

دراسة متعدد السكريد المحفظي المستخلص من بكتريا *Klebsiella planticola*

على بعض وظائف الخلايا PMNs

اسامة باسم عبد الخالق الصفار

كلية مدينة العلم الجامعة - قسم علوم الحياة

الكاظمية - بغداد - العراق

O2004B2005@yahoo.com

الخلاصة

أخذت 4 عزلات من *K. Planticola* من المراكز البحثية، تم إعادة تشخيص البكتريا اعتماداً على الخصائص الزرعية والكيميائية الحيوية، اختيرت العزلة Kp4 لاستعمالها في بقية التجارب اللاحقة وذلك لكفاءتها في إنتاج حامض الكالكتويورونك Galacturonic acid وبتركيز (29) مايكروغرام/مل كدليل الإنتاج الفائض من متعدد السكريد المحفظي ، وإعطائها صفات تشخيصية كيميائية حيوية نموذجية وثبات هذه الصفات طيلة فترة البحث. تم استخلاص وتنقية متعدد السكريد المحفظي Capsular Polysaccharides CPS باستخدام وسط (Brain heart Infusion broth) مضاف اليه الخميرة وسكر المالتوز لغرض الإنتاج، تم استخلاص CPS باستخدام (Cetavlon) وتنقيته بالكحولات ،وقدر تركيزه بعد تنقيته اذ بلغ (167)مكغم/مل. شمل تأثير مستضد متعدد السكريد المحفظي المنقى CPS بالتراكيز (5,10,20,50) مكغم/مل المعزولة من بكتريا *K. planticola* (Kp4) على الاستجابة المناعية لتحقيق ذلك أجريت الاختبارات المناعية الآتية على خلايا الدم المحيطي للإنسان في الزجاج (in vitro):قابلية النمو (Viability) للخلايا البلعمية متعددة اشكال النوى (PMNs)، وبلعمة (Phagocytosis) خميرة *Candida albicans* وهجرة (Migration) الخلايا متعددة اشكال النوى تحت الاكاروز أمكن الحصول على النتائج الآتية :

أدت تراكيز CPS (20,50) مكغم/مل إلى انخفاض في كل من النسبة المئوية قابلية النمو للخلايا (PMNs) ومعامل البلعمة وكان هذا التأثير معنوياً بمستوى ($p < 0.05$) مقارنة مع معاملة السيطرة، أما التراكيز (50) مكغم/مل فقد استطاع ان يثبط هجرة الخلايا (PMNs).

أدت تراكيز CPS (5,10) مكغم/مل إلى زيادة معامل البلعمة معنوياً بمستوى ($p < 0.05$) مقارنة مع معاملة السيطرة.

المقدمة

عرفت بكتريا *Klebsiella* بإنها ممرضات رئوية وتعد بكتريا *Klebsiella* من العصيات السالبة لملون غرام تنتمي الى العائلة المعوية وهي من الفلورا الطبيعية الوقئية (Transient) الموجودة على جسم الإنسان وفضلا عن معيشتها الرمية في البلعوم الانفي (Nasopharynx) والقناة المعوية فهي تمثل أحد أنواع الممرضات الأنتهازية (Opportunistic) والتي تعزل من مختلف النماذج المرضية ومن المسببات الشائعة لأخماج المستشفيات (Nosocomial Infection) (9). تمتلك بكتريا *Klebsiella planticola* عدد من عوامل الفوعة التي تشترك بامراضيتها وتتضمن مستضدات المحفظة وعوامل الالتصاق المتمثلة بالأهداب، ونتاج الذيفانات الداخلية مثل متعدد السكريد الشحمي (24).

تتصف بكتريا *K. Planticola* بامتلاكها محفظة سميكة يبلغ سمكها 160 نانوميتر مؤلفة من معقد لسكريات متعددة حامضية لاحتوائها على حامض الكالكتويورونك (Galacturonic acid) (11) . والذي يؤدي دورا مهما في تثبيت التركيب الغشائية للبكتريا (11) .

يشكل متعدد السكريد المحفظي معظم الطبقة الخارجية لبكتريا *K. Planticola* ويلعب دورا رئيسيا في مقاومة هذه البكتريا لعملية البلعمة بواسطة الخلايا العدله متعددة اشكال النوى Polymorphonuclear cells (25) . وهو معقد ثابت بالحرارة heat stable يشكل حاجزا فيزيائيا يحمي البكتريا من الجفاف ويؤثر في قابلية التوصيل الحراري للغشاء الخلوي (12).

نظرا لأن متعدد السكريد المحفظي (Capsular polysaccharides CPS) لهذه البكتريا غير سام لذلك فقد أجريت بحوث حول معرفة دوره المؤثر ضد الأورام (antitumor) لانه يزيد من الفعاليه ضد الورمية للخلايا القاتله خارج الجسم الحي وداخله (13).

