تعديل الاستجابة المناعية الخلقية عند الاصابة بالمقوسات الكوندية باستخدام السكر المتعدد الدهني للايشريكيا القولونية

ابتسام محسن ياسين[1] و باسمة احمد عبد الله[2]

[1] *فرع الادوية، كلية الصيدلة، جامعة الموصل، الموصل، العراق*

[2] *قسم علوم الحياة، جامعة الموصل، الموصل، العراق*

(تاريخ الاستلام: ٦ / ٣ / ٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ١١ / ٩ / ٢٠٠٨)

الملخص

اختبر تأثير السكر المتعدد الدهني المستخلص من جدار بكتريا القولون *Escherichia coli* على المناعة الخلوية المتمثلة بعملية البلعمة Phagocytosis في الفئران المختبرية BALb/C المصابة بداء المقوسات Toxoplasmosis المستحدث . من خلال قياس معامل البلعمة Phagocytic index اضافة الى التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة مقارنة بفئران السيطرة ، وتم تحديد التركيز الاكثر تأثيرا .

لوحظ ارتفاع معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة وبلغ اقصاه ٩٤,١١% عند التركيز ٢٠٠٠ مايكروغرام/٢٠ غم من وزن الجسم مما يدل على ارتفاع الاستجابة المناعية الخلوية . لوحظ ارتفاع واضح في اعداد الخلايا اللمفية رافقه انخفاض في اعداد الخلايا العدلة والوحيدة في الفئران المفعلة مقارنة بفئران السيطرة مما يشير الى ان LpS ينشط الخلايا اللمفية ويحفزها على التوالد والانقسام . كذلك حث ارتشاح وهجرة الخلايا العدلة والوحيدة الى مواقع الاصابة وهذا دليل على ان المستخلص LpS هو معدل مناعي غير نوعي للبلاعم وله القدرة على تعديل الجهاز المناعي ضد هذه الاصابة .

المقدمة

داء المقوسات Toxoplasmosis مرض يسببه طفيلي يدعى *Toxoplasma gondii* والذي سمي " الكائن المقوس " يؤثر على اعضاء الجسم المختلفة مسبباً العديد من الامراض [١] .

تكمن الخطورة عند تعرض الحوامل للمرض ، اذ قد تنتقل الاصابة الى الجنين عن طريق المشيمة مؤدياً الى اجهاضه او موته داخل الرحم او التسبب في حدوث التشوهات الخلقية [٢]. يعد العلاج ضروريا جداً للحوامل المصابات بالمرض ولكن حتى مع استعمال المضادات الحيوية لايمكن القضاء على الطفيلي بشكل تام اذ ان الاشكال المتكيسة للطفيلي اصبحت مقاومة لكل انواع المضادات الحيوية حالياً ، كما ويمكن للاصابة ان تعود ثانية [٣] .

يستعمل العقاران Pyrimethamine و Sulfadiazine عادةً في علاج داء المقوسات واللذان يظهران فعلاً تآزرياً في تثبيط تكاثره ، الا ان لهما سمية عالية لكل من الأم والجنين اذا ما اعطيا قبل الاسبوع العشرين من الحمل لذا يستعاض بعقار Spiramycin اذا كانت الاصابة اثناء الحمل . ان خطة العلاج التقليدي في علاج المرض غير تامة ، فضلاً عما قد يرافق استعمال الادوية من اضرار جانبية او محتملة نتيجة الافراط الدوائي . وعلى الرغم من عدم وجود لقاح حتى الان لمنع الاصابة لذا يتواصل تقدم الدراسات على صعيد استخدام المعدلات المناعية Immunomodulation التي هي عبارة عن مواد خارجية أو داخلية تُنظم أو تُغير هدف ونوع واستمرار وكفاءة الجهاز المناعي [٥][٦] . ان التعديل المناعي في الاستجابة المناعية للمقوسات اصبح يدرس بشكل واسع وشامل. منها دراسة قام بها [٤] إستخدم فيها مستخلص السكر المتعدد الدهني (LpS) Lipopolysaccharide والأنترفيرون كاما (IFN-γ) لمُعاملة الخلايا البلعمية Monocytic cells للإنسان خارج الجسم الحي In vitro في أثناء الإصابة بطفيلي المقوسات Toxoplasma gondii وقد لاحظ أنها تحث على زيادة إنتاج عامل النخر الورمي الفا (TNF-α) وإختزال لأعداد الخلايا الغازية.

اشارت العديد من الدراسات الحديثة الى الدور المهم والفاعل لعوامل المناعة الخلطية في المقاومة المكتسبة ضد المقوسات [٤].

قد استخدمت لهذا الغرض مواد معزولة من مصادر مختلفة مثل البكتريا والفطريات والنباتات ، فضلاً عن بعض اشكال العلاج المناعي Immunotherapy مثل استخدام Interferon gama (INF-γ) او استخدام Lymphokines المنشط للخلايا القاتلة (LAK) Lymphokine activated Killer cells التي تعد من العلاجات الواعدة ضد هذا الداء [٤][٣]. والتي تفي بالكثير من الوعود في تعديل الاستجابة المناعية ضد المقوسات عن طريق التحفيز او التثبيط لخلايا معينة في الجهاز المناعي الخلوي بوصفها احدى الوسائل العلاجية او لغرض انتاج الكلوبيولينات المناعية المعروفة .

