تأثير عديد السكريات polysaccharides المستخلص من بكتريا
Pseudomonas aureginosa على نمو امامية السوط لطفيليات
Leishmania major خارج الجسم الحي

م.م. حسناء حامد جمعة
كلية العلوم – جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : 2010/9/22 ؛ تاريخ قبول النشر : 2010/12/9

ملخص البحث :

تضمن البحث دراسة تأثير مادة عديد السكريات polysaccharides المفرز خارج خلايا البكتريا *Pseudomonas aureginosa* على تثبيط نمو امامية السوط لطفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania major* خارج جسم الكائن الحي *in vitro*.
اظهرت النتائج ان لمستخلص عديد السكريات وبمختلف تراكيزه تأثير مثبط على نمو امامية السوط , اذ اظهر التركيز 50 ميكرو غرام/سم³ نسبة تثبيط 36.3 بينما كانت في تراكيز 250 ميكرو غرام/سم³ نسبة التثبيط 81 عند الساعة 96 بعد التعريض.
كما بينت الدراسة ان لمستخلص عديد السكريات تأثير على عدد وزمن الجيل فقد ادت كافة التراكيز الى خفض عدد الجيل وزيادة في زمن الجيل مع فترات التعريض .

**The effect of polysaccharides extracted from
Pseudomonas aureginosa on the growth of *Leishmania
major promastigote in vitro***

Assistance lecturer Hassana .H .Hiti
College of Sciences /University of Mosul

Abstract:

This study include the effect of polysaccharides extracted from *Pseudomonas aureginosa* on the growth of *leishmania major* Promastigote in vitro .

The results showed that the various concentration of polysaccharides has an inhibition effect on the growth of promastigote , the concentration of 50 mg/cm³ showed a 36.3 inhibition ratio while it is 81 at concentration of 250 mg/cm³ after 96 hour of exposing .

Moreover the study showed that the extraction of polysaccharide effects on the number of generation and generation time , so that high concentration decreases the generation number and increase the generation time with the exposure time.

المقدمة:

يصنف داء اللشمانيا من قبل منظمة الصحة العالمية WHO كواحد من الامراض الطفيلية الخمسة التي تبدي المنظمة اهتمامها لمعالجتها والقضاء عليها (Al- Jebouri,2002). يعد داء اللشمانيا الجلدية cutaneous leishmaniasis مرضا جلديا شائعا في العديد من اقطار العالم ويعد العراق من البلدان التي يتوطن فيها هذا المرض ,حيث يعرف محليا بحبة بغداد (Junaid ,1980) Baghdad boil.

تعتبر اللشمانيا من الابدائيات المتطفلة اجباريا داخل الخلايا البلعمية الكبيرة في سلسلة المضائف الفقرية وينتقل الطفيلي من مضيف فقري الى اخر عن طريق عضات لذباب الرمل او الحرمس *Phlebotomus spp* (Zukerman and Lainson, 1977) .

ولسعة انتشار هذا المرض فقد انصب جهد الباحثين لايجاد علاج لهذا المرض منها استخدام المواد الكيميائية لكن هذه الطرق العلاجية اثبتت اثرها الجانبي على المرضى المصابين, لهذا لجأ الباحثون الى استخدام بعض المستخلصات النباتية والبكتيرية والفطرية التي تمتاز بسهولة استخلاصها وخلوها من الاثر السمي لعلاج الاصابة باللشمانيا (Heeres et al ,1979).

ومن هذه المستخلصات التي اعتمدت في البحوث هو عديد السكريد ,فقد اثبتت البحوث ان لعديد السكريد المستخلص من المزرعة الخلوية لنبات *Echinacea purpurea* له القدرة على تفعيل البلاعم بصورة اختيارية وبقوة خارج الجسم الحي وكما انه استعمل كمقويات علاجية ضد الامراض وبالاخص مرض اللشمانيا (Wagner et al.,1985) ,كذلك بالنسبة لعديد السكريد المستخلص من الفطر *Aspergillus pullulaus* الذي اظهر نتائج ايجابية في تراجع الاصابة عند معاملة الفئران المخمجة بداء الاكياس العذرية به مقارنة مع فئران السيطرة الموجبة (Ali,1999).

كما وجد Ibrahem (2000) التأثير المثبط لعديد السكريد المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* ضد حيوية الرؤيسيات الاولية لطفيلي المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosis* ولخلوه من التأثير السمي ولسهولة استخلاصه جاء هدف الدراسة الحالية وهو بيان تاثير عديد السكريد polysaccharides المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* على امامية السوط لطفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania major* خارج الجسم الحي *in vitro* .