أهداف البحث

اختيار عزله كفاءة من بكتريا *Klebsiella planticola* ذات أنتاجيه عالية من متعدد السكريد المحفظي. استخلاص وتنقية متعدد السكريد المحفظي وتحضير تراكيز مختلفة منه لاستخدامها في الدراسة. ملاحظة التأثير المناعي من التراكيز المختلفة من متعدد السكريد المحفظي المنقى خارج الجسم الحي (*in vitro*) على بعض وظائف الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى

مواد وطرائق العمل

الصفات المظهرية

تم الحصول على 4 عزلات جاهزة ومشخصة من قبل المراكز البحثية في جامعة النهريين وجامعة بغداد. ولتاكد تم اعادة الاختبارات التشخيصية حيث زرعت العينات على الأوساط الزرعية أكار الدم Blood Agar و أكار الماكونكي MacConky Agar ثم حضنت بحرارة

(37) م لمدة (24) ساعة للحصول على المستعمرات ، نقلت ونقيت المستعمرات وتم تنقيتها إلى مستعمرات منفردة وشخصت حسب الطرائق المعتمدة من قبل Macfaddin (18).

التصبيغ بملون غرام Gram stain.

أخذت مسحة من مستعمرة بكتيرية منفردة بوساطة الناقل المعقم ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وثبتت المسحة وصبغت بملون غرام وبعد جفاف الشريحة فحصت مجهريا لملاحظة طبيعة تصبيغ الخلايا البكتيرية وشكلها وتجمعاتها .

الاختبارات الكيميائية الحيوية Biochemical Tests .

أجريت الفحوصات الكيميائية الحيوية التالية للتأكد من جنس البكتريا ونوعها وفقا لطريقة Collee et al., (1996) وباستخدام الاختبارات التالية:-

. Indole Test

. MR-VP Test

. Simmon Citrate

. Urease Test

Triple Sugar Iron Agar

. Malonate

Catalase Test

. Oxidase Test

التحري عن وجود المحفظة باستعمال التصبيغ السالب Negative staining

اتبعت طريقة المسحة الرطبة بوضع قطرة من الحبر الهندي على شريحة زجاجية نظيفة ونقلت مستعمرة فتية بعمر (18 – 24) ساعة ومزجت مع الحبر مزجا جيدا ثم وضع غطاء الشريحة وسحبت لتكوين مسحة وبعثرة تكتلات الخلايا . فحصت بالعدسة الزيتية ، دل وجود الهالة الشفافة غير المصبغة بالحبر على وجود المحفظة (6) .

التحري عن متعدد السكريد المحفظي كميأ

أجريت الطريقة حسب ما جاء في Bitter and Muir (1962). حيث نميت العزلات في وسط Tryptic Soya broth. وطردت مركزيا وأضيف إلى الراسب PBS واجريت عملية الطرد

المركزي مرة اخرى وأضيف إلى الراسب PBS وطردت مركزياً. وأخذ 1 مل من الراشح وأضيف حامض الكبريتيك المركز اليه وبعد حمام مغلي لمدة 5 دقائق. برد المزيج وأضيف إليه مادة Carbazole إذ تحول لون المزيج الى الوردي، يترك المزيج ساعتين. ثم قرأت الامتصاصية على طول موجي (530) نانوميتر. حضر في الوقت نفسه منحنى قياسي باستعمال حامض الكالكتويورونك Galacturonic acid بتراكيز (10, 20, 30, 40, 50, 60) مكغم/مل، ويمثل الشكل (1) المنحنى القياسي لتقدير تركيز الحامض واعتمد في حساب تراكيز حامض الكالكتويورونك للعزلات المنتجة من خلال المنحنى القياسي.

اختيار العزلة الكفوءة المنتجة لمتعدد السكريد المحفظي.

اختيرت العزلة الكفوءة المنتجة لمتعدد السكريد المحفظي اعتماداً على إعطائها صفات نموذجية بالنسبة للفحوصات السابقة فضلاً عن كفاءتها في إنتاج حامض الكالكتويورونك.

استخلاص وتنقية متعدد السكريد المحفظي

أجريت الطريقة وفقاً لما جاء في (Cryz et al., 1985) حيث نمت العزلة الكفوءة في وسط إنتاج متعدد السكريد المحفظي بإضافة الخميرة و سكر المالتوز Maltose إلى وسط Brain heart infusion (BHI) السائل وبعدها نقل المزروع البكتيري إلى دورق وحضن الدورق بالحاضنة الهزازة. نقل المزروع إلى أنابيب طرد مركزي وأزيلت الخلايا البكتيرية من المزروع بالطرد المركزي وجمع الراسب وحفظ بدرجة حرارة (-20)°م لحين استعماله. جمع الراشح وعقم بالترشيح، أضيف السيتافلون إلى الراشح، ثم ترك المزيج في دورق على جهاز Magnetic Starrier. أعيدت عملية الطرد المركزي، ثم جمع الراسب وأذيب بمحلول $CaCl_2$. أضيف الكحول الايثيلي إلى المحلول السابق. وترك على Magnetic Starrier لكي يتم فصل الأحماض النووية الموجودة مع العالق. رسبت الأحماض النووية بالكحول بواسطة الطرد المركزي. رسب متعدد السكريد المحفظي بزيادة تركيز الكحول الايثيلي ثم طرد مركزياً. جمع الراسب وأذيب بالماء المقطر المعقم تمت التنقية باستعمال قمع الفصل لثلاث مرات وبحجم مساوٍ من محلول الفصل جمعت الأطوار المائية وأجريت لها عملية الفرز الغشائي Dialysis. ورسب متعدد السكريد المحفظي النقي باستعمال الايثانول وجمع الراسب بالطرد المركزي. أجريت عملية الفرز الغشائي مرة أخرى وعقم متعدد السكريد المحفظي النقي Purified CPS بمرشحات وحفظ في أنابيب معقمة بالمجمدة (-20)°م.

