تاثيرالسكر المتعدد الدهني Lipopolysaccharide المستخلص من بكتيريا *Escherichia coli* على نمو أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا الجـــلدية *Leishmania tropica* promastigote خارج الجسم الحي *In vitro*

م.أحمد خضير الحميري
كلية طب الاسنان-جامعة بابل

أ.م.د.ماهر علي القريشي
كلية العلوم-جامعة بابل

م.أحمد محمد الموسوي
كلية طب الاسنان-جامعة بابل

الخلاصة :

تم في هذة الدراسة اختبار قدرة السكر المتعدد الدهني Lipopolysaccharide لبكتيريا *E.coli* على تثبيط نمو أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا الجلدية *L. tropica* خارج الجسم الحي . بينت النتائج ان السكر المتعدد الدهني المستخلص يمتلك قدرة فائقة وبمختلف التراكيز على نمو اماميات السوط . اذ اظهر التركيز 100 مايكروغرام / مل نسبة تثبيط 41 % بينما كان في التركيزيين 25 ، 250 مايكروغرام /مل 50 % تقريبا (مثلت L.D.50) .اما في التراكيز 50 مايكروغرام / مل فكانت 67 % ، فضلا عن التركيزيين 75 ،500 مايكروغرام/ مل إذ اظهرا أعلى نسبة تثبيط وهي 78 % ،85 % على التوالي . وكان لمستخلص السكر المتعدد الدهني نفس التاثير المثبط على عدد الخلايا وعدد الاجيال .

المقدمة :

تعود الانواع التابعة لجنس اللشمانيا *Leishmania spp.* الى مجموعة من الطفيليات المسوطة Flagellate والمتنوعة بايولوجياً التي تقع ضمن عائلة Trypanosomatidae حيث تعد معظم انواع اللشمانيا كائنات ممرضة للانسان وبعض الحيوانات المنزلية. يصاب الانسان بانواع اللشمانيا المختلفة المسببة لحدوث داء اللشمانيا والذي يختلف سريرياً حسب قدرة الكائن الممرض على الانتشار في انسجة الجسم العميقة او السطحية (الجلد) فقد قامت منظمة WHO (1999) بتصنيف داء اللشمانيا سريرياً الى (4) اشكال هي : الشكل الاحشائي Visceral form والشكل المخاطي الجلدي Muscocutaneous والشكل الجلدي Cutaneous والشكل الجلدي المنتشر Cutaneous diffuse وهو احد أنواع الشكل الجلدي للمرض. وبما ان المعالجة الكيمياوية Chemotherapy لداء اللشمانيا تتضمن استخدام مركبات ذات سمية عالية كالمركبات الانتيمونيالية Antimonials وغيرها والتي تعطى للمريض عن طريق الحقن الوريدي او العضلي حيث تؤدي الى حدوث تاثيرات جانبية يضطر معها المريض للمعالجة في المستشفى والبقاء تحت الاشراف الطبي، فمثلاً عند استخدام عقار البنتامدين entamidine للمعالجة يتسبب في حدوث آثار جانبية تتمثل بانخفاض ضغط الدم والقصور الكلوي والاضطرابات المعدية فضلاً عن الآم الرأس الحادة (AL-Khawajah, 1998).تعد اللشمانيا من الطفيليات المحمولة بواسطة النواقل Vector-born parasites التي تؤدي الى حدوث امراض معدية حيث تعد احد الاسباب المهمة للفناء في العالم لاسيّما في البلدان النامية، كما تعد لابتدائيان الطفيلية التابعة لجنس اللشمانيا من الطفيليات الداخل خلوية اجبارياً Obligate interacellular parasite وتسبب حدوث الامراض اللشمانية Leishmanial disease (Hazra *et al.*, 2002).

شكل الطفيلي:

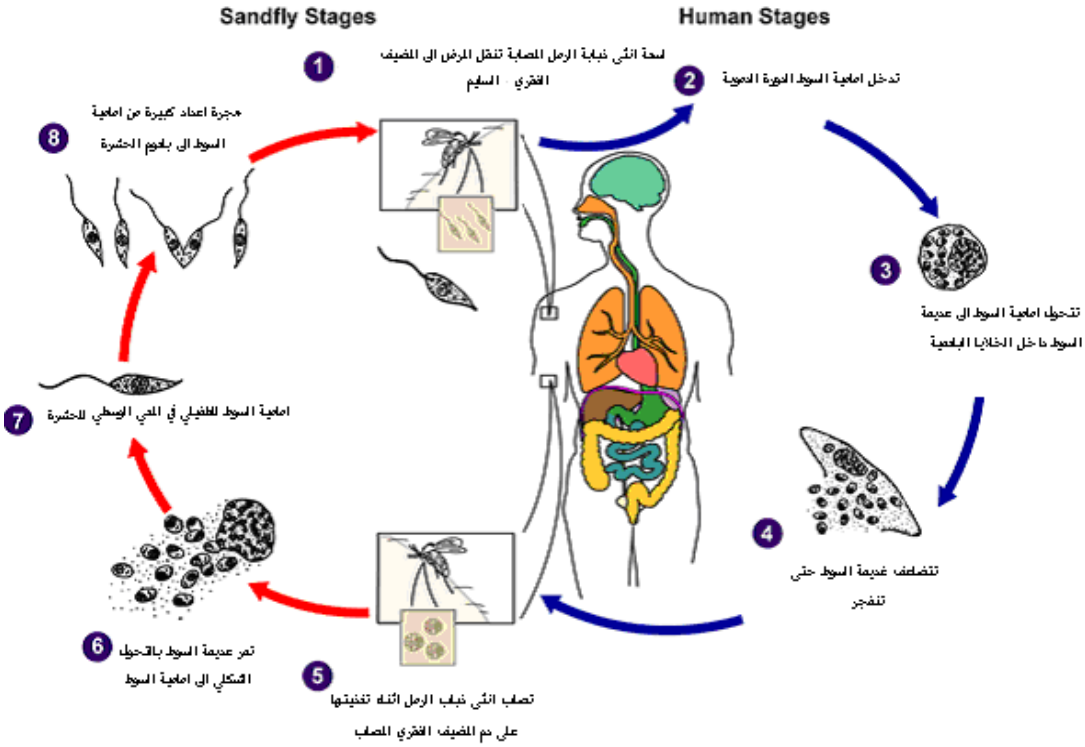
يوجد طفيلي اللشمانيا *Leishmania* بصورة عامة بشكلين :-

1- شكل عديم السوط Amastigote form ويوجد في المضيف الفقري.
2- شكل امامي السوط Promastigote form ويوجد في الناقل الحشري وفي الاوساط الزرعية المصنعة.

يتميز الطور عديم السوط بكونه بيضوي الشكل، صغير، غير متحرك، يحتوي على نواة واضحة تقع في الجهة الخلفية وعلى جسم نووي مركزي وجسيم حركي Kinetoplast بشكل قضيب يقع امام النواة ويتكون من الجسم جنب القاعدي وحبة قاعدية، ويبلغ طوله حوالي (3-5) مايكرومتر، اما عرضه فيتراوح ما بين (1-3) مايكرومتر. اما الطور المسوط فيتميز بكونه مغزلي الشكل، متحركاً، يبلغ طوله حوالي (15-20) مايكرومتراً وعرضه (1.5-3.5) مايكرومتر، وله سوط يزيد طوله عن طول الجسم حيث يبلغ (15-28) مايكروناً (Herwaldt, 1999) وله العضيات السايتوبلازمية نفسها التي توجد في الطور عديم السوط، وفي كلا الشكلين يتم التكاثر بوساطة الانشطار الطولي Longitudinal fission ويتميز السايتوبلازم بشكل واضح عن النواة ويحتوي على المايتوكوندريا وفجوات وحبيبات قاعدية (مولان وميرو، 1990).

دورة الحياة:

تعد انثى ذبابة الرمل Sand fly الناقل الرئيس للمرض الى الانسان، وهذة تصاب اثناء تغذيتها على الدم الحاوي على الطفيلي من المضيف الفقري المصاب وبحسب Vidyashankar عام (2002) فان الطفيلي يكمل تطوره داخل الحشرة خلال (4-25) يوماً حيث يمر بالتحول الشكلي الرئيسي من الشكل عديم السوط Amastigote الى الشكل امامي السوط romastigote الذي ينتج باعداد كبيرة في المعي الوسطي للحشرة، ثم تهاجر الى البلعوم او المعي الامامي للحشرة حيث تكون جاهزة للحقن داخل المضيف الفقري (Gracia and Bruckner, 1993). ويلاحظ في الفترة (6-9) ايام من تناول الحشرة لوجبة الدم المصابة حدوث إصابة بلعومية حادة للحشرة وان لسعة الحشرة للمضيف الفقري في هذه الفترة تؤدي الى انتشار المرض حيث تدخل امامية السوط تحت الجلد وبعضها يتم تدميره من قبل الخلايا البلعمية في حين يدخل البعض الاخر الى خلايا الجهاز الشبكي البطاني او الخلايا البلعمية لاجزاء اخرى من الجسم كالكبد والجلد والطحال ونقي العظم او قد تمتص بعض خلايا عديمة السوط من قبل ذباب الرمل في اثناء تغذيتها على دم المضيف الفقري المصاب حيث تكتمل الدورة (الكواز، 1991 ;Vidyashankar, 2002).