طرائق العمل

تم الحصول على العزلة المعتمدة في البحث (MHOM (IQ/93/MRCI3) من مركز البحوث الطبية في كلية الطب /جامعة النهريين والمشخصة انزيميا بطريقة المتناظرات الانزيمية .isoenzymes

استخدم الوسط الزراعي الثنائي الطور Tobies medium لتنمية طفيليات اللشمانيا الاستوائية . (Tobies et al.,1950).

زرعت طفيليات اللشمانيا باضافة 0.1سم³ من محلول اللوك الحاوي على امامية السوط الحية وبعمر 4 ايام الى قناني زجاجية سعة 25سم³ وبمقدار 2.5*10⁵ خلية /سم² وحضنت القناني بدرجة 26 م لمدة 4 ايام و ثم حدد عدد امامية السوط في كل مزرعة باستخدام شريحة عد كريات الدم Haemocytometer, وفي حالة النمو الكثيف تخفف بالمحلول الفسلجي .

تم استخلاص عديد السكريات من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* المجهزة من قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة الموصل .واتبعت الطريقة التي استعملت من قبل Taei (1992) في استخلاصه وحضرت التراكيز 250,200,150,100,50 ميكرو غرام/سم³ من المستخلص .

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) تأثير تراكيز مختلفة لمستخلص عديد السكريات على عدد امامية السوط خارج الجسم الحي مقارنة باللشمانيا غير المعاملة .

حيث يشير الى اختزال في اعداد امامية السوط بعلاقة عكسية مع زيادة التراكيز خلال فترات النمو المختلفة ,فقد اظهرت نتائج الدراسة ان نسبة التثبيط كانت بين 36.3% الى 81% عند التراكيز 250, 50 ميكرو غرام/سم³ على التوالي بعد 96 ساعة من التعريض .

ويبين الجدول (2) تأثير مستخلص عديد السكريات على عدد الاجيال لامامية السوط , فقد ادى الى اختزال عدد الاجيال الى 7.219 عند التركيز 250ميكرو غرام/سم³ بعد 96ساعة من المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة التي كانت 6.86.

وبالنسبة الى زمن الجيل فيلاحظ من الجدول (3) بان زيادة تراكيز عديد السكريات في الاوساط الزراعية لامامية السوط أدى الى زيادة في زمن الجيل بعلاقة طردية .

هذه تتفق مع نتائج Wagner (1985) عند استعماله لعديد السكريات المستخلص من المزرعة الخلوية لنبات *Echinacea purpurea* حيث كانت له القدرة على تفعيل البلاعم بصورة اختيارية وبقوة خارج الجسم الحي .

كما وجد Dudman (1985) بان عديد السكريد المستخلص من بكتريا الرايزوبيوم له مدى واسع للتفعيل البيولوجي بواسطة ارتباطه مع عدد كبير من الجزيئات وعمل معقد منها .
 واتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه Al-Grawy (1999) عند استخدامه السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *E.coli* لمعالجة اخماج الجهاز البولي في الجرذان.
 واتفقت النتائج ايضا مع Nuaman (2002) عند استخدامه السكر المتعدد المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* حيث كان له الاثر في انخفاض اقطار واوزان الاكياس العذرية لطفيلي الاكياس المائية .

كما سجل استخدام السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Escherichia coli* انخفاضاً في اعداد واوزان واقطار الاكياس العذرية لطفيلي الاكياس المائية في الفئران المعاملة مقارنة مع فئران السيطرة الموجبة (Al-Mutaywiti , 2005)

كما وجد Chia (2007) ان استخدام عديد السكريد المستخلص من *Chlorella pyrenoid* تائيرا تثبيطيا لنمو عدد كبير من انواع البكتريا والفطريات وهذا يتفق مع ما وجده Barrosa (2007) وآخرون عند استخدامهم عديد السكريد المسمى ب Z-100 المستخلص من *Myobacterium tuberculosis* في معالجة فئران من نوع Balb/c المصابة بطفيلي اللشمانيا وشغائها من الاصابة وكذلك أظهرت النتائج المختبرية لنفس المستخلص اختزالاً كبيراً في اعداد طفيليات اللشمانيا مقارنة مع السيطرة . واتفقت نتائج ارتفاع نسبة اختزال اعداد الطفيلي مع زيادة تركيز البولي سكريد مع (Shanmugan et al., 2007) عند استعمالهم البولي سكريد المستخلص من *Sepa aculeate* و *Sepa brevimana* والذي اثبتت فعاليته ومقاومته العالية لكثير من انواع البكتريا والفطريات وزيادة قوة هذا التأثير مع زيادة تركيز عديد السكريد . ان هذا التأثير التثبيطي لعديد السكريد من بداية النو الى الطور اللوغارتمي ربما يعود الى تداخل مع او ازاحة الاحماض الدهنية داخل الطفيلي وتأثيره بالتالي على المركبات الاخرى مثل البروتينات والاحماض النووية ومن ناحية اخرى قد يكون سبب تأثير عديد السكريد في تثبيط نمو امامية السوط قد يعود الى ان هذه المادة تلتصق على سطح اللشمانيا من خلال وجود مستقبلات الالتصاق في جزيئية السكر المتعدد مما ادى الى منع اتصالها بالمحيط الخارجي واثر على حيويتها ومن ثم الى موت الطفيلي (Ibrahim,2000).