عزل الخلايا البلعمية متعددة اشكال النواة

عزل الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs) Polymorphonuclear cells من الدم المحيطي للإنسان بعد سحب الدم منه. وعزلت خلايا (PMNs) تبعاً لطريقة Cech and Lehrer (1984)، بعدها مزجت محتويات الأنبوبة بلطف ووضعت في الحاضنة لمدة (45) دقيقة. لوحظ تكون طبقتين السفلى تحوي خلايا الدم الحمر والعليا تحوي البلازما الغنية بخلايا الدم البيض، نقلت إلى إنبوبة أخرى معقمة وغسلت الخلايا بمحلول هانكس HBSS لعدة مرات. علقّت الخلايا بالوسط الزراعي النسيجي RPMI - 1640. وحسبت الخلايا اعتماداً على

طريقة Hudson and Hay (15)، باستخدام صبغة التريبيان الزرقاء وساطة شريحة عدّ خلايا الدم Haemocytometer تحت المجهر الضوئي اذ عدت الخلايا المصبوغة ميتة أما الخلايا التي لم تأخذ الصبغة فهي على الاغلب خلايا حيّة .

تأثير متعدد السكريد المحفظي المنقى على قابلية النمو للخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs).

اتبعت طريقة Nonoyama *et al.*, (1979) حيث حضر عالق الخلايا البيض متعددة أشكال النوى (PMNs) في وسط RPMI - 1640. حضرت تراكيز نهائية من متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى هي (5، 10، 20، 50، 100) مكغم / مل في الوسط RPMI - 1640 في أنابيب بلاستيكية معقمة. أضيف 0.5 مل عالق الخلايا (PMNs) من كل تركيز من تراكيز CPS في أنابيب معقمة مع ترك إنبوبة بالتركيز صفر لكل من المستضدين كمعاملة سيطرة. حضنت الأنابيب لمدة ساعة واحدة. ثم حسبت (200) خلية لأستخراج النسبة المئوية قابلية النمو الخلايا بإستعمال صبغة التريبيان الزرقاء باعتبار الخلايا المصبوغة ميتة. وباستخدام القانون الآتي (19) :

عدد الخلايا الحية

$$\text{النسبة المئوية لقابلية النمو الخلايا البلعمية} = \frac{\text{عدد الخلايا الحية}}{100} \times 100$$

العدد الكلي

تأثير متعدد السكريد المحفظي المنقى على عملية بلعمة خميرة المبيضة البيضاء *Candida albicans*.

اعتمدت طريقة Cech and Lehrer (1984) حيث حضر عالق الخلايا البلعمية متعددة اشكال النوى (PMNs)، كما حضر عالق الخميرة بتركيز $(10^6 \times 8)$ خلية / مل. و حضرت تراكيز من متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى (5، 10، 20، 50) مكغم/مل. و حضرت إنبوتنا سيطرة بتركيز صفر، وأضيف عالق PMNs والخميرة بنسبة (4:1) على التوالي. و اضيف (0.25 مل) (مصل الدم ووضعت في حمام مائي هزاز للفترات الزمنية (30، 60، 90، 120) دقيقة. بانتهاء كل فترة زمنية حضرت مسحات من كل تركيز على شرائح زجاجية نظيفة. تركت لتجف ثم ثبتت بالكحول المثيلي وصبغت بصبغة Giemsa ، فحصت بالعدسة الزيتية و عدّت (200) خلية لحساب معامل البلعمة (PI) Phagocytic Index (PI) وكالاتي (5) :-

عدد الخلايا البلعمية الملتهمة

$$\text{معامل البلعمة PI} = \frac{\text{عدد الخلايا البلعمية الملتهمة}}{100} \times 100$$

عدد الخلايا الكلي

تأثير متعدد السكريد المحفظي المنقى على هجرة الخلايا البلعمية (PMNs) تحت الاكاروز.

أجريت على وفق ما جاء في (Nonoyama *et al.*, 1979) حضر متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى بالتراكيز (5، 10، 20، 50) مكغم/مل في وسط RPMI – 1640 ثم أضيفت محتويات الأنبوبة إلى وسط الهجرة في أطباق. أضيف محلول PBS إلى وسط الهجرة واعتبر سيطرة سالبة. أضيف 1 مل من (Phytohemagglutinin PHA) بتركيز (10) مكغم/مل إلى وسط الهجرة واعتبر سيطرة موجبة. بردت الأطباق بحرارة (4)° م ، ثم ثقت طبقة الاكاروز وضع عالق الخلايا PMNs في كل حفرة معمولة في أطباق السيطرة السالبة والموجبة ، حضنت في غاز CO₂ لمدة (24) ساعة. بعد انتهاء مدة الحضانة ثبتت الخلايا باستعمال الكحول المثيلي ثم أزيلت طبقة الاكاروز وأهملت. صبغت الأطباق بصبغة Giemsa لمدة (20) دقيقة. فحصت الأطباق تحت المجهر الضوئي، لحساب المسافة التي تحركتها الخلايا. قُدِّر قطر دائرة الهجرة ثم استخرج عامل تثبيط الهجرة Migration Inhibition Factor

(MIF) وفقا لطريقة (Federlin *et al.*, 1971) وحسب القانون الاتي (10) :

قطر دائرة الهجرة (ملم) في معاملة الاختبار

عامل تثبيط الهجرة (MIF) = -----

قطر دائرة الهجرة (ملم) في معاملة السيطرة

التحليل الإحصائي .

