التحري عن قدرة مستضد متعدد السكريد المحفظي المستخلص من بكتريا *Enterococcus faecalis* في حث الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية

بسّام كريم خضير

جامعة الكوفة /كلية العلوم / قسم التحليلات المرضية

مهدي حسين محيل

جامعة الكوفة / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الخلاصة

تم استخلاص متعدد السكريد المحفظي Capsular polysaccharides (C-PS) من عزلة بكتريا الـ *Enterococcus faecalis* الأكثر ضراوة من حالة خمج القناة البولية من بين 15 عزلة معزولة من حالات مرضية عديدة شملت (اخماج القناة البولية ، وحالات الاسهال المعوي والتجرثم الدموي) بأستخدام طريقة حامض النتروز ، واختبرت قابليته على تنشيط الخلايا المناعية اذ اظهرت النتائج أن له القدرة على تحفيز الخلايا البلعمية وزيادة معامل البلعمة كما وجد أن هناك فروقاً معنوية تحت مستولى احتماية ($P \leq 0.05$) بين معاملات البلعمة بتأثير تراكيز المستضد المستخدمة ولمدد زمنية مختلفة من التحضين ، اختبرت ايضاً قابليته على رفع الاستجابة المناعية من خلال تحديد عيارات الضد المصلي بالتلازن ، اذ بلغت قيمة العيارات المصلية (160- 320) عند استخدام التركيز (25 و 50) مايكروغرام / مل ، فضلاً عن قيمة عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض Leukocyte inhibitory factor (LIF) الجهازية التي بلغت 47 و 63 على التوالي ، كما درست تأثيراته المناعية في تفاعلي فرط الحساسية الآني والمتأخر ، حيث سبب ظهور علامات سريرية واضحة على الحيوان المختبري عند حقنه تحت الجلد تمثلت بأحمرار وتنخر وتصلب وانتفاخ في الجلد خلال 24 ساعة فضلاً عن زيادة في علامات التثخن والانتفاخ خلال 48 ساعة .

Abstract

The capsular polysaccharides (C-PS) were extracted from the most virulence isolates of *E. faecalis* using nitrose acid extraction method fr, which isolated from the urinary tract infection sample among 15 isolate that`s taken from different bathogenic cases included (Urinary tract infections , bacteremia and intestinal diarrhea) .

The ability of C-PS to activate the phagocytic cells was investigated , the results showed it`s ability to stimulate the phagocytic cells , there were significant differences between phagocytic indices under the effect of different antigen concentrations for different periods of incubation .

C-PS also has abilities to increase the immune response by determining serum antibody titer , the result were 320 and 160 by using the concentrations 50 µg/ml and 25 µg/ml respectively , in addition to the values of leukocyte inhibitory factor (LIF) which were 47 and 63 respectively .

The immunological effects of C-PS on immediate and late hypersensitivity were also studied , it caused obvious clinical signs which are redness , necrosis , sclerosis and swelling in the skin during 24 hour on the laboratory animals when was injected subcutaneously , also the thickness and swelling were increased durind 48 hour.

المقدمة

في السنوات الماضية كانت البحوث حول الطبيعة الكيميائية ومكونات وتركيب كربوهيدرات السطوح الخارجية لبكتريا المكورات المعوية ، بينت الدراسات في عام 1967 ان المكونات الكاربوهيدراتية السطحية لمجموعة D من المكورات المسبحية تتألف من glucose و glucosamine و galactosamine و Rhamnose و Ribitol و Phosphorus (Huebner *et al.,*1999) .

واوضح Pazur في عام (1982)ان كل من N-acetyl galactosamine و Phosphate ايضاً من مكونات الكربوهيدرات السطحية لهذه البكتريا .

كما اشار Huebner *et al.* في عام (1999) ان مجموعة D للمكورات المسبحية تمتلك تركيب ذو طبيعة كربوهيدراتية يختلف عن صفات كربوهيدرات السطوح الخلوية لباقي مجاميع المكورات المسبحية والذي يمثل مستضد المحافظ ، حيث وجد انه مؤلف من البوليمير glycerol–glucose وان الكلوكوز يرتبط مع الكليسيرول باصرة (α1–2) في حين ان ذرة الكاربون رقم 6 في جزيئة الكلوكوز ترتبط مع الكليسيرول في المجموعة اللاحقة بأصرة ثنائية الفوسفات ، ان هذا التركيب لم يتم اكتشافة الا بعد ظهور المجهر الالكتروني والذي بين ان هذه البكتريا لها مستضد سطحي كربوهيدراتي يمثل مستضد المحافظ ، يتكون الجدار الخلوي للبكتريا من بروتين وكربوهيدرات وببتيدوكلايكان ، وتمثل طبقة الكربوهيدرات المستضد النوعي Specific (antigen) الذي هو عبارة عن مستضد متعدد السكريد ، يمثل (35–50%) من الوزن الجاف للجدار ويمثل (6–10%) من وزن الخلية ، استخدم المستضد مبدئياً في التشخيص البكتريولوجي للبكتريا ومن خواصه انه غيرسام مع انه اكثر المركبات استقراراً وله القابلية على تحفيز الاجسام المضادة ، ومن خواصه الكيميائية انه ذو وزن جزيئي (8000–10000) دالتون وذو لزوجة واطئة جداً وغير متحرك بالترحيل الكهربائي ، يحتوي 1.72% نيتروجين و0.7% فوسفات و 20% سكريات امينية (Schmidt, 1952) . هدفت الدراسة الى اختبار كفاءة متعدد السكريد المحفظي Capsular polysaccharides المستخلص من بكتريا *Enterococcus faecalis* داخل وخارج الجسم الحي .