كما ان سبب اعطاء التراكيز العالية نتائج افضل من المعاملة بالتراكيز الاقل مع العلم انها ايضا اعطت نتائج جيدة الى ان مادة عديد السكريد تعتمد في تأثيرها على الوقت والتركيز . (Fattah,1990)

يتبين من نتائج الدراسة الحالية ان لعديد السكريد المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* تأثير تثبيطي في نمو اللشمانيا الجلدية .

الجدول (١) : تأثير تراكيز مختلفة من السكر المتعدد على عدد أمامية السوط للشمانيا الجديية *Leishmania major* ($10^6 \times$) لفترات نمو مختلفة

تثبيت	نمو	96 ساعة	تثبيت	نمو	72 ساعة	تثبيت	نمو	48 ساعة	تثبيت	نمو	24 ساعة	فترة التعرض (ساعة) المعاملة على غرام / سم ²
		0.05±72.5			0.067±29.25			0.077±6.25		100	0.07± 1.475	الصباغ
36.3	63.7	0.09±57.5	36.3	63.7	0.08±20.75	23.82	75.18	0.08±5	13.4	86.6	0.08±1.075	50
54	46	0.08±50	35.94	64.06	0.09±16.25	38.2	61.8	0.05±4.5	33.33	66.6	0.09±0.825	100
55.3	44.7	0.07±45	55.2	44.8	0.1±13.25	44.5	55.5	0.1±3.75	45	55	0.1±0.725	150
71.8	28.2	0.09±41.25	71.7	28.3	0.09±10.75	66.7	33.3	0.08±3	50	50	0.07±0.625	200
81	19	0.07±38	80.5	19.5	0.08±10	78	22	0.08±2	58.4	41.6	0.08±0.575	250

* الرقم يمثل المعدل لخمس مكررات.

الجدول 2 : تأثير تراكيز مختلفة لعديد السكر ابي على عدد الأجيال الأمامية السوط للشمفيا الجذبية *Leishmania major* لفترات نمو مختلفة.

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة مايكرو غرام/سم ³ الضابط
0.02 $\pm$ 6.86	0.4 $\pm$ 6.873	0.25 $\pm$ 4.644	0.034 $\pm$ 2.561	الضابط
0.48 $\pm$ 7.84	0.07 $\pm$ 0.6738	0.18 $\pm$ 4.322	0.17 $\pm$ 2.102	50
0.29 $\pm$ 7.64	0.15 $\pm$ 6.023	0.48 $\pm$ 4.17	0.002 $\pm$ 1.724	100
0.29 $\pm$ 7.49	0.001 $\pm$ 5.75	0.25 $\pm$ 3.8	0.15 $\pm$ 1.538	150
0.34 $\pm$ 7.368	0.09 $\pm$ 5.428	0.18 $\pm$ 3.353	0.12 $\pm$ 1.322	200
0.03 $\pm$ 7.219	0.89 $\pm$ 5.325	0.7 $\pm$ 3	0.13 $\pm$ 1.202	250

* الرقم يمثل المعدل لخمس مكررات.

الجدول 3 : تأثير تراكيز مختلفة لعديد السكر ابي على زمن الجيل الأمامية السوط للشمفيا الجذبية *Leishmania major* لفترات نمو مختلفة.