حللت النتائج إحصائيا باستخدام اختبار تحليل التباين باتجاه واحد Anova one way كما استخدم اقل فرق معنوي (Least Significant Difference (LSD) للبحث عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة وعلى مستوى معنوية (0.05) وثبتت النتائج بشكل (المعدل الحسابي + الانحراف المعياري).

النتائج والمناقشة

الصفات الزرعية والفحص المجهرى

أظهرت نتائج المبينة في الجدول (1) الزرع ان مستعمرات بكتريا *Klebsiella planticola* استطاعت النمو على وسط الماكونكي وخمرت سكر اللاكتوز فيه وأعطت مستعمرات وريه براءة ذات قوام مخاطي وهي صفة مميزة لهذه البكتريا ، اما مستعمراتها على وسط أكار الدم فكانت شفافة لماعة غير محللة لكريات الدم الحمراء (16)، أوضحت نتائج الفحص المجهرى للشرائح المحضره من تلك المستعمرات وباستخدام التصبيغ بطريقة غرام أنها عصيات قصيرة سالبة لملون غرام اتخذت هيئة مفردة أو مزدوجة أو بشكل سلاسل قصيرة ، (14) .

التشخيص الكيمياء الحيوي

أشارت النتائج المبينة في الجدول (2) إلى الفحوصات الكيميائية الحيوية والتي اعتمدت لتأكيد نوع العزلة *K. planticola* وفقاً لما جاء في (20) .

التحري عن وجود المحفظة Capsule

أظهرت النتائج أن جميع العزلات قد امتلكت المحفظة بعد أن تم التحري عن وجود المحفظة باستعمال طريقة التصبغ السالب Negative staining، ويوضح الشكل (2) مسحة لأحدى هذه العزلات مصبوغة بطريقة التصبغ السالب باستعمال الحبر الهندي إذ تلاحظ المحفظة بشكل هالة شفافة تحيط ببقية جسم الخلية البكتيرية في حين تظهر الأرضية سوداء معتمة (6).

التحري عن متعدد السكريد المحفظي كميًا .

بالرغم من أن طريقة التصبغ السالب أثبتت امتلاك جميع العزلات محفظة إلا أنه كان لابد من التحري عن متعدد السكريد المحفظي كميًا لاختيار أكفأ العزلات بالإنتاج ، لذا فقد أجريت طريقة قياس كمية حامض الكالكتويورونك Galacturonic acid العزلة المختارة قيد الدراسة ومقارنتها مع المنحنى القياسي لتراكيز محضرة من هذا الحامض (11) .

اختيار العزلة الكفوءة في إنتاج متعدد السكريد المحفظي.

تم اختيار العزلة Kp4 من بكتريا *K. planticola* جدول (3) وذلك من خلال صفات نموذجية في الفحوصات الكيميائية الحيوية التي أجريت لها وإثناء اختبارها عن كفاءتها في إنتاج حامض الكالكتويورونك واحتوائها على محفظة كبيرة الحجم وثبات صفاتها الزرعية طيلة فترة البحث .

استخلاص وتنقية متعدد السكريد المحفظي (CPS) Capsular polysaccharides .

وجد أن وسط BHI مع خلاصة الخميرة وسكر المالتوز كان وسط ملائم لإنتاج CPS. كما يعد استخدام Cetavlon ضرورياً في عملية فصل متعدد السكريد المحفظي. في حين أن الأحماض النووية الموجودة تتم إزالتها بترسيبها بكحول ethanol. جمع متعدد السكريد المحفظي CPS بمعاملة ethanol ثم تم التخلص من بقايا البروتينات من خلال فصلها بمذيبات عضوية هي مزيج من كلوروفورم - بيوتانول (5:1) على التوالي. أثبتت هذه الطريقة كفاءتها بالحصول على متعدد السكريد المحفظي النقي Purified CPS وتم التأكد نوعياً من وجوده بإجراء اختبار مولش Molish test (21) .

إن تركيز متعدد متعدد السكريد المحفظي المنقى Purified CPS تم تقديره باستعمال طريقة الفينول - حامض الكبريتيك المركز (Dubois et al., 1956) من خلال رسم العلاقة بين تراكيز الكلوكوز القياسي والامتصاصية على طول موجي (490) نانوميتر إذ وجد أن تركيز متعدد السكريد المحفظي المنقى الذي تم الحصول عليه بلغ (167) مكغم/مل.

تأثير متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى على قابلية نمو الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs).