المواد وطرائق العمل :

1- **الاوساط المناعية Immunological media**

- **وسط الاكار– اكار (Agar–agar medium)** حضر هذا الوسط وحسب (Garvey *et al.*, 1977)
- **وسط الايكل الاساس (Basal eagle medium)** تم تحضير هذا الوسط وحسب طريقة (Garvey *et al.*, 1977) .

2- **الصبغات والمحاليل** استخدمت صبغة لشمان و صبغة Nitro blue tetrazolium (NBT) والمحضرة حسب شركة B.D.H . كما استخدمت المحاليل التالية (محلول هانكس الملحي المتوازن و محلول الدكستران و محلول البايوريت و محلول كاشف بايل – اورسينول . و محلول مولش و محلول نتروز الصوديوم و المحلول الملحي الفورمالييني 0.5%) والمحضرة حسب (Garvey *et al.*, 1977) .

طرائق العمل :

1- العزل والتشخيص : تم عزل 15 عزلة من بكتريا *Enterococcus faecalis* من عينات مرضية مختلفة شملت (التهاب القناة البولية و حالات الاسهال المعوي والتجرثم الدموي) في مستشفى الزهراء التعليمي في محافظة النجف الاشرف / العراق ، وشخصت العزلات بأستخدام عدة التشخيص api 20 Strep. . ثم تم انتخاب اكثر عزلة ضارية بعد التحري عن صفاتها الانزيمية من اجل دراستها مناعيا .

2- استخلاص C–PS بحامض النتروز Extraction by nitrose acid استعملت طريقة الاستخلاص بحامض النتروز للحصول على مستخلص متعدد السكريد المحفظي وحسب (Facklam and Carey, 1985)

3- الفرز الغشائي Dialysis بعد عملية استخلاص مستضد متعدد السكريد المحفظي تم اجراء عملية الفرز الغشائي لغرض التخلص من الشوائب التي يحتمل وجودها بعد عملية الفصل ، وحسب ما ورد في (Garvey *et al.*, 1977) .

4- الكشوفات الكيميائية اللونية على مستخلص متعدد السكريد المحفظي تم الكشف عن الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والأحماض النووية وحسب ماورد في (Plummer, 1978) وكالاتي :

- ❖ **كشف مولش** استخدم للتحري عن وجود الكربوهيدرات في المستخلص اذ ان ظهور حلقة أرجوانية تفصل بين الحامض المستخدم والمستخلص تدل على ايجابية الفحص .
- ❖ **كشف بايوريت** استخدم للتحري عن وجود البروتينات في المستخلص اذ ان ظهور اللون البنفسجي في المستخلص يدل على ايجابية الفحص .
- ❖ **كشف الدهون** استخدم الكشف عن الدهون في المستخلص اذ ان انبعاث رائحة كريهة تشبه الرائحة التي تنتج من تسخين مزيج من الكليسيرول مع كبريتات البوتاسيوم دلالة على ايجابية الفحص .
- ❖ **بايل اورسينول** استخدم للتحري عن وجود الأحماض النووية اذ ان ظهور لون اخضر مزرق في المستخلص يدل على ايجابية الفحص .

5 - تقدير تركيز الكربوهيدرات في المستخلص تم تقدير تركيز الكربوهيدرات في المستخلص وفق طريقة (Bishop *et al.,* 1985) من خلال رسم المنحني القياسي للكلوكوز .