المواد وطرائق العمل

جمع (٢٤) نموذجاً من الانسجة المشيمية لنساء في حالة الاجهاض من مستشفى الخنساء بالموصل للفترة من تشرين الاول ٢٠٠٤ لغاية ٢٠٠٥، اذ اخذ حوالي (٥٠) غم من كل نموذج ووضعت العينات في حاويات زجاجية نظيفة ومعقمة وحاوية على محلول الملح الفسلجي (٠,٩%) Nacl ذات اغطية محكمة ودون عليها تاريخ الجمع .

عزل طفيلي المقوسات من نسيج ٤ عينات من مجموع ١٢ عينة مشيمة مجهضة في المرحلة الاولى ، استخدمت طريقة الباحث [٧] والباحثان [٨] ، بعدها حضرت مسحات من عالق المشيمة وصبغت بصبغة كمزا وفحصت تحت المجهر للتأكد من وجود الطفيلي وتشخيص اطواره الموجودة قبل الحقن ، استخدام هذا العالق للحقن في فئران التجارب .تم التحري عن طفيلي المقوسات الكوندية في السوائل البريتونية للفئران المحقونة بعد ٦-٧ ايام من الحقن وذلك بسحب ٠,٥ سم^3 من السائل البريتوني وتحضير مسحات منه على شريحة زجاجية وفحصه تحت المجهر للتأكد من اكتساب الفئران المحقونة للاصابة . كما تم الكشف عن وجود الاضداد المتخصصة ضد الطفيلي في مصول الفئران المحقونة بعد ٤-٥ اسابيع من الحقن وخضعت هذه المصول لاختبار تلازن

اللاتكسLAT واللاتكس المحورباستخدام مركب 2-mercaptoethanol بمولارية 0.2 ودالة حامضية 7.2 وذلك لتأكيد الاصابة بداء المقوسات [٩][١٠] .كما اوكد اكتساب الفئران للاصابة وذلك بتحضير مسحات من معلق الدماغ على شرائح زجاجية وصبغها بصبغة كمزا وفحصها تحت المجهز للتأكد من وجود الاكياس النسجية في الدماغ [١١].

حصل على عزلة البكتريا *Escherichia coli* المشخصة بتقنية API 20 E (Analytical Profile Index) من كلية العلوم/ قسم علوم الحياة.

تحضير السكر المتعدد الدهني

استخلص السكر المتعدد الدهني (LpS) من جدار بكتريا القولون *E.coli* على وفق طريقة [١٢] وذلك باضافة 2.0 ملي مول من EDTA-Na2 لوسط الانتاج [١٣] . مزج جيدا وسحق باستخدام ذبذبات صوتية 24,000 ذبذبة/ثانية لمدة نصف ساعة في درجة حرارة 4 م.كررت العملية 4 مرات مع التوقف للحفاظ على درجة الحرارة ، رسبت الخلايا بسرعة 600xg لمدة 15 دقيقة ورشح المحلول واضيف له الاسيتون بنسبة 5:1 وترك في درجة حرارة 4 م لمدة 24 ساعة للحصول على الراسب ،بخر الاسيتون وكشف عن السكر باستخدام كواشف لونية [١٤][١٥] ثم نقي متعدد السكر حسب طريقة [١٦] وقدر السكر حسب طريقة [١٧] والدهن [١٨] .

تصميم التجارب Experimental design

استخدم ٩٨ فار انثى لاجراء التجارب قسمت هذه الفئران الى مجموعتين ضمت كل مجموعة ٧ مجاميع ثانوية في ٧ اقفاص وبواقع ٧ فئران في كل قفص بضمنها فئران السيطرة الموجبة control positive. اختيرت ٦ تراكيز من مادة السكر المتعدد الدهني LPS لمعاملة فئران التجارب وهي التراكيز ٥٠ ، ١٥٠، ٢٥٠ ، ٥٠٠ ، ١٠٠٠، ٢٠٠٠ مايكروغرام / ٢٠ غم من وزن الجسم ، وكما ياتي :-

المجموعة الاولى :عومل ٤٢ فاراً بالتراكيز المذكورة اعلاه في التجويف البريتوني وذلك بحقن كل ٧ فئران بتركيز من التراكيز المذكورة اعلاه فحقن فئران القفص الاول بالتركيز ٥٠ والقفص الثاني بالتركيز ١٥٠ وهكذا ... وتركت فئران القفص السابع دون معاملة (مجموعة سيطرة موجبة) وبواقع ٧ فئران كذلك . خمجت هذه الفئران بداء المقوسات Toxoplasmosis بعد ٧٢ ساعة من التفعيل وبضمنها فئران السيطرة الموجبة وذلك بحقنه جرعتها 0.5 سم^3 من المحلول المعلق ومعايرته ليصل عدد الاكياس النسيجية فيه الى 100 كيس نسيجي/100 مايكروليتر [١٩].

المجموعة الثانية :عومل ٤٢ فاراً بالتراكيزاعلاه نفسها من مادة LPS وبجرعيتن متتاليتين بين كل جرعة واخرى ٧٢ ساعة ، خمجت هذه الفئران بنفس الطريقة بداء المقوسات بعد (٦) ايام من التفعيل الاول وبضمنها فئران السيطرة الموجبة وبواقع ٧ فئران والتي خمجت بالمرض فقط من دون تفعيل .