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بعد معاملة الخلايا البلعمية متعددة أشكال بالتراكيز (5،10،20،50،100)مكغم/مل من متعدد السكريد المحفظي CPS ولمدة ساعة واحدة، الجدول (4) إن التراكيز (5،10) مكغم/مل من متعدد السكريد المحفظي لم تكن ذات تأثيرا معنويا في قابلية النمو للخلايا البلعمية (PMN) بمستوى ($p < 0.05$) في الوقت الذي كان للتراكيز (20، 50، 100) مكغم/مل تأثيرا معنويا في قابليتها على النمو بمستوى ($p < 0.05$) حيث انخفضت النسبة المئوية قابلية النمو هذه الخلايا مقارنة مع معاملة السيطرة وكذلك الحال عند استخدام التركيز (100)مكغم/مل إذ انخفضت النسبة المئوية قابلية النمو للخلايا البلعمية من (96.8) في معاملة السيطرة إلى (83.6) عند التركيز (100)مكغم/مل على التوالي، كما يلاحظ من الجدول انه لا توجد فروق معنوية بمستوى ($p < 0.05$) بالنسبة المئوية قابلية النمو للخلايا (PMNs) بين التركيزين (20، 50) مكغم/مل.

تأثير متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى على عملية التهام الخميرة *Candida albicans*.

بينت نتائج الموضحة بالجدول (5) تأثير CPS المنقى على عملية التهام الخميرة كما في الشكل (3) ان معدلات معامل البلعمة (Phagocytic Index PI) لخلايا PMNs المعاملة بالتراكيز (5، 10، 20، 50) مكغم /مل من مستضد متعدد السكريد المحفظي لفترات زمنية مختلفة مقارنة بالسيطرة. إذ يلاحظ من الجدول ان معامل البلعمة يزداد مع زيادة الزمن تدريجياً بشكل معنوي حتى وصل أقصاه عند 90 دقيقة ثم عاد لينخفض خلال 120 دقيقة ولجميع التراكيز المستعملة ومن ذلك يلاحظ أن هناك علاقة وثيقة بين عامل الوقت ومعامل البلعمة وان كفاءة الخلايا للالتهام تزداد بمرور الوقت، فيما تبدأ بعد الدقيقة 90 بفقدان قدرتها على الالتهام ، وقد برر ذلك (Lock et al., 1990) إلى زيادة تركيز الانزيمات الحالة والمواد السامة التي تنتج من قبل الخلايا نفسها نتيجة هذه العملية. وبينت ان هناك انخفاض معنوي على مستوى ($p < 0.05$) بزيادة التركيز ولجميع الأوقات المستخدمة بالتجربة كما لوحظ عدم وجود فرق معنوي بمستوى ($p < 0.05$) بين التركيزين (5،10)مكغم/مل في الزمن (90،120) دقيقة. ان عملية البلعمة تتم بواسطة الخلايا الوحيدة النواة في الدم التي تتحول الى خلايا البلعم الكبير عند وصولها الى الانسجة وتقوم بعملية البلعمة، ويمكن قياس فاعلية هذه الخلايا ونشاطها من خلال عملية الالتهام وقابليتها على التخلص من الجراثيم والأجسام الغريبة الداخلة للجسم بما يعرف بعملية البلعمة Phagocytosis (1). يوفر متعدد السكريد المحفظي للبكتريا حاجزا فيزيائيا ضد عملية البلعمة antiphagocytic barrier يعترض عملية ارتباط مكونات العامل المتمم مع مستلماتها على الخلايا البلعمية (2).

تأثير متعدد السكريد المحفظي CPS على هجرة الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs)

اشارت النتائج في جدول (6) الى تأثير متعدد السكريد المحفظي المنقى على هجرة الخلايا البلعمية (PMNs) وعامل تثبيط الهجرة (Migration Inhibition Factor MIF) حيث بينت ان التراكيز (5،10،20) مكغم/مل من متعدد السكريد المحفظي المنقى أدت إلى زيادة في

قطر دائرة الهجرة عندما بلغت (16.87,17.6,18.5) ملم على التوالي وتعد هذه الزيادة معنوية بمستوى ($p < 0.05$) للتركيز (5) مكغم/مل مقارنة مع معاملتي السيطرة السالبة والموجبة (PHA) في حين ان الزيادة للتركيزين (20,10) مكغم/مل غير معنوية بمستوى ($p < 0.05$) مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة وأدى التركيز (50) مكغم/مل إلى انخفاض معنوي بمستوى ($p < 0.05$) في قطر دائرة الهجرة مقارنة مع معاملة السيطرة، وسجلت المعاملة بمادة Phytohemagglutinn (PHA) اقل قيمة حيث بلغت (8.12) ملم .

وعند مقارنة قيم (MIF) التي تم الحصول عليها مع القيم القياسية المعتمدة والواردة في Bures *et al.*, (1986) والتي هي كالآتي :

قيم MIF من صفر – 0.8: تثبيط للهجرة .