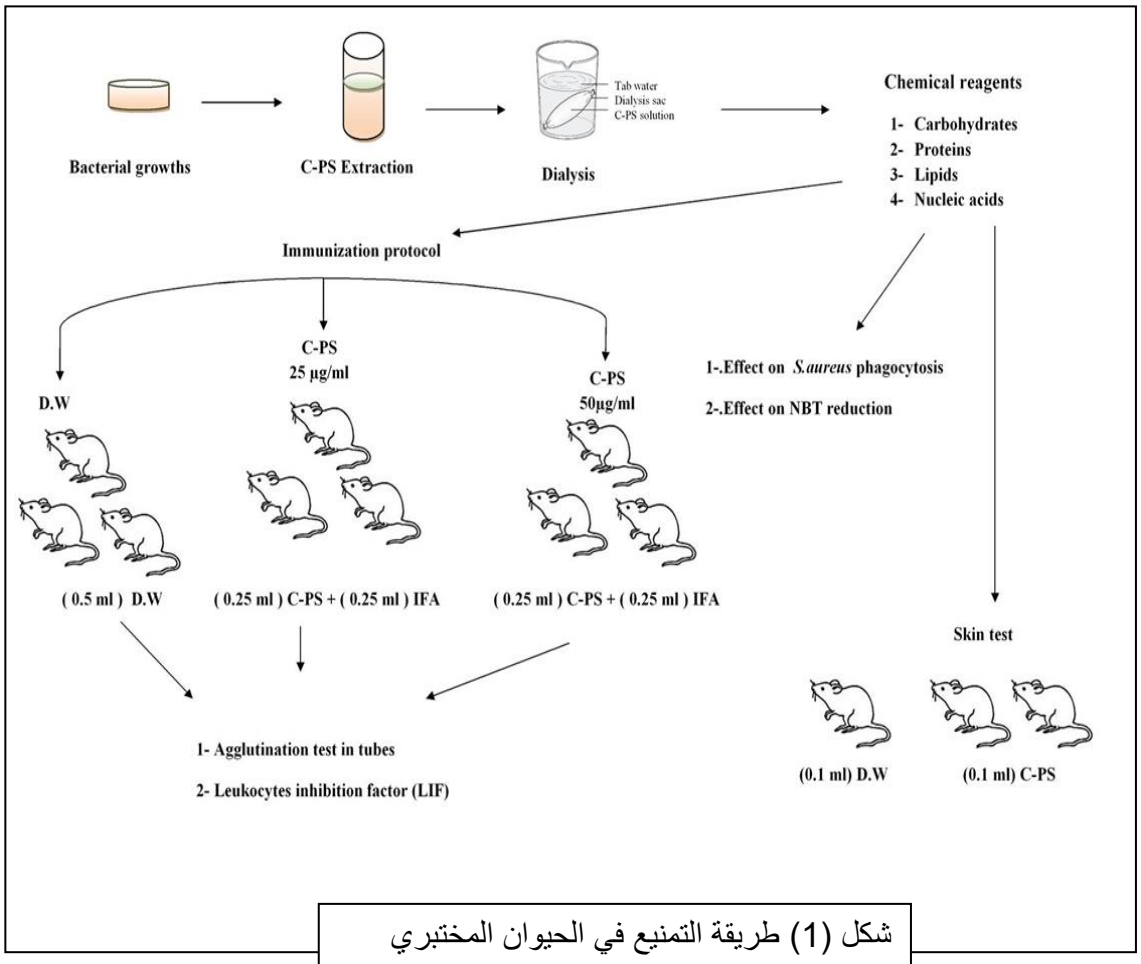
6 - فحص السلامة Safety test اجري هذا الفحص للتأكد من سلامة المستضد المستعمل في التجربة وحسب (Roitt *et al.,* 2001) .

7- فحص العقامة Sterility test زرعت عينة من المستضد المحضر على وسط الاكار المغذي الاعتيادي ، وحضنت الاوساط المزروعة بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة ، للتأكد من عدم تلوثه (Roitt *et al.,* 2001) .

8- **تأثير مستضد C-PS على اختزال صبغة NBT** استخدمت طريقة (Park *et al.,* 1968) .

9- برنامج التمنيع في الحيوان المختبري Immunization protocol استعمل ذكور الفئران المختبرية وبوزن يتراوح بين 20-25 غم في الدراسة المناعية ، اذ تم استخدام ثلاث مجاميع من الفئران ، وكانت كل مجموعة تتكون من ثلاث حيوانات ، جرى التمنيع لمدة ثلاثة عشر يوماً وبواقع 5 جرعات لكل مجموعة وكما في الشكل (1) .

حقنت المجموعة الاولى بتركيز 50 مايكروغرام/مل من المستضد اما المجموعة الثانية فحقنت بتركيز 25 مايكروغرام/مل ، اذ حقن المستضد بحجم 0.25 مل مع حجم مساوٍ من المساعد المناعيIFA (لِكلا المجموعتين كُلاً على انفراد) وبواقع ثلاث جرعات وخلال 7ايام ، اما الجرعة الرابعة والخامسة فحقن المستضد بدون مساعد مناعي وبحجم 0.5 مل في اليوم العاشر والثالث عشر، وحسب ماورد في Huebner *et al.* في عام (2000) حين حقنت المجموعة الثالثة بمحلول الملح الطبيعي المعقم كسيطرة وبواقع 0.5 مل ، و في اليوم الخامس عشر: شرحت الحيوانات بعد تخديرها بثاني اثيل الايثر، واخذ منها الدم ومن القلب مباشرة ثم وضع في انابيب اختبار حاوية على مانع التخثر وذلك للحفاظ على الدم من التجلط (حيث تم اجراء اختبار التلازن بالانابيب واختبار عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض) .



شكل (1) طريقة التمنيع في الحيوان المختبري

10- اختبار التلازن بالانابيب Agglutination test in tubes يكشف هذا الاختبار عن وجود أو عدم وجود خاصية ضدية للكلوبيولينات المناعية المصلية لمستضد C-PS وتحديد العيار وحسب (Garvey *et al*., 1977) .

11- اختبارعامل تثبيط هجرة الخلايا البيض Leukocytes inhibition factor (LIF) تم التحري عن وجود عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض في الدم ، وحسب طريقة,Soberg في عام (1969) وتم قراءة النتيجة حسب المعادلة التالية :

$$\text{معامل التثبيط} = \frac{\text{قطر دائرة الهجرة مع المستضد (ملم)}}{\text{قطر دائرة الهجرة من دون المستضد (ملم)}} \times 100$$

* النتيجة المعنوية بين 30-70 % .

12- اختبار الجلد Skin Test تم حقن 0.1 مل من مستضد متعدد السكريد المحفظي تحت الجلد في الفئران ، لمعرفة تأثير المستضد في فرط الحساسية Sensitivity و مدى تأثر المناعة الخلوية للحيوان ، وتم

متابعة الحيوانات بعد الحقن مباشرة خلال مدة 24–48 ساعة لملاحظة الاعراض الخلوية (Reece *et al.,* 2005) .