عينات الدم Blood Samples :

سحب الدم بعد ٧ ايام من الخمج من زاوية العين باتجاه الضفيرة الوريدية خلف مقلة العين باستخدام انابيب شعرية دقيقة بعد تخدير الفئران بمادة ثنائي الايثايل ايثر [٢٠]. ثم جمع الدم في انابيب بلاستيكية تحتوي على مادة EDTA كمانع للتخثر وذلك لحساب العدد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيضاء total & differential count) .ولقياس معامل البلعمة phagocytic index [٢١] باستخدام صبغة النايتروبلوتترازوليوم NBT Nitro Blue Tetrazolium وذلك بمزج ٤٠ مايكروليتر من صبغة(NBT) مع الحجم نفسه من الدم ووضعه في انابيب زجاجية وحضن المزيج في درجة حرارة ٣٧ مْ ولمدة ٣٠ دقيقة حضرت مسحات رقيقة منها وصبغت بصبغة لشمان وفحصت تحت المجهر بقوة تكبير 1000× لحساب اعداد العدلات التي احتوت على حبيبات الفورمازان Formazan granules ذات اللون الازرق الداكن(اختزال NBT الى حبيبات الفورمازن الزرقاء من اللون الاصفر الى اللون الازرق الغامق) ، وعلى وفق معامل البلعمة ووفق المعادلة الاتية :-

$$\text{معامل البلعمة} = \frac{\text{عدد البلاعم المختزلة لصبغة NBT}}{\text{عدد البلاعم الكلي}} \times ١٠٠$$

حسب العدد الكلي لخلايا الدم البيض باستخدام شريحة التعداد Haemocytometer من نوع Improved Neubaur بعد تخفيف عينة الدم وذلك باضافة ٢٠ مايكروليترمن الدم الى ٣,٨ سم^3 من محلول التخفيف ترك ومزج بشكل جيد لمدة دقيقة وترك لمدة ١٠ دقائق لاكتمال تحلل كريات الدم الحمر واصطباغ نوى خلايا الدم البيض وضعت قطرة الدم المخفف على شريحة العد وحسب عدد خلايا الدم البيض في ٤ مربعات كبيرة ذات حجم ٠,١ × ١ ملم بأستخدام المجهر الضوئي (x٤٠٠) تم بعدها حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض في ١ ملم^3 وعلى وفق المعادلة الاتية:-

العدد الكلي في ٤ مربعات × ٥٠

كما حسب العدد التمييزي لخلايا الدم البيض عن طريق تثبيت مسحة دم رقيقة ومتجانسة من الدم وصبغت هذه المسحة بصبغة لشمان لمدة ١,٥-٢ دقيقة ثم خففت الصبغة باستخدام محلول الفوسفات المنظم لمدة ٥-١٠ دقائق بعدها غسلت الشريحة بالماء الاعتيادي وتركت لتجف ، فحصت ١٠٠ خلية بيضاء لكل عينة وحسبت النسبة المئوية لكل نوع من انواع الخلايا البيضاء [٢١] .

النتائج

١- المعاملة بـ LpS بالتراكيز ٥٠ ، ١٥٠ ، ٢٥٠ ، ٥٠٠ ، ١٠٠٠ ، ٢٠٠٠ / ٢٠ مايكروغرام / ٢٠ غم من وزن الجسم وبجرعة واحدة قبل (٧٢ ساعة) من الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة.

نتائج الدارسة الحالية يعبر عنها من خلال قدرة الخلايا العدلة على اختزال (NBT) الى حبيبات الفورمازان الزرقاء (من الاصفر الى اللون الازرق الغامق) من خلال حساب اعداد العدلات التي احتوت على حبيبات الفورمازن الزرقاء، حيث يتوضح من الجدول (١) ان معدلات البلعمة اظهرت ارتفاعاً واضحاً في الفئران المفعلة بلغ اعلاه في التراكيز ٢٠٠٠ مايكروغرام/ سم^3 اذ اعطى ٩٣,٣٣% ، تلته التراكيز الاخرى.

الجدول ١ معامل البلعمة في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من LpS وبجرعة واحدة قبل ثلاثة ايام من الخمج مقارنة بفئران

السيطرة المخمجة .

	تراكيز LpS (مايكروغرام/ ٢٠غم من وزن الجسم)						
معدل معامل البلعمة	**٥٠**	**١٥٠**	**٢٥٠**	**٥٠٠**	**١٠٠٠**	**٢٠٠٠**	**مجموعة السيطرة**
	٨٦,٧	**٨٤,٦**	**٨٨,٩**	**٩٠,٠**	**٩٠,٩**	**٩٣,٣**	**٦٦,٧**

٢– المعاملـــة بـــالتراكيز ٥٠ ، ١٥٠ ، ٢٥٠ ، ٥٠٠ ، ١٠٠٠ ، ٢٠٠٠ مايكروغرام / ٢٠ غم من وزن الجسم ، وبجرعتين(كل ٧٢ ساعة) قبل ٦ ايام من الخمج ، مقارنة بمجموعة السيطرة المخمجة .

كما نلاحظ من الجدول (٢) ارتفاع معامل البلعمة في الفئران المفعلة عنها في فئران السيطرة وقد بلغت اقصاها عند التراكيز ٢٠٠٠ مايكروغرام الذي عطـى ٩٤,١١% ،مقارنـة بمجموعـة السـيطرة التـي اعطـت ٥٧,٦٩ % الاخرى .