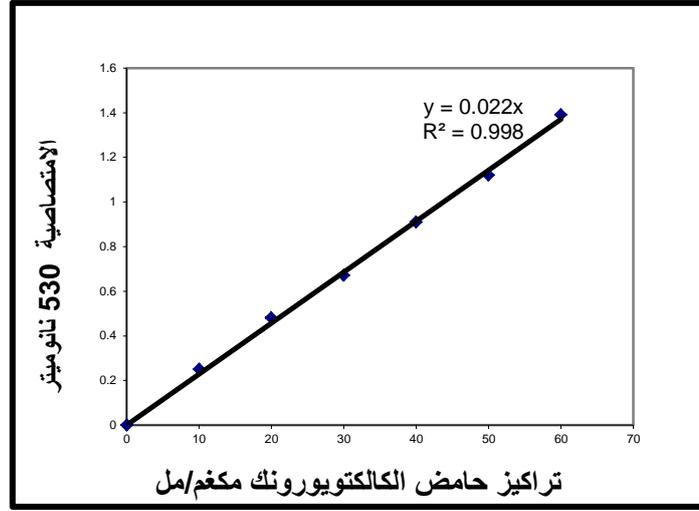
قيم MIF من 0.8–1.2: هجرة طبيعية .

قيم MIF من 1.2–2 : تحفيز الهجرة .

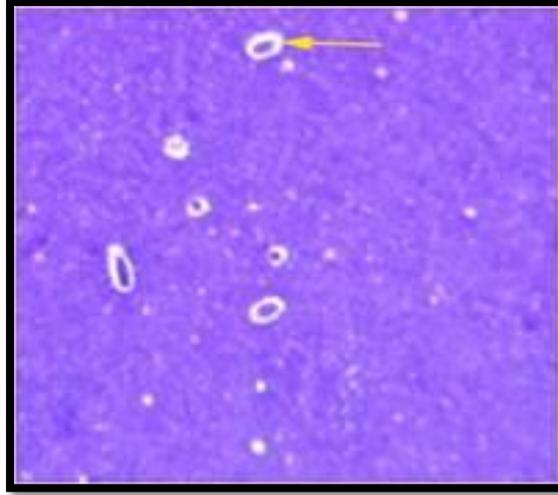
بينت النتائج ان جميع تراكيز متعدد السكريد المحفظي كانت ضمن الحدود الطبيعية للهجرة عدا التركيز (50) مكغم/مل ومعاملة السيطرة الموجبة (PHA) فأنها وقعا ضمن القيم المثبطة للهجرة. يتضح ان كل من التركيز (50) مكغم/مل من متعدد السكريد المحفظي المنقى أدى إلى هجرة الخلايا (PMNs) هجرة عشوائية مقارنة بمعاملة السيطرة الموجبة. أن عملية تثبيط هجرة الخلايا البلعمية (PMNs) داخل الجسم الحي تتم بمساعدة الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة (Th) لان إفراز عامل تثبيط الهجرة (MIF) من قبل الخلايا (T-cell) يؤدي إلى تثبيط هجرة الخلايا البلعمية عن موقع حدوث الالتهاب (22). ويعد عامل التنخر الورمي Tumor Necrosis Factor (TNF) هو المسؤول عن تثبيط هجرة خلايا الدم العذلة تحت الاكاروز بدليل ان الأضداد المحضرة ضد هذا العامل هي الوحيدة القادرة على معادلة إزالة فعالية تثبيط الهجرة (23) .

الاستنتاجات

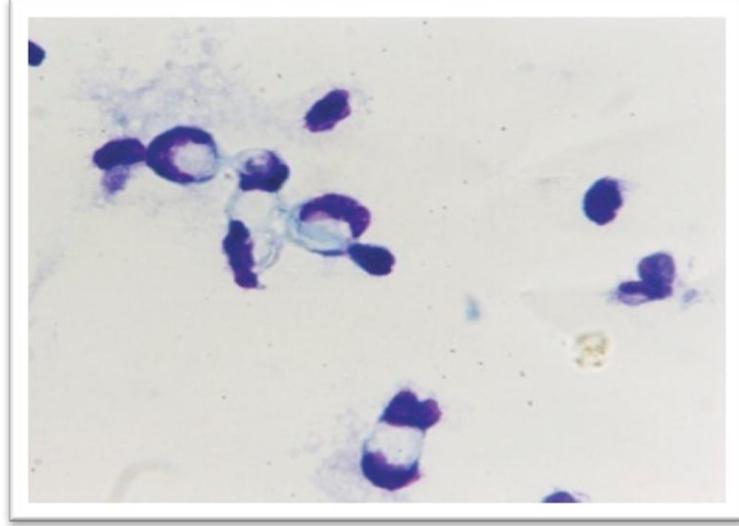
أظهرت عزلات بكتريا *Klebsiella Planticola* وامتلاكها جميع العزلات محفظه capsule. أدى استخدام التراكيز المختلفة من مستضدي CPS المنقى في هذه الدراسة الى تحفيز الاستجابة المناعية اللانوعية من خلال زيادة وظائف وفعاليات الخلايا المناعية المستخدمة واعتمد مدى التحفيز على تركيز هذه المستضدات لذا فمن الممكن الاستفادة من هذه المستضدات كمعدلات مناعية (Immunomodulators).