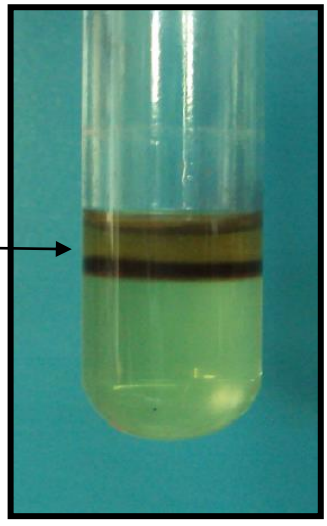
النتائج والمناقشة

الدراسة المناعية Immunological study

اعتماداً على نسبة الاصابة البكتيرية بالمكورات المعوية وانتاجها لعوامل الضراوة المختلفة ، تم انتخاب *Enterococcus faecalis* بأعتبارها البكتريا الاكثر ضراوة من بين عزلات المكورات المعوية واستخدامها في هذه الدراسة اذ تم التحري عن مستضد المحفظة في البكتريا وامكانية استخلاصه واستخدامه في حث الاستجابة المناعية المتخصصة والغير متخصصة .

الكشوفات الكيميائية اللونية على متعدد السكريد المحفظي

بعد إجراء عملية الاستخلاص بطريقة حامض النتروز والتخلص من الشوائب بعملية الفرز الغشائي تمت معاملة المستخلص بعدد من الكشوفات اللونية للتأكد من ان المادة المستخلصة من بكتريا *Enterococcus faecalis* هي متعدد السكريد المحفظي ، اظهر كشف مولش نتيجة موجبة بظهور حلقة ارجوانية اللون بين المستخلص وحامض الكبريتيك المستخدم في التجربة مما يدل على وجود الكربوهيدرات في المستخلص (Plummer, 1978) ، (الشكل 2) . اما باقي الكشوفات فقد اعطت نتيجة سلبية ، حيث لم يتلون المستخلص باللون البنفسجي عند معاملته بكشف البايوريت مما يؤكد خلو المستخلص من البروتينات ولم يتلون أيضا باللون الاخضر المزرق عند معاملته بكشف بايل وهذا دليل على عدم وجود الاحماض النووية في المستخلص كما اظهر كشف الاكرولين نتيجة سالبة حيث لم تنبعث رائحة تشبه رائحة تزنخ الدهون مما يؤكد خلو المستخلص من الدهون (Roitt *et al.,* 2001) .



شكل (2) وجود الكاربوهيدرات في المستخلص المعامل بكشف مولش .

تقدير تركيز متعدد السكريد المحفظي

جرى تقدير تركيز متعدد السكريد المحفظي لبكتريا *Enterococcus faecalis* في المستخلص وحسب طريقة Bishop *et al.* في عام (1985) بالاعتماد على المنحني القياسي للسكريات ، حيث اوضحت النتائج ان تركيز الكربوهيدرات في المستخلص بلغ 50 مايكروغرام/مل .

فحص السمية والعقامة

اظهرت النتائج سلامة المستضد المستخلص من البكتريا وعقامته حيث لم تسجل اي علامات مرضية على الفئران المحقونه به وهذا يدل على سلامة المستضد المحضر ، كما لم يظهر نمو بكتيري في الاوساط الزرعية التي زرعت عليها مسحات من المستخلص دلالة على عدم تلوثه بالبكتريا (Roitt *et al.,* 2001) .

تأثير مستضد C-PS على اختزال صبغة NBT

يبين الجدول (1) يلاحظ ان مستضد متعدد السكريد المحفظي لبكتريا *Enterococcus faecalis* قد سبب ارتفاع معنوي ($P\leq0.05$) في النسبة المئوية للخلايا المنتجة للاوكسيد الفائق مقارنة مع الخلايا غير المعاملة به .

اجري هذا الاختبار للتحري عن قابلية المستضد المستخلص في تنشيط عملية انتاج Superoxies من قبل الخلايا البلعمية PMNs ، حيث تتحول الصبغة المستخدمة في هذا الاختبار ذات اللون الاصفر بعد تفاعلها مع الاوكسيد الفائق المنتج من خلايا الـ PMNs الى حبيبات الفورمازان ذات اللون الاسود المزرق ، اذ تعمل هذه الصبغة كمستقبلات للالكترون وبالتالي يمكن ملاحظة هذه الحبيبات وعدها بالمجهر ومعرفة عدد الخلايا التي تعاني من الايض التأكسدي وحسب المعادلة (Reddy, 2010) .

$$NBT + O_2^- \rightarrow \text{Formazan stippling} + O_2$$

$$NADPH + O_2 \rightleftharpoons NADP + 2O_2^- + H^+ \quad \text{(Superoxide anion)}$$

جدول **(1)** تأثير مستضد متعدد السكريد المحفظي لبكتريا*Enterococcus faecalis* في انتاج الاوكسيد الفائق لخلايا الـ PMNs

ت	تركيز المستضد (مايكروغرام/مل)	النسبة المئوية لاختزال صبغة الـNBT
1	0	42
2	10	55
3	20	62
4	40	72.1
	$L.S.D_{(0.05)}$ =	3.13

ان عملية انتاج الجذور الحرة للاوكسجين داخل الخلايا البلعمية تحدث عند تعرض الخلايا الى العوامل الخارجية المختلفة ذات القدرة على التفاعل مع سطوح اغشيتها الخلوية مسببة تحفيز انزيمات الـ NADH/NADPH oxidase التي تعمل على اختزال الاوكسجين الى الاوكسيد الفائق مستخدمة مركبات الـ NADH و NADPH كواهبات للاكترون ، كما ان الجزء الاخر من الجذر الحر للاوكسجين يتحول الى بيروكسيد الهيدروجين بمساعدة بعض الانزيمات وكما في المعادلة ادناه (Rosenberg and Gallin, 2003) .