الجدول ٢ معامل البلعمة في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من LpS ، وبجرعتين (كل ٧٢ ساعة) قبل ٦ ايام من الخمج مقارنة بمجموعة المخمجة .

	تراكيز LpS ((مايكروغرام/ ٢٠غم من وزن الجسم)						
معدل معامل البلعمة	**٥٠**	**١٥٠**	**٢٥٠**	**٥٠٠**	**١٠٠٠**	**٢٠٠٠**	**فئران السيطرة**
	٨٨,٣	**٨٥,٧**	**٩٠,٩**	**٩١,٧**	**٩١,٧**	**٩٤,١**	**٥٧,٨**

يتضح من الجدول (٣) الذي يبين التغيرات الحاصلة في معدلات التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة وبجرعة واحدة قبل (٧٢ ساعة) من الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة ، ان اعلى معـدل للتعـداد الكلـي بلـغ١٠,١×$١٠^{٩}$ كريـة / لتـر عنـد التركيـز ٢٥٠ مايكروغرام بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي سجلت ٥,٤×$١٠^{٩}$ كرية / لتر ، تلته التراكيز الاخرى.

الجدول ٣ معدلات التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من LpS وبجرعة واحدة قبل ٧٢ ساعة من الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة

W.B.Cs ×$١٠^{٩}$ خلية / لتر	**التراكيز من LPS مايكروغرام / ٢٠غم**						**مجموعة السيطرة**
	٥٠	**١٥٠**	**٢٥٠**	**٥٠٠**	**١٠٠٠**	**٢٠٠٠**	
	٧,١	**٥,٨**	**١٠,١**	**٩,٣**	**٨,٣**	**٥,٩**	**٥,٤**
النسبة المئوية لانواع الخلايا %							
اللمفية	**٩٠,٠**	**٨٠,٠**	**٩٥,٠**	**٩٣,٠**	**٩٢,٠**	**٨٨,٠**	**٦٤,٠**
العدلة	**٨,٠**	**١٧,٠**	**٥,٠**	**٦,٠**	**٧,٠**	**١٠,٠**	**٣٠,٠**
الوحيدة	**2.0**	**٣,٠**	**٠,٠**	**١,٠**	**١,٠**	**٢,٠**	**٦,٠**

يتوضح من الجدول نفسه النسبة المئوية لمعدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة ، فقد اظهرت الخلايا اللمفاوية ارتفاعاً بلـغ اقصاه عند التراكيز ٢٥٠ مايكروغرام اذ بلغ ٩٥,٠ ، تلته التراكيزالاخرى.

اظهرت الخلايا العدلة تفاوتاً في قيمها ، اعطى التركيز ٢٥٠ مايكروغرام ادنى معدل بلـغ ٥,٠ تلتـه التراكيزالاخرى. بينمـا اعطـت مجموعـة السيطرة نسبة مئوية بلغت ٣٠,٠ .

الخلايا الوحيدة اظهرت انخفاضاً ملحوظاً في معدلاتها في الفئران المعاملة اذ انعدمت تماماً في التركيز ٢٥٠ مايكروغرام تلته التراكيز ٥٠٠، ١٠٠٠ ، ٢٠٠٠ ، ٥٠ ، ١٥٠ مايكروغرام التي اعطت معدل ١,٠، ١,٠ ، ٢,٠ ، ٢,٠ ، ٣,٠ % على التوالي، مقارنة بمجموعة السيطرة التي اعطت ٦,٠ ، كما لوحظت الخلايا القعدة في هذه التجربة بينما لم تلاحظ الخلايا الحمضة .

٢– المعاملة بالتراكيز ٥٠، ١٥٠، ٢٥٠، ٥٠٠، ١٠٠٠،٢٠٠٠ مايكرو غرام/٢٠ غم من مستخلص LpS من وزن الجسم، وبجرعتين(كل ٧٢ساعة قبل٦ ايام من الخمج ، مقارنة بمجموعة السيطرة المخمجة.

الجدول ٤ معدلات التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة بتراكيز مختلفة من LpS ، وبجرعتين (كل ٧٢ ساعة) قبل ٦ ايام من الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة

W.B.Cs ×$١٠^{٩}$ خلية / لتر	التراكيز من LPS مايكروغرام /٢٠غم						مجموعة السيطرة
	٥٠	١٥٠	٢٥٠	٥٠٠	١٠٠٠	٢٠٠٠	
	١٠,٨	١٤,٤	١٨,٤	١٨,٣	٢٦,٢	٢٤,٣	٤,٠
النسبة المئوية لانواع الخلايا %							
اللمفية	٨٠,٠	٨٤,٠	٩٠,٠	٩١,٠	٨٩,٠	٨٧,٠	٧٠,٠
العدلة	١٧,٠	١٤,٠	٩,٠	٨,٠	١١,٠	١٣,٠	٢٦,٠
الوحيدة	٣,٠	٢,٠	١,٠	١,٠	٠,٠	٠,٠	٤,٠