شكل (1) : المنحنى القياسي لتقدير تركيز حامض الكالتويورونك الموجود في متعدد السكريد المحفظي



شكل (2) مسحة لبكتريا *K. planticola* توضح المحفظة Capsule



شكل (3) : خلايا (PMNs) الملتهمة لخلايا خميرة *C. albicans* .

جدول (1) : الصفات المظهرية لبكتريا *K. planticola* المعزولة في الدراسة

Isolates	MacConky agar	Blood Agar	Morphology
<i>K. planticola</i>	Pink colony mucoid	White colony	Bacilli

جدول (2) : الصفات الكيميائية الحيوية لأنواع بكتريا *K. planticola* المعزولة في الدراسة .

K. planticola	الاختبار
-	Oxidase
+	Catalase
-	Indole
+	Methy Red
+	Vogas-Proskawer
+	Simmon Citrate
+	Urease
+	Malonate
A/A+ gas no H2S	TSI

جدول (3): تراكيز حامض الكالكتويورونك الموجود في متعدد السكريد المحفظي لعزلات بكتريا *K. planticola*

رقم العزلة	تركيز Galacturonic acid (مكغم /مل)
Kp1	25
Kp2	18
Kp3	27
Kp4	29

جدول (4): النسبة المئوية لقابلية النمو الخلايا البلعمية متعددة النوى (PMNs) باستخدام تراكيز مختلفة من متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى .

تركيز (CPS) (مكغم/مل)	النسبة المئوية لقابلية النمو الخلايا البلعمية متعددة النوى (المعدل \pm الانحراف المعياري)
صفر (سيطرة)	a 0.10 \pm 96.8
5	a 0.40 \pm 96.1
10	a 0.70 \pm 95.8
20	b 0.81 \pm 92.3
50	b 0.83 \pm 91.6
100	c 4.00 \pm 83.6

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) (مقارنة بين المعاملات المختلفة).

جدول (5) : تأثير مستضد CPS على بلعمة خميرة *C. albicans*

معامل البلعمة (PI) %				تركيز (CPS) (مكغم/مل)
وقت التعرض				
120	90	60	30	
1.24± 76.33 a	0.64± 77.96 A	2.35± 74.20 A	1.29 ± 63.68 A	صفر (سيطرة)
2.21± 83.45 b	2.66± 85.77 B	1.82± 73.44 A	1.46± 64.57 A	5
1.14±84.6 b	1.58± 86.22 B	1.99± 75.75 B	0.99± 60.30 A	10
1.36± 72.8 c	2.53± 73.71 C	1.43± 67.93 C	0.52± 54.45 B	20
1.5± 65.42 D	1.5± 66.68 D	2.41± 64.61 D	2.36± 53.25 B	50

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) / (مقارنة بين المعاملات المختلفة لكل عمود)، (المعدل \pm الانحراف المعياري)

جدول (6): تأثير متعدد السكريد المحفظي المنقى على هجرة الخلايا البلعمية (PMNs) تحت الاكاروز.

عامل تثبيط الهجرة (MIF)	قطر منطقة الهجرة (ملم)	تركيز (CPS) مكغم/مل
1	a 1.34 ± 17.68	صفر (سيطرة سالبة)
1.102	b 0.53 ± 20.50	5
1.053	ab 0.42 ± 18.17	10
1.019	a 0.62 ± 17.97	20
0.775	c 0.66 ± 11.56	50
0.464	d 0.42 ± 8.12	PHA (سيطرة موجبة)

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) / (المقارنة بين المعاملات المختلفة)، (المعدل \pm الانحراف المعياري)

Summary

Four isolates of *K. planticola* were obtained from research center; Al-Nahrin University and University of Baghdad, they were re-identification according to the cultural, biochemical properties. One isolate (Kp4) was selected to be used in the following experiments due to its efficient production of Galacturonic acid (29) $\mu\text{g/ml}$, typical biochemical characteristics and its consistent properties along the period of study. Extraction and purification of capsular polysaccharides (CPS), Brain Heart Infusion broth with was used to produce CPS. The CPS was extracted by Cetavlon and was purified by alcohols, the purified CPS concentration was estimated reached to (167) $\mu\text{g/ml}$. Effect of the purified CPS concentrations (5,10,20,50) $\mu\text{g/ml}$ which was isolated from *K. planticola* (Kp4) on the immune response (in vitro) were investigated. The following (in vitro) immunological tests were performed; viability of polymorphonuclear cells (PMNs), phagocytosis of *Candida albicans* , migration of (PMNs) under Agaros, the results showed that:

-The concentrations of CPS (20, 50) $\mu\text{g/ml}$ decreased the viability percentage of (PMNs), Phagocytic Index (PI) with significant differences ($p < 0.05$) in comparison to the control treatment. The concentration (50) $\mu\text{g/ml}$ inhibited the migration of (PMNs)

-The concentrations of CPS (5, 10) $\mu\text{g/ml}$ increased (Phagocytic index), with significant differences ($p < 0.05$) in comparison to the control treatment.

المصادر

1. Athamna,A.; Ofek,L.; Keisari,Y.; Markowitz,S. and Sharon,N. (1991). Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella planticola* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte derived macrophages , Infect . Immun . 59:1673-82.
2. Alvarez,D.; Merino,S.; Tomas,J.M.; Benedi,V.J. and Alberti,S.(2000) Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in Lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella* clinical isolates .