جاءت نتائج هذا الاختبار مؤكدة لتجربة تأثير هذا المستضد في بلعمة المكورات العنقودية المقتولة بالحرارة ، اذ ان زيادة انتاج الاوكسيد الفائق تعني زيادة في فعالية البلعمة ، اتفقت هذه الدراسة مع العديد من الدراسات التي اكدت ان السكريات المتعددة لها دور مهم في حث عملية انتاج الجذور الحرة للاوكسجين من الخلايا ذات الانوية متعددة المظهر، فقد اوضح Rasool *et al.* (1992) ان متعدد السكريد المستخلص من بكتريا *Salmonella choleraesuis* و*Salmonella typhimurium* قد سبب اختزالاً لصبغة الـ NBT حيث بلغت نسبة الخلايا البلعمية ذات الانوية متعددة المظهر والحاوية على حبيبات الفورمازان (0.14±0.41) و(0.15±0.48) على التوالي بعد مدة حضن 10 دقائق ، وهذا مقارب جداً للدراسة الحالية .

الدراسة المناعية في الحيوان المختبري

المناعة الخلطية Humoral Immunity

المستضدية المتخصصة Antigenimia بمستضد متعدد السكريد المحفظي لبكتريا *Enterococcus faecalis*

اجري فحص التلازن في الانابيب لمصول حيوانات الاختبار الممنعة بمستضد متعدد السكريد المحفظي لبكتريا*Enterococcus faecalis* ومقارنة النتائج مع حيوانات السيطرة للتحري عن وجود الاجسام المضادة المتخصصة في المصل ، اذ ان ارتباط المستضد مع الضد النوعي يؤدي الى تكوين معقد المستضد – الضد والذي يظهر بشكل كتل كبيرة يمكن ملاحظتها بالعين المجردة اذ ان مقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة موجبة يمثل عيارية الاجسام المضادة (Reddy, 2010) .

اوضحت النتائج ان المجموعة الاولى من الحيوانات المختبرية الممنعة بالمستضد وبتركيز 50 مايكروغرام/مل قد اعطت مستضدية جهازية وبمعدل 320 اما حيوانات المجموعة الثانية والممنعة بالمستضد وبتركيز 25 مايكروغرام /مل فقد اعطت مستضدية بمعدل 160 مقارنة مع حيوانات السيطرة التي اعطت مستضدية جهازية بمعدل 10 وكما مبين في جدول (2) .

تبين هذه النتائج ارتفاع في عيارية الاضداد لمصول الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المحفظي مقارنة مع حيوانات السيطرة ، اتفقت هذه النتائج مع دراسة Huebner *et al.* في عام (1999) والذي اوضح ان عيارية الاضداد النوعية المتولدة لمستضد متعدد السكريد المحفظي لبكتريا *Enterococcus faecalis* في مصول الفئران المختبرية قد ازدادت 320:1 ، كما اتفقت ايضاً

مع دراسة اخرى له والذي اشار فيها الى قدرة الحيوانات المختبرية على توليد اضداد نوعية لمستضد البكتريا*Enterococcus faecalis* في مصول الارانب وبمستوى عياري اعلى عند مضاعفة حجم المساعد المناعي(Huebner *et al.,* 1999) .

جدول (**2**) المستضدية الجهازية المتخصصة بمستضد متعدد السكريد المحفظي لبكتريا *Enterococcus faecalis* .

ت	الحيوانات	تركيز C-PS (مايكروغرام / مل)	العيار	المعدل
1	المجموعة الاولى (ثلاث حيوانات)	50	320	320
			320	
			320	
2	المجموعة الثانية (ثلاث حيوانات)	25	160	160
			160	
			160	
3	مجموعةالسيطرة (ثلاث حيوانات)	محلول الملح الطبيعي	10	10
			10	
			10	

ان استعمال المساعدات المناعية كمساعد فروند تسبب ارتفاع في عيارية الاضداد ، اذ وجد الباحث *Van de Wijgert et al.* في عام (1991) ان تمنيع الحيوانات المختبرية بمتعدد السكريد المحفظي لبكتريا *S.pneumonia* مع استعمال المساعدات المناعية قد سبب ارتفاع في عيارية الضد IgG_2a بمقدار 14% والـ IgG_2b بمقدار 3% وIGg_3 بمقدار 78% ، كما وجد الباحث *Ivanova et al.* في عام (1993) ان تمنيع الحيوانات المختبرية بمتعدد السكريد الشحمي لبكتريا *Proteus mirabilis* مع استعمال مساعد فروند قد اعطى عيارية للاضداد بمقدار 800:1 مقارنةً مع التمنيع من دون استعمال المساعد المناعي والذي اعطى عيارية للاضداد بمقدار 160:1 ، اتفقت نتائج هذة الدراسة ايضاً مع دراسة Pukhal`skii *et al.* في عام (1983) والذي استعمل طريقة التلازن الدموي المنفعل لتقدير الاضداد النوعية في مصول الفئران المختبرية الممنعة بـ (2.5-0.01) مايكروغرام من السكريدات المتعددة للجدار الخلوي لبكتريا*Neisseria meningitidis* .