يتبين من الجدول (٤) التغيرات الحاصلة في معدلات التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة مرتين (كل ٧٢ ساعة) وعلى مدى ٦ ايام قبل الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة فقد لوحظ زيادة واضحة في معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة اذ بلغ اعلى معدل للتعداد الكلي ٢٦,٢×١٠^{٩} خلية / لتر في التركيز ١٠٠٠ ، تلته التراكيز الاخرى ،اما معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض فقد اظهرت تفاوتاً في الفئران المفعلة عنها في فئران السيطرة ، اذ ارتفعت معدلات اعداد الخلايا اللمفاوية في الفئران المفعلة وبلغ اعلى معدل لها ٩١,٠% عند التركيز ٥٠٠ مايكروغرام تلته التراكيزالاخرى. اما الخلايا العدلة فقد انخفضت معدلاتها المئوية في الفئران المفعلة عنها في فئران السيطرة اذ بلغت ادناها عند التركيز ٥٠٠ مايكروغرام الذي اعطى ٨,٠% مقارنة بفئران السيطرة التي اعطت ٢٦,٠ ، تلتها التراكيزالاخرى.

اما الخلايا الوحيدة فقد انخفضت معدلاتها في الفئران المفعلة عنها في فئران السيطرة، اذ انعدمت في التركيزين ١٠٠٠، ٢٠٠٠ مايكروغرام ، اما في التراكيز ٢٥٠، ٥٠٠، ١٥٠، ٥٠ مايكروغرام فقد اعطت نسب مئوية ١,٠، ١,٠، ٢,٠، ٣,٠ على التوالي ، مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت ٤,٠ % كما لوحظت الخلايا القعدة في فئران السيطرة المخمجة وكذلك في الفئران المفعلة عند التركيز ١٥٠ مايكروغرام، بينما لم تلاحظ الخلايا الحمضة في مجموعة السيطرة المخمجة وانعدام وجودها كذلك في الفئران المفعلة .

المناقشة

اظهرت نتائج الدراسة ارتفاعاً في معدلات معامل البلعمة للفئران المفعلة بمستخلص LpS ولمعظم التراكيز المستخدمة وبلغ اقصاه في التركيز ٢٠٠٠ مايكروغرام/ سم^{٣} من LpS. ان الذيفان الداخلي المتمثل بـ Lipid-A يعمل على تنشيط الخلايا البلعمية مما يزيد من قدرتها البلعمية، فضلاً عن ان الذيفان الداخلي منشط متعدد النسيلة لخلايا B متعدد النسيلة (Polyclonal B-cell activators) مما يزيد من انتاج الاضداد . كما انه يحث على انتاج عوامل المضيف مثل IL-1 و INF-β وعامل تنخر السرطان TNF-α من خلايا البلاعم الكبيرة والذي يؤدي الى ارتفاع المناعة المتوسطة بالخلية [٢٢] . ان التنشيط المتتالي بوساطة الخلايا المقدمة للمستضد يؤدي الى تحرير عددٍ من السايتوكينات قبل الالتهابية من خلايا T اللمفاوية والتي تجذب وتنشط البلاعم الكبيرة [٢٣][٢٤].كما تبين إن مستخلص LpS يعد معدلاً مناعياً لانوعياً للبلاعم [٢٥][٢٦][٢٧] .

لوحظ في مجموعة السيطرة المخمجة انخفاض قليل في معدل معامل البلعمة، وقد يعود السبب في ذلك الى تاثير مستضد طفيلي المقوسات الذي يثبط انتاج السايتوكينات التي تؤثر في وظيفة البلعمة اذ انه يمنع انتاج السايتوكين قبل الالتهابي cytokin Proinflamatory اثناء وجوده داخل الخلايا، فضلاً عن ان *T. gondii* يثبط انتاج كل من IL-12 و TNF كما ان التراكيز المفرزة من TNF-α قد تؤدي الى حدوث زيادة اونقصان في عملية البلعمة [٢٨].

