Estanol I., Alsina J. M., Fuste C., Siman-pujol D., Guinea J. and Congregard F. Appl.Environm. Microbial., 52:1221-1223(1986).

14) Learen D. B., Brestel E. P. and seetharama S. Infect. Immun., 55:1813-1818(1987).

15) Leathers T. D., Nofsinger G. W., Kurtman C. P. and Bothast R. J. Int. Microbiol., 3:231(1988).

16) Plummer D. T. An Introduction to practical Biochemistry.2nd ed., McGraw-Hill Book company Limited, pp.144,174-178(1978).

17) Dubois M., Gille A, Hamilten J. H. Roler B. A. and Smith F. Anal. Chem., 28: 350-356(1956).

18) Toro G. and Ackermann, P. G. Practial Clinical Chemistry. Boston Little Brown com., Ind., p-354(1975).

19) Dubey J. P., Miller S., powell E. S., Anderson W. R. J. Am. Vet. Med. Asso., 188:155:158(1986).

20) Waynforth H. B. Experimental and surgical Technique in the Rat. Academic press Inc., London LTD, NWT,P-29(1980).

21) Park P. H., Filkring S. M. and Smith W. E. Lancet, 2:532-534(1968).

22) Ye P., Garvey P. B., Zhang P., Nelson S., Bagby G., Summer W. R., Schwarzenberger P., shellito J. E. and Kolls J. K. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 25(3):335-340(2001).

23) Kolodjaschna J., Berisha F., Lung S., Schaller G., Polska E., Jilma B., Wolzt M. and Schmetterer L. Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 287: 691-694(2004).

24) Hubner M. P., Pasche B, Kalaydjiev S., Soboslay P. T., Lengeling A., Schulzkey H., Mitre E. And Hoffman W. H. Infec. Immunit., 76:1668-1677(2008).

25) Titus R. G., Sherry B. and Cerami A. Immunol., 12:13-16(1991).

26) Dubey J. P. and Lappin M. R. Toxoplasmosis and Neosporosis: Infectious Diseases of the Dogs and Cats.3rd ed. St. Louis, Mo: Elsevier, pp.754-768(2006).

27) Mosallanejad B., Malmasi A., Mohebali M. and Tabatabayi M. Irn. J. vet. Res., 8(1): 91-92(2007).

28) Balasa B., van G. K. and sarvetnick N. Clin. Immunol., 95:93 - 98(2000).

29) Singbartl K., Backhorn S. G., Zarbock A., Schmolke M. and Aken H. J.Am.Soc.Nephrol.,16:720-728(2005).

30) Sourannavong V., Saidji N. and Chaby R. Infec. Immun., 75(10): 4998-5003(2007).

31) Mcaleer J., Liu B., Li Z, Ngoi S., Dai J. and Vella A. T. J. Leuko. Biol., 87: 1-10(2010).

32) Montoya J. G., Lowe K. E., Clayberger C., Moody D., Remington J. S., Talib S. and Subauste C. S. Infect. Immun., 64(1): 176-181 (1996).

33) Liu Q., Shang L., Jin H. Wei F., Zhu *X. Q*. and Gao H. Rer. Vet. Sci., 2:130-162(2010b).

34) Suzuki Y., Wang X., Jortner B. S., payne L., Ni Y., Michie S. A., Xu B., Kudo T. and Perkins S. Am. J. pathol., 22: 18-20(2010).

35) Hawers A. S., Fischer E., Marano M. A., Van-Zee J. K., Rock C. S., Lowry S. F., Calvano S. E. and Moldawe L. L. Ann. surg., 218: 79-90(1993).

36) Penido C., Castro H. C., Vieira A., Figueiredo R. T., Pelled A., Martins M. A., Jose P. J., Williams T. J. and Bozza P. T. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 25(6): 707-716(2001).

37) Dunay I. R., Fuchs A. and Sibley L. D. Infect. Immun., 78(4):1564-1570(2010).

38) Seipel D., Ribeiro-Gomes F. L., Barcelos M. W., Ramalho A. V., Kanashiro M. M., Kipnis T. L. and Arnholdt A. C. J. APMIS, 117(9): 672-680(2009).

39) Blackwell T. S., Lancaster L. H., Blackwell T. R., Venkatakrishnan A. and Christman J. W. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 159:1644-1652(1999).

40) Kukulski F., Yebdri F. B., Lefebvre J., Warny M., Tesster P. A. and Sevigny J. J. Leukoc. Biol., 81:1269-1275(2007).

41) Silva M. T. J. Leukoc. Biol., 87:805-813(2010)

42) Zhang X., Wu X. and Gao L. Innate Immun., 19: 1-20(2010).

43) Bliss S. K., Zhang Y. and Denkers E. Y. J. Immunol., 163: 2081-2088(1999).

44) Bohannon J., Cui W, Sherwood E. and Tolvie-kinsky T. J. Immunol., 185(5): 2847-2853(2010).

45) Saliva A. R., Larangeria A. P., Pacheco P., Calixto J., Henriqes M. G., Bozza P. and Castro F. N. British J. pharmacol., 127(2): 569 – 575(2009).

46) Stein L. H., Redding K. M., Lee J. J., Nolan T. J., Schad G.A., Lok J. B. and Abraham D. J. Innate Immun., 1: 618- 630(2009).

47) Jing W. U., Dong H. U., Jiu-wei D. U., Xin-rong T. A., Xin- lan Q. I. and Rong-bo Z. J. Chinese Med., 123(8):1047-1051(2010).

48) Brogi E. and Cibas E. Am. J. Clin. Pathol., 114:951-955(2000).

49) Fenoy I., Giovannoni M., Batalla E., Martin V., Frank F. M., Piazzon I. and Goldman A. Clin. Exper. Immunol., 155(2):275-284(2009).

50) Stamme C., Muller M., Hamann L., Gutsmann T. and Seydel U. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 27:353 – 360(2002).

51) Ming-Hui F., Richard K., Lars S., Andrew M., Jean N., Daniel R., Stewart W. and Grace S. Shock, 18(3): 248-254(2007).

52) Tanabe M., Matsumoto T., shibuya K., Tateda K., Miyazaki S., Nakane A., Iwakura Y. and Yamaguchi K. J. Med. Microbial., 54:7-13(2005).

53) Zagryazhskaya A. N., Lindner S. C., Grishina Z. Y., Galkina S. I., steinhilber D. and Sudina G. F. Int. J. Biochem. Cell Biol., 42(6): 921-931(2010).

54) Ali A. A. and Ali I. F. J. Ed. Sci., 23(2):23-41.

55) Hauser W. E. and Remington J. S Infect. Immun., 32(2):637- 640 (1981).

56) Collazo C. M., Miller C., Yap G., Hieny S., Caspar P., Schwartz R. H. and sher A. Infect. Immun., 68(5):2713-3719(2000).