ان اختبار التلازن المباشر بالانابيب يستخدم للتحري عن الاضداد النوعية المتولدة ضد المستضدات الدقائقية الكبيرة Particulate antigen ، اما اختبارات التلازن الدموي المنفعل Passive haemaglutination test فيستخدم لتحديد عيارية الاضداد المتكونة

ضـد المستضـدات الصـغير او الذائبـة Soluble antigens ففـي هـذا الاختبـار تحمـل هـذه المستضـدات علـى جزيئـات اخـرى مثـل خلايـا الـدم الحمـر للخـراف (SRBCs) Sheep red blood cells ، وكمـا فـي الـتلازن المباشـر فـأن مقلـوب اعلـى تخفيـف للمصـل يعطـي نتيجـة موجبة يمثل عيارية الاضداد المتولدة لتلك المستضدات (Coering *et al.,* 2008) .

كما اتفقت ايضاً نتائج الدراسة الحالية مع دراسة الذهب (2006) والتي وجدت ان عيارية الاجسام المضادة المتولدة ضد مستضد متعدد السكريد المحفظي لبكتريا *Haemophilus influenzae* كانت تتراوح بين 320–640 ، ودراسة Bortolussi and Ferrier في (1980) والتي بينت ان عيارية الاضداد في مصول الجرذان المختبرية الممنعة بمتعدد السكريد المحفظي لبكتريا *Escherichia coli* هي 640:1 ، كما اكدت العديد من الدراسات ان مستضد متعدد السكريد المحفظي في العديد من البكتريا له تأثير منشط للخلايا المساعدة Th2 في الاستجابة الاولية الخلطية ولها دور ربما يكون محفز لانتاج خلايا الذاكرة للنوع B او محفزاً لنشاط هذه الخلايا في الاستجابة الثانوية وزيادة في وضيفتها في انتاج الضد وهذا مطابق لنتائج الدراسة الحالية

(Maitta *et al.,* 2004; Sun *et al.,* 2001; Fattom *et al.*, 1996).

2.8.4 المناعة الخلوية Cellular Immunity

1.2.8.4 عامل تثبيط هجرة الخلايا البيض Leukocytes migration inhibitory factor (LIF)

استخدم هذا الاختبار للتحري عن افراز عامل الـ LIF في المصل والذي يعد واحد من نواتج الخلايا اللمفاوية المحفزة بالمستضد حيث ان هذه العوامل تعد واصلات كيميائية ترتبط بين الخلايا ، وعاملاً يضاعف الاستجابة المناعية ، اذ تعمل على الخلايا متعددة اشكال النوى والخلايا اللمفاوية والبلعمية الكبيرة ، ويعتبر عامل الـ LIF احد نواتج الخلايا التائية والمرتبطة بهجرة الخلايا البلعمية الكبيرة خلال استجابة فرط الحساسية المتأخرة (Reddy, 2010; Eales, 2003; Juttner *et al.*, 1998) .

تُظهر النتائج وجود تثبيط معنوي في حيوانات الاختبار فقد كانت نتيجة الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد المحفظي بتركيز 50 مايكروغرام/مل القيم (0.43 و 0.47 و 0.51) اي بمعدل 0.47 وكذلك كانت نتيجة الحيوانات الممنعة بالتركيز 25 مايكروغرام/مل القيم (0.59 و 0.63 و 0.67) اي بمعدل 0.63 وعند مقارنة هذه النتائج مع نتائج مجموعة السيطرة التي بلغت القيم (0.90 و 0.90 و0.90) وبمعدل 0.90 وجد ان هناك فرق معنوي وعلى مستولى احتماية ($P\leq 0.05$) وكما مبين في جدول (3) .

اثبتت نتائج الدراسة الحالية قدرة التركيزين (50 و 25) مايكروغرام / مل ، المستخدمين من مستضد متعدد السكريد المحفظي على تحفيز انتاج هذه العوامل مما ادى الى حدوث تثبيط معنوي لهجرة الخلايا مقارنة مع حيوانات السيطرة .

اوضحت دراسة اجراها Shizunobu *et al.* في عام (2010) ان الاصابة ببكتريا *Enterococcus faecalis* تؤدي الى تحفيز انتاج السايتوكينات من الخلايا التائية المحفزة ومنها

عامل التنخر الورمي TNF المهم في تثبيط هجرة الخلايا البيض وهذا موافق للدراسة الحالية ، وكانت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسة Ellerbroek *et al.* في عام (2002) اذ اوضحت ان تمنيع الفئران المختبرية بمتعدد السكريد المحفظي المستخلص من *Cryptococcus neoformans* يؤدي الى تثبيط واضح في هجرة الخلايا البيض ، كما اتفقت ايضاً مع دراسة Gross and Schlaak في عام (1984) والذي اشار ان التمنيع بالسكريد المتعدد للجدار الخلوي لبكتريا المجموعة A من المكورات المسبحية Group A Streptococcal قد حفز افراز هذه العوامل وبنسبة اعلى من المجاميع B و C و G من المكورات المسبحية واتفقت ايضاً مع دراسة Ellner and Daniel في عام (1979) والذي وجد ان التمنيع بالسكريد المتعدد للجدار الخلوي لبكتريا *Mycobacterium tuberculosis* ادى الى زيادة النسبة المئوية لتثبيط هجرة الخلايا .