اظهرت نتائج الدراسة الحالية لمعدلات التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض في الدم المحيطي ارتفاعاً ملحوظاً في التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة بمستخلص LpS وفي جميع التراكيز المستخدمة بالمقارنة مع فئران السيطرة غير المعاملة بمستخلص LpS والمخمجة ، الا ان اقصى ارتفاع كان عند التركيز ١٠٠٠مايكروغرام / سم^{٣} من مادة LpS . ان هذه الزيادة في التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة بمستخلص LpS يمكن ان تعود الى قدرتها على التحفيز اللانوعي للبلاعم والذي يؤدي بدوره الى زيادة عدد البلاعم بسبب انقسامها ، كما تحفز توالدها نتيجة افرازها العامل المحفز للمستعمرات [٢٣] . وهذا يتفق مع ما توصلت اليه [٢٧] من ان السكر المتعدد يؤدي الى زيادة اعداد البلاعم والخلايا اللمفاوية نتيجة انقسامها وتاثيرها التفعيل على افرازها لعوامل المونوكينات ، كما اشارت الى تأثيرالسكر المتعدد على مدة بقاء الخلايا اللمفاوية اذ لاحظت زيادة معنوية في مدة بقاء الخلايا اللمفاوية المفعلة الذي ادى الى ارتفاع التعداد الكلي لكريات الدم البيض ومما توصلت اليه نتائج الدراسة الحالية من هذه الزيادة في التعداد الكلي لكريات الدم البيض اثبتت بان لمستخلص LpS القابلية على تفعيل البلاعم وتحفيزها لافراز المونوكينات التي تحفز انقسام الخلايا اللمفاوية والذي عكس زيادة في العدد الكلي لكريات الدم البيض وهذا يتفق مع ما لاحظه [٢٩] من زيادة في عدد الخلايا اللمفاوية عند تفعيل بلاعم الخلب بوساطة لقاح BCG. ان هذه الزيادة في المعدل الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المعاملة تعد مرتفعة اذا ماقورنت بالتعداد الكلي لكريات الدم البيض في فئران السيطرة المخمجة غير المعاملة التي لم تظهر زيادة في معدلاتهااو كانت منخفضة وذلك ربما لارتشاح الكريات وهجرتها الى مواقع الخمج بهدف السيطرة عليه ، ان ارتشاح البلاعم بعد استجابة المضيف المناعية للاصابة وهذا ما يحدث عند الاصابة بطفيلي المقوسات اذ ان المواد التي يفرزها الطفيلي قد تعمل بوصفها جاذباً كيميائياً يحفز الاستجابة المناعية للمضيف ويستمر الطفيلي في البقاء لفترة طويلة ويستجيب الجسم لوجوده بارتشاح اعداد كبيرة من الخلايا وحيدات النواة والبلاعم والتي تهاجر من الاوعية الدموية الى الانسجة باتجاه المواقع المحددة بالادنى والذي يؤدي بدوره الى انخفاض في المعدل الكلي لهذه الكريات في الدم [٣٠][٣١] .

اظهرت نتائج هذه الدراسة تغيرات واضحة في معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المفعلة مقارنة بفئران السيطرة المخمجة ، اذ ارتفعت نسب الخلايا اللمفاوية صاحبه الانخفاض في نسب الخلايا العدلة والوحيدة . ان ارتفاع نسبة الخلايا اللمفاوية يمكن ان يعود الى قدرة مستخلص LpS على تفعيل البلاعم وافراز عوامل المونوكينات التي تعمل على زيادة الخلايا اللمفاوية [٣٢] .

فضلاً عن مستخلص LpS قد يعمل على اطالة مدة بقاء الخلايا اللمفاوية [٢٧] . في حين انخفضت اعداد الخلايا اللمفاوية في فئران السيطرة المخمجة وقد يكون لظاهرة التكفيف الوعائي المتمثلة بارتشاح الخلايا اللمفاوية حول الاوعية الدموية اذ ان هذه الخلايا ليس لها القدرة على البلعمة وفي اغلب الظروف تخرج وتصل الى خارج الوعاء الدموي ولكن بالقرب منه لذلك فان دور الخلايا اللمفية في الالتهاب هو المساهمة في الاستجابة المناعية اذ تؤدي دوراً في افراز المواد السمية وتكوين الاضداد التي لها تاثير مباشر وفعال ضد الطفيلي . اما انخفاض النسبة المئوية

لخلايا العدلات والخلايا الوحيدة ، فقد يعزى الى قدرة مستخلص LpS على تحفيز خلايا العدلات على الهجرة الى مواقع تواجد الطفيل للقضاء عليه بعملية البلعمة اذ تعد هذه الخلايا جزءاً من الجهاز البلعمي النخاعي ، كما ان ميزة الالتهاب الحاد تتمثل بارتشاح الخلايا العدلة [٢٣] .

كما اكد ذلك كل من [٢٥][٣٣][٣٤][٣٢] الذين لاحظوا ارتفاعاً في معدلات الخلايا اللمفاوية وانخفاضاً في معدلات الخلايا الوحيدة والعدلات عند استخدامهم للسكر المتعدد المستخلص من مصادر بكتيرية وفطرية في تعديل المناعة الطبيعية لدى الفئران البيض BALB/C.

يعود السبب في انخفاض اعداد الخلايا الوحيدة في الفئران المفعلة بمادة LpS الى هجرة هذه الخلايا الى مواقع الخمج والتي تعد استجابة المضيف للخمج [٣٥][٢٢][١٠] .

يتميز الالتهاب المزمن بارتشاح الخلايا الوحيدة والخلايا اللمفاوية في حين تقل عملية انجذاب الخلايا الوحيدة الى مواقع الخمج في فئران السيطرة المخمجة. قد يعزى انعدام تواجد خلايا الحمضات في الدم المحيطي للفئران المفعلة بمادة LpS وكذلك في فئران السيطرة المخمجة الى هجرة هذه الخلايا الى مواقع الخمج اذ تعد هذه الخلايا اجزاءاً من الجهازالبلعمي النخاعي ولو ان كفاءتها اوطأ من العدلات من ناحية عملية البلعمة اذ تكمن وظيفتها الرئيسة في الاستجابة المناعية التي تحدث وتعود الى الكميات الكبيرة من المتوسطات المنتجة من الخلايا البدينة Mast cells وبعد مدة قصيرة من التعرض وتعتمد على الطريق الذي نفذ منه المستضد (المحسس) اذ ان الكلوبيولين المناعي IgE يستطيع ان يرتبط مع مستقبلات ذات الفة عالية تتوضح على سطوح الخلايا البدنية وهكذا يزداد اعداد الحمضات في النسيج وتساهم العديد من العوامل في ذلك [٣٦]. كما تتفاوت نسبة الخلايا الحمضة التي كفاءتها اوطأ من العدلات من ناحية عملية البلعمة فضلاً عن تكيفها في مهاجمة وتحطيم الطفيليات الغازية اذ تؤثر خمائرها على الجدار الخارجي مؤدية الى تحطيمه ، وتتفاوت نسبة الخلايا الحمضة من كريات الدم البيض على وفق ما يحتويه الحيوان من الطفيليات [٣٧][٣٦] . كما ان لها دوراً كبيراً في الاستجابة المناعية ضد الاصابات الطفيلية من خلال هجرتها الى مواقع الخمج بفعل عوامل جذب الحمضات – Eosinophil chemotactic Factors مما يؤدي لحدوث تفاعل شديد يعمل على ازالة التحبب من الخلايا البدنية كما تهاجم هذه الخلايا الطفيل عن طريق ارتباطها بالكلوبيولينات المناعية نوع IgG و IgE مما يحث عملية فقدان حبيباتها وتحرر محتوياتها [٢٣].