Infect. Immun. 68(2):953 – 955.
3. Bitter,T. and Muir,H.M. (1962).A modified uronic acid carbazole reaction . Anal. Biochem. 4:330 -334.
4. Bures, J.; Horak,V.; Buresova, E.; Fixa,B.; Komarkova,O. and Hartman,M .(1986).Colicinogeny in chronic inflammatory Bowel Disease .Scand.J.Gastroenterol. 21:819-823.
5. Cech,P. and Lahrer,R.I. (1984). Heterogenicity of Human Neutrophil phagolysosomes :Functional Consequences for Candidacidal Activity ,Blood ,64 :147 -151.
6. Collee, J.G. ; Fraser,A.G. ; Marmion,B.P. and Simmons, A.(1996).Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology, 14 th ed. Churchill Livingston. New York.
7. Cryz,S.J.; Fürer,E. and Germanier , R. (1985). Safety and immunogenicity of <i>Klebsiella planticola</i> capsular polysaccharide vaccine in human, J. Infect. Dis. 151 :665-671
8. Dubois,M. ; Giles, K.A.; Hamilton ,J.K.; Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances , Anal. Chem. 28:350-356.
9. Fang, F.C.; Sandler, N. and Libby , S. J. (2009). Liver Abscess caused by <i>mag</i> A ⁺ <i>Klebsiella planticola</i> . in North America , J. Clin. Microbiol. 43(2):991-992.
10.Federlin , K. ; Maini, R. N.; Russell, A.S. and Dumonda, D.C. (1971). Micro method for peripheral leucocytes migration in Tuberculin Sensitivity , J. Clin. Path. 24:533-536
11.Frirdich,E.; Bouwman, C.; Vinogradov, E. and Whitfield ,C.(2005). The role of Galacturonic acid in outer membrane stability in <i>Klebsiella planticola</i> . J. Biol. Chem.280(30):27604-12.

12. Hansen , D. S. ; Mestre, F. ; Alberti, S.; Hernandez- Alles, S. ; Alveraz, D. ; Sanchez, A. D. ; Gill, J.; Merino, S.; Tomas, J. M. and Benedi , V.J. (1999). *Klebsiella planticola* lipopolysaccharides O typing : Revision of prototype strain and O- group distribution among clinical isolates from different sources and countries , J. Clin. Microbiol. 37(1):56-62.

13. Ho, C.Y. ; Lo, T.W. C. ; Leung, K. N. ; Fung , K.P. and Choy, Y. M. (2006). The immunostimulating activities of ant- tumor polysaccharide from K1 capsular (polysaccharide) antigen isolated from *Klebsiella planticola* . Immunopharm. 46:1-13.

14. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinable bacteriology 9th ed . William and Wilkins, Baltimore.

15. Hudson , L. and Hay , F. C. (1980). Practical Immunology , 3rd ed Black well Scientific Publication , Oxford. London .

16. Levinson, W. (2004). *Klebsiella* in : Medical Microbiology & Immunology examination & Broad review 8th ed. The McGraw-Hill Companies Appleton & Lange Int. Ed. U.S. A.

17. Lock , R.; Dahlegren , C.; Linden , M. ; Stendahl, O. ; Svensbergr, A. and Ohman , L. (1990). Neutrophil killing of two type 1 fimbria-bearing *Escherichia coli* strains: Dependence on respiratory burst activation , Infect. Immun. 58:37-42.

18. MacFaddin, F. J. **2000**. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Printed in united state of America.

19. Nonoyama, S.; Kojo, H. ; Mine, Y. Nishida, M. ; Goto, S. and Kuwahara, S. (1979). Inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and killing of Rabbit Polymorphonuclear

leukocytes: Mechanism of action of a Polymorphonuclear leukocytes inhibitor , Infect. Immun. 24:399-403.

20.Podschun , R. and Ullmann ,U.(1998). *Klebsiella* spp. As Nosocomial pathogens : Epidemiology, Taxonomy , Typing methods and pathogenicity factors , Clin. Microbiol. Rev. 11(4):589-603.

21.Robynt,J.F. and White,B.J. (1987). Biochemical techniques 1st ed . Brook/ Cole publishing company , Wadsworth,Inc. Belmont, California , USA. p:213-214.

22.Roitt, I. ; Brostoff, J. and Male , D. (1998). Immunology , 5th ed. Mosby International . London

23.Shalaby , M. R. ; Palladine , M. A. ; Itirabayshi , S. E. ; Eessalu, T. E. ; Lewis. G. D. ; Shepared, H. M. and Aggarwal ,B. B.(1987). Receptor binding and activation of Polymorphonuclear neutrophil by tumor necrosis factor - alfa. , J. Leukocyte . Biol. 14:169.

24.Straus, D. C. (1987). Production of an extracellular toxic complex by various strains of *Klebsiella planticola* .Infect. Immun. 55(1) :44-48

25.Williams , P. and Tomas, J. M. (1990). The pathogenicity of *Klebsiella Spp* , Rev. Med. Microbiol. 1:196-204.