جدول (3) اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيض LIF

ت	الحيوانات	تركيز C-PS (مايكروغرام / مل)	معامل التثبيط	المعدل
1	المجموعة الاولى (ثلاث حيوانات)	50	0.43	0.47
1			0.47	
1			0.51	
2	المجموعة الثانية (ثلاث حيوانات)	25	0.59	0.63
2			0.63	
2			0.67	
3	مجموعةالسيطرة (ثلاث حيوانات)	محلول الملح الطبيعي	0.90	0.90
3			0.90	
3			0.90	
*	L.S.D $_{(0.05)}$	=	0.08	

* فرق معنوي عند مستوى $P \leq 0.05$

ان عملية تثبيط هجرة الخلايا البلعمية PMNs داخل الجسم الحي تتم بمساعدة الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة Th لان افراز عامل تثبيط الهجرة من الخلايا T يؤدي الى تثبيط هجرة الخلايا البلعمية عن موقع حدوث الالتهاب ، ويعد عامل التنخر الورمي TNF هو المسؤول عن تثبيط هجرة خلايا الدم العدلة تحت الاكاروز بدليل ان الاضداد المحضرة ضد هذا العامل هي الوحيدة القادرة على ازالة فعالية تثبيط الهجرة Roitt *et al.* في عام (2001) .

اظهرت النتائج ايضاً ان معامل تثبيط الهجرة LIF قد تغاير بأختلاف التركيز المستخدم في التمنيع وجاء هذا منسجم مع العديد من الدراسات التي اشارت ان قدرة تحفيز الخلايا التائية لأنتاج السايتوكينات ومنها الـ LIF بفعل المستضدات المختلفة يعتمد على الخلايا المحفزة وتركيز المستضد (Coering *et al.,* 2008) .

اختبار الجلد Skin

اجري هذا الاختبار للتحري عن الاستجابة المناعية الخلوية اذ اظهرت النتائج ظهور علامات التحسس الخلوي (الاحمرار والتنخر والتصلب والتثخن) عند حقن مستضد متعدد السكريد المحفظي للبكتريا تحت الجلد خلال 24 ساعة من الحقن وهذا هو فرط الحساسية الاني ، كما لوحظت علامات فرط الحساسية المتأخرة بزيادة قطر التثخن والانتفاخ بعد مرور 48 ساعة من حقن المستضد تحت الجلد بالحيوانات الممنعة بنفس المستضد .

يحدث تفاعل الحساسية الجلدي بعد مرور (8–10) ساعة من الحقن وهذا التفاعل يتميز بأرتشاح الخلايا البلعمية واللمفاوية وعدد من الخلايا في موضع الالتهاب من خلال توسع الاوعية الدموية الموضعية وسرعان مايتلاشى بعد مرور 24 ساعة وهذا هو فرط الحساسية الاني ، فيما يستغرق فرط الحساسية الاجل 48 ساعة وهو من تفاعلات المناعة المتوسطة بالخلية Cell mediated immunity (CMI) اكثر من كونها تفاعلات مناعة خلطية وتكون الخلايا التائية نوع T–helper (Th1) هي المسؤولة عن هذا التفاعل حيث ان التنشيط بواسطة الخلايا المقدمة للمستضد

Antigen presenting cells (APCs)

يؤدي الى تحرير عدد من السايتوكينات قبل الالتهابية Proinflammatory cytokines من خلايا T التي تجذب البلاعم الكبيرة (Roitt *et al.,* 2001) .

جاءت هذا الدراسة متوافقة مع دراسة كل من Jones and Berman في عام (1975) و Yoshikawa *et al.* في عام (1990) و Shimada *et al.* في عام (2009)

References.

Bishop, M.C.; Dben-VonLaufer, J.L.; Fody, E.P. and Thirty three contributors. (1985). Clinical Chemistry Principles, Procedures and Correlations. The Murray Printing company. Philadelphia, pp:181-182.

Coering, R.V.; Dockrell, H.M.; Mims, C.; Zuckerman, M.; Wakelin, D.; Roitt, I. M. and Chiodini, P.L. (2008). Medical Microbiology. 4thed. Mosby Elsevier.189-246.

Eales, L.J. (2003). Immunology For Life Scintists. 2nd ed. Wiley, T.J. International, Washington, D.C. 75-145.

Ellerbroek, P.M.; Hoepelman, A.I.M.; Wolbers, F.; Zwaginga, J.J. and Coenjaerts, F.E.J. (2002). Cryptococcal glucuronoxylomannan inhibits adhesion of neutrophils to stimulated endothelium *in vitro* by affecting both neutrophils and endothelial cells. Infect. Immun., 70(9):4762-4771.

Ellner, J.J. and Daniel, T.M. (1979). Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. Clin. Exp. Immunol., 35(2): 250–257.