96	72	48	24	فترة التعريض (ساعة) المعاملة مايكرو غرام/سم ³ الضابط
0.23 $\pm$ 13.99	0.01 $\pm$ 10.47	0.15 $\pm$ 10.33	0.032 $\pm$ 9.37	الضابط
0.04 $\pm$ 12.24	0.27 $\pm$ 11.288	0.19 $\pm$ 11.1	0.057 $\pm$ 11.4	50
0.059 $\pm$ 12.565	0.03 $\pm$ 11.954	0.5 $\pm$ 11.51	0.025 $\pm$ 13.9	100
0.14 $\pm$ 12.817	0.12 $\pm$ 12.52	0.1 $\pm$ 12.6	0.17 $\pm$ 15.6	150
0.4 $\pm$ 13.02	0.017 $\pm$ 16.26	0.12 $\pm$ 13.59	0.02 $\pm$ 18.15	200
0.08 $\pm$ 13.4	0.11 $\pm$ 13.52	0.23 $\pm$ 16	0.02 $\pm$ 19.96	250

* الرقم يمثل المعدل لخمس مكررات.

References

1. Al-Jebouri, N.N.A. (2002). Study of the effect of some purine analogs on growth and metabolism of *Leishmania major* promastigotes M.Sc. thesis Collage of Education, Tikrit University, Iraq.
- 2- Junaid, N. D. (1986). Treatment of cutaneous leishmaniasis with infra red. *Int. J. Dermat.*, 25(7): 470-472.
- 3- Zukerman, A. and Lainson, R. (1977). *Leishmania in parasitic protozoa* vol 1 Academic press. New York. P. 57-133.
- 4- Heeres J.; Backy J.; Nostmarrs J. H. ; Vancutsem J.M. (1979). The synthesis and antifungal activity of Ketocarnozol, a new potentially spectrum antifungal agent, *J. Med. Chem.*, 22: 1993-2005.
- 5- Wagner, H.; Stuppner, H.; Schafer, W. and Zenk, M. (1988). Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cultures. *Phytochemistry*, 27: 119-126.
- 6- Ali, A. A. (1999). Immunodulation in mice against infection with hydatid cysts by polysaccharides pullan. Ph.D. thesis, Coll. Edu. University of Mosul.
- 7- Ibrahim L.A. A. (2000). Biological and Immunological study for hydatid cyst Ph.D. thesis, Coll. Sci, Al- Mustansiria University, Iraq.
- 8- Tobie, E. J.; Brand, T.V.; Mehlman, B. (1950). Cultural and physiological observation on *Trypanosoma rhoderseense* and *T. gambiense*, *J. Parasitol.*, 30: 48-54.
- 9- Taei, A. A. K. (1992). The role of types of strain of *Pseudomonas aeruginosa* to induce sugar syndrome. MSc. Thesis, University of Al-Mustansyria.
- 10- Dudman, W.F. (1985). The polysaccharides and oligosaccharides of *Rizobium* and their role in infection process. *Carbohydrates Res.* 188: 128-137.

- 11- Al-Grawy ,J .G. A. (1999). A study on the use of bacterial lipopolysaccharide as an immunomodulator and immunoprophylactic agent in urinary tract infection in rats . Ph.D thesis , Coll. Sci. Univ . Baghdad.
- 12-Nuaman , I. T. (2002). Modulation of immune response in BALB/c mice against infection with hydatid disease by polysaccharide extracted from *Pseudomonas aeruginosa* .M. Sc. Thesis , Coll. Edu. Univ. Mosul .
- 13-Al-Mutaywiti,S.S.y.(2005). Effect of lipopolysaccharide extracted from *Escherichia coli* in immune response of BALB/c mice against infection with secondary hydatid disease M.Sc . thesis , Coll. Edu. Univ. Baghdad .
- 14- Chia, E.L. (2007). Extraction and functional analysis of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. MSc. Thesis, Department graduate of Cosmotic Science, China.
- 15- Shanmuqan, A. ; Mahalakshmi, T.S. and Vino, A.B. (2007). Antimicrobial Activity of polysocchrides isolated from the cattle bone of *Sepia oculeata* (orbigny, 1848) and *Sepia brevimana* (steenstrup, 1875) : An Approach to selected antimicrobial activity for human pathogenic microorganisms. J. Fish. Aquatic Sci. , 3:268-274.
- 16- Barrosa, P.A. ; Marco, J.D. ; Colvpina , M.; Kato, H. ; Korengu, M. and Hashiguchi, Y. (2007). Atrial of immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection *in vitro* and *in vivo* with z-100, apolysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis* alone or combined with meglumine antimoniate. J. of Antimicrobial Chemotherapy, 59(6) : 1123-1129.
- 17- Fattah, M. I. (1990). Non-specific activation of mice peritoneal macrophage with Rhizobium polysaccharide .M. Sc. Thesis. University of Al-Mustansyria.