لاحظ الباحثون الاسلوب نفسه عما جاء به كل من [٣٣][٢٩][٣٨] ارتفاع نسبة الخلايا الحمضة في الفئران المفعلة بالمعدلات المناعية مقارنة بفئران السيطرة المخمجة .

اما ملاحظة الخلايا القعدة في الدم المحيطي للفئران المفعلة بمستخلص LpS وزيادة نسبتها خاصة عند التركيز ١٠٠٠ مايكروغرام/ سم^3 فضلاً عن ملاحظة وجودها كذلك في فئران السيطرة المخمجة ، وقد يكون السبب في زيادة وجودها هو حث الالتهاب الحاد في موقع تمركز المستضد او مواقع الخمج ، اذ تخدم القعدات بشكل مشابه لخلايا البدنية [٣٧] .

المصادر :

1. Lienden R.V. 2005. Toxoplasmosis. Pawprints and purrs, Inc. cat health care information by condition or disease, Anon-Profit 50 1(c) (3)Organization all donations are Tax deductable. From http:// www.Sniksnak. com / cat health / Toxoplasmosis. Htm
2. C. F. H. C. 2005. Toxoplasmosis in cats. College of Veterinary Medicine-Cornell University. From:
3. Wieffer M.; Gobbels Marc-Jan and Boris S. 2005. Molecular and Biochemical Parasitology. Center for tropical and emerging Global diseases, University of Georgia, 724 Biological Sciences building, Athens, GA30602,USA,137(1):99-110.www. cornellfelinehealthcenter - Brochure.htm
4. Belloni A.; Aubert D.; Gomez-Marin J.E; LeNaourR.; Bohnomme A.; Guenounou M. & Pinon J.M.2000. Involvement of tumor necrosis factor-α during infection of human monocytic cells by Toxoplasma gondii . *Parasitol. Res*., 86:406-412.
5. Lebish I.J.; and Maraski RM. 1987 .Mechanisms of immunomodulation by drugs. Toxicol. Pathol., 15(3): 338-345.
6. Weir D.M. 1992. " Immunology". 6th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
7. Dubey J.P. 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites & bradyzoites to pepsin&trypsin digestion.Parasitology,116:43-50
8. Remington, J.S. and Desmonts, G. 1990. Toxoplasmosis. In : Remington, J.S. and Klein, J.O. (editors). Infectious diseases of the fetus and new born infant,: W.B. Saunders, Philadelphia: 89-195.
9. الخفاف ،فرح حازم عمر ٢٠٠١. عزل ودراسة مصلية لداء المقوسات في النساء بسن الانجاب في محافظة نينوى.رسالة ماجستير .كلية العلوم .جامعة الموصل .
10. Abdulla,B.A.2001.Toxoplasmosis in high risk pregnancies in Mosul,Iraq.Rafidan Journal of Science. 12 (2): 1-4
11. Remington, J.S.; McLoeod, R.; Thulliez, P. and Desmants, G.2000. Toxplasmosis. In: Remington, J.S. and Klein, J.O. (editors). "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". 5th W.B. Saunders Co. Philadelphia: 206-346.
12. Learn D.B.; Brestel EP. and Seetharama S. 1987. Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa*. Infec. Immun., 55:1813- 1818.
13. Marques A.M.; Estanol I.; Alsina J.M.; Fuste C.; Siman - Pujol D.; Guinea J. and Congregade F.1986.Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp*. Strain EPS-5028 .Appl. Envirom. Microbiol.,52:1221-1223.
14. Robyt J.F. and White B.H.1987. Biochemical Techniques Theory and Practice. Books / Cole puplishing Company Monterey, California.s
15. Plummer D.T. 1978. An Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill Book Company Limited.
16. Leathers T.D.; Nofsinger G. W.; Kurtzman C. P. and Bothast R .J.1988. Pullulan productionby color variant strains of Aureobasidium pullulans. J. Int. Microbiol., :231.