Facklam, R.R. and Carey, R.B. (1985). Streptococci and Aerococci. In Lennette, E.H.; Balow, A.; Husler, W.J. and Shadomy, H.J. (1985). Manual of Clinical Microbiology. 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 154-173.

Fattom, A.I.; Sarwar, J.; Ortiz, A. and Naso, R. (1996). A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. Infect. Immun., 64(5): 1659–1665.

Garvey, J.S.; Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H. (1977). Methods in Immunology.3th ed. W.A. Benjamin, Inc. Massachusetts. pp: 518, 356-359.

Gross, W.L. and Schlaak, M. (1984). Modulation of human lymphocyte functions by group A Streptococci. Clin. Immunol. Immunopathol., 32(2):234-247.

Huebner, J.; Quaas A.; Krueger, W.A.; Goldmann, D.A. and Pier, G.B. (2000). Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant enterococci. Infect. Immun., 68:4631-4636.

Ivanova, E.; Kenarova, B. and Gumpert, J. (1993). Adjuvant activity of the *E.coli* WF+ stable L-form cytoplasmic membrane. Acta. Microbiol. Bul., 29:154-160.

Jones, L.M. and Berman, D.T. (1975). Antibody-mediated and delayed-type hypersensitivity reactions to Brucella skin test antigens in guinea pigs. Infect. Immun., 11(2): 360–364.

Juttner, S.; Bernhagen, J.; Metz, C.N.; Rollinghoff, M.; Bucala, R. and Gessner, A. (1998). Migration inhibitory factor induces killing of Leishmania major by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. J. Immunol., 161(5):2383-2390.

Maitta, R.W.; Datta, K.; Lees, A.; Belouski, S.S. and Pirofski, L. (2004). Immunogenicity and efficacy of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide Glucuronoxylomannan peptide mimotope-protein conjugates in human immunoglobulin transgenic mice. Infect. Immun., 72(1): 196–208.

Park, B.H.; Fikrig, S.M.; and Smithwick, E.M. (1968). Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet, 2: 532-534.

Plummer, D.T. (1978). An Introduction to Practicl Biochemistry. McGraw-Hill Book Company limited.

Pukhal'skii, A.L.; Pisarev, V.M.; Alliluev, A.P. and Kotel'nikova, O.V. (1983). Immune response of mice of different lines to meningococcal polysaccharide group A antigen. B. Exp. Biol. Med., 95(6): 828-831.

Rasool, O.; Nnalue, N.A. and Jarstrand, C. (1992). The role of O-antigen polysaccharide in the activation of neutrophils by lipopolysaccharides of *Salmonella* species. Clin. Exp. Immunol., 90(1):63-67.

Reddy, K.R. (2010). Microbiology and Parasitology . 4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.

Reece, S.T.; Stride, N.; Ovendale, P.; Reed, S.G. and Campos-Neto, A. (2005). Skin test performed with highly purified *Mycobacterium tuberculosis* recombinant protein triggers tuberculin shock in infected guinea pigs . Infect. Immun., 73(6): 3301-3306.

Roitt, I.; Brostoff, J. and Male, D. (2001). Immunology. 6th ed. Harcourt publisher limited. Mosby. London.

Rosenberg, H.F., and Gallin, J.I. (2003). Inflammation. In Paul, W.E. Fundamental Immunology. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, London. pp: 1151-1169.

Schmidt, W.C. (1952). Group A *Streptococcus* polysaccharide studies on its preparation, clinical composition , and cellular localization after intervenous injection into mice. J. Exp. Med. 95: 105-116.

Shimada, T.; Cai, Y.; Cheng, L.; Motonaga, C.; Fukada, K.; Kitamura, Y. and Wu, J. (2009). Immunomodulation effects of heat-treated *Enterococcus faecalis* FK-23(FK-23) in mice. J. Nanjing Medical University., 23(3):173-176.

Shizunobu, I.; Minoru, F.; Shun'ichiro, T.; Michihiko, H.; Takayuki, S. and Akinobu, K. (2010). Obligately anaerobic mutant lactic acid bacterium and preparation method therefor, and expression vector functioning in obligately anaerobic lactic acid bacterium. Infect. Immun., 36:435-444.

Soberg, M.; (1969). *In vitro* migration inhibition of peripheral blood leucocytes in delayed type hypersensitivity. Acta. Medica., 184:13-25.

Sun, Y.; Hwang, Y. and Nahm, M.H. (2001). Avidity, potency, and cross-reactivity of monoclonal antibodies to Pneumococcal capsular polysaccharide serotype 6B. Infect. Immun., 69(1): 336–344.

Van de Wijgert, J.H.; Verheul, A.F.; Snippe, H.; Check, I.J. and Hunter, R.L. (1991). Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide: influence of carriers and adjuvants on isotype distribution. Infect. Immun., 59(8): 2750-2757.

Yoshikawa, K.; Ohno, S.; Sasamoto, Y. and Matsuda, H. (1990). Studies on delayed skin reactivity to streptococci in Behçet's disease. Nippon Ganka Gakkai Zasshi., 94(2):181-185.

الـذهب ، ازهـارعمران لطيـف (2006). خمـج الاغشـية السـحائية المتخفـي وبعـض اوجـه المناعـة الموضـعية والجهازية الخلطية. اطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة بابل .