29. Reuben JM.; Tanner C.E. and Rau M.E. 1978. Immunoprophylaxis with BCG of experimental Echinococcus multilocularis infections. Infect. Immun., 21:135-139.
30. Fischer H.G.; Nitzagen B.; Riechmann G.; GroB U. and Hadding U. 1997. Host cells of Toxoplasma gondii encystation in infected primary cultures from mouse brain. Parasitol. Res., 83: 637-641.
31. Brenier-Pinchart M.P.; Pelloux H.; Derouich - Guergour D. & Ambroise-Thomas P. (2001). Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. Trends Parasitol., 14(6): 292-296.
32. Ali A. A. and Abdulla I.T. (2003). Immunomodulation in BALB/C mic against infection with hydatid disease by the lipopohysaccharide extracted from Pseudomonas aeruginosa III. delyed type hypersensitivity and phagocytosis , Riv. Parasitol., XX (LXIV)1.
33. AL-Taei A.F.M. 1996. Activation of macrophages with immunomodulators and the effect of this activation upon the infection with *Echinococcus granulosus* Ph.D.Th. ,Coll .Sci., Univ. AL- Mustansiriya.
34. Ali A.A. and Salih N.E. 2001. Immunomodulation in mice against infection with unilocular hydatid disease by the polysaccharide Pullulan .III . Cellular and humoral response. *Rev. Parasitol*., XVIII(LXII) –2 : 161 – 170.
35. Davis D.E. & Lioyd J.B. 1989.Monocyte to macrophage transition in vitro: Asystemtic study using human cells isolated by fraction or perColl. J.Immunol. Methods, 118:9-16.
36. Madigan M.T.; Martinko J.M. and Parker J. (2003). Brook Biology of micro-organ. 10th ed., Williams & Wilkinsm London.
37. Tizzard I. 1986. Veterinary Immunology. An Introduction. W.B. Saunders Co., St. Lois:241-247.
38. AL-Sabawi B.H.H. 2001. Immunomodulation effect of the black nightshade *Solanum nigrum L*. on growth and development of Secondary *Echinococcus granulosus* (Batsch,1986) hydatid cysts of human and sheep origin .Ph.D. Thesis Coll . Sci.Univ. Mosul .
17. Dubois M. ; Gille A.; Hamilten J.H.; Roler B.A. and Smith F.1956. Colorimetric methods for detrmination of sugar and related compounds. Anal. Chem., 28:350-356.
١٨. الامـــين، صـــفاء عبـــد العزيـــز، ٢٠٠١.عـــزل ودراســـة المركبـــات البروتينيـــة الفعالـــة مـــن نبـــات القـــرع *Cucurbita pepo var condensa*.
19. Liesenfeld O.(2002). Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: A new model of inflammatory bowel disease. J.Infect. Dis. 185 (1):596-601.
20. Waynforth HB. 1980. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Inc.(London) LTD NWI, PP.29.
21. Dacie J.V. and Lewis S.M.1986. Practical Haematology. 6th ed., Churchill Livingstone Publication, pp.22-49.
22. Levinson W. and Jawetz E. 2000. Medical microbiology and immunology 6 th ed . Lange medical Books / Mc Grow Hill Medical Publishing Division . U.S.A.
23. Roitt I.; Brostoff J. and Male D. 1998. Immunology. 5th ed. Mosby International Ltd. UK.
24. Udey M.C.; Vonstebut E.; Ehrchen J.M.; Belkaid Y.; Kostka S.L.; Mole K.; Knop J.; Sunderkotter C. 2003. Interleukin 1 alpha promptes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major – susceptible BALB/c mice. J. Exp. Med. 198(5): 191-199.
25. AL-Jorany K.H.; AL-Ani R.A. and AL-Shanawi, F.A. 1992. Increase candidacidal and leishmanicidal activity of macrophages exposed to semipurified Rizobium polysaccharides *In vivo Iraqi J.Biol.Sci*
26. Jenkins P.; Dixon J.B.; Rakha N.K and Carter S.D. 1990. Regulation of macrophage mediated larvicidal activity in *Echinococcus grnulosus* and *Mesocestoides corti* (cestoda) infection in mice. *Parasitol*ogy, 100: 309-315.
27. Fattah M.1990. No-specific activation of mice peritoneal macrophage with Rhizobium polysaccharides. M.Sc. Thesis, Coll. Sci. Univ. AL-Mustansiryia.
28. Benjamini S.; Coico R. and Sunshine G. 2000. "Immunology: A short course", 4th ed. Wiley-Liss. Inc., New York.

Congenital Immunity Modulation in Toxoplasmosis using Lipopolysaccharide of *Escherichia coli*

Ibtisam M. Yaseen[1] , Basima A. Abdulla[2]

[1] *Dept. Pharm., Coll. Pharm., Mosul Univ., , Mosul , Iraq.*
[2] *Dept., Coll. Sci., Mosul Univ., , Mosul , Iraq*

(Received 6 / 3 / 2008 , Accepted 11 / 9 / 2008)

Abstract

The effect of lipopolysaccharide (LpS) extracted from *Escherichia coli* was investigated on non-specific cellular immunity represented by phagocytosis and on total and differential count of leucocytes in BALB/C mice infected with toxoplasmosis. By measurement of phagocytic index in activated mice with LpS in comparison with the control. The results revealed that phagocytosis was significantly higher in mice activated with LpS represented by an increase in the phagocytic index (94.11%) at 2000 µg /20gm body weight . The results showed that LpS activates macrophage and stimulates proliferation of lymphocytes and infiltration and migration of neutrophils and monocytes to the sites of infection. It appeared that the LpS extract was a non- specific immune modulator to macrophages and had the ability to enhance the immune system of mice against this infection.