الشكل (1) : شكل ودورة حياة اللشمانيا الاستوائية *L. tropica* (WHO, 2002)

طرق انتقال الطفيلي الى الانسان

Mode of transmission to the human

ان الطريقة السائدة والمتعارف عليها لانتقال الطفيلي الى الإنسان هي لسعة انثى ذبابة الرمل ذلك الناقل الحشري الصغير والذي يبلغ طوله (2-3) ملم يعمل بوصفه ناقلاً حيوياً لمرض داء اللشمانيا في مختلف انحاء العالم باجناسه المعروفة حيث ينقل جنس الفليبوتوماس *Phlebotomus* المرض في بلدان العالم القديم (اسيا واوربا وافريقيا) في حين ينقل جنس اللوتزميا *Lutzomyia* المرض في بلدان العالم الجديد (البلدان الواقعة في النصف الغربي من الكرة الارضية) (Abraham *et al.*, 1997; Hazra *et al.*, 2002) كما ذكرت Herwaldt (1999) ان ذباب الرمل من الحشرات الضعيفة نسبياً وتكون عديمة الصوت اثناء طيرانها وتوجد في الاماكن الرطبة والمظلمة حيث يزداد نشاطها في المساء وخلال ساعات الليل، وتقدر الانواع التابعة لجنس الفليبوتوماس بما يقارب الـ (500) نوع في العالم ولكن (30) نوعاً منها فقط عدّت نواقل للمرض (Desjeux, 1996; Vidyashankar, 2002) وقد وجد ان هناك طرقاً اخرى غير شائعة لانتقال الطفيلي مثل طريقة الانتقال الخلقي Congenital transmission حيث ينتقل الطفيلي خلال عمليات نقل الدم وقد ينتقل الطفيلي في الحالات العرضية أو عن طريق الاستخدام المشترك للحقن بين الاشخاص ونادراً ما يكون الانتقال عن طريق التلقيح في المزارع (Herwaldt, 1999; Vidyashankar, 2002).

وعلى الرغم من وجود عدد من المركبات الكيميائية التي تستخدم لمعالجة داء اللشمانيا إلا إنها لا تخلو من التأثيرات السمية الناتجة عن طول فترة المعالجة فضلاً عن ارتفاع كلفة العلاج في عدد من هذه المركبات، لذا فقد ظهرت الحاجة الى البحث عن مركبات جديدة فعالة كالمواد الكيمياوية والمستخلصات النباتية والبكتيرية ومنها ماهي مركبات سبق استخدامها لعلاج البكتريا والفطريات والابتدائيات الاخرى كمادة الكيتوكونازول Ketoconazole المضادة للفطريات (Heeres *et al.*,1979) ومستخلصي نبات الشفلح *Caparis spinasa* والحنظل *Citrallus colocynthis* ضد اللشمانيا (الخان ،2001) .والمستخلصات المائية لثمار السبحبح *Melia tropica* واوراق وثمار الدفلة *Nerium oleander* على طفيليات اللشمانيا الاحشائية *L.tropica* (الجبوري ،2005). يعد السكر المتعدد الدهني للبكتريا السالبة لصبغة كرام من المعدلات المناعية التي لاتزال البحوث المكثفة تسلط الضوء عليه نظراً لما يتمتع به من خواص كيمياوية تنعكس على تأثيراته الحيوية اذ أشارت البحوث إلى ان السكر المتعدد من المواد الطبيعية التي لها قدرات فائقة في التاثير على الكائنات المجهرية ومن الجدير بالذكر ان لبعض المستخلصات البكتيرية تاثيرات سمية تختلف في تاثيراتها على الكائنات المختلفة وبضمنها الاوالي (Al-Musawi , 1998 & Ibrahim , 2000). لذلك جاء هدف الدراسة الحالية وهو بيان تاثير السكر المتعدد الدهني LPS المستخلص من بكتيريا *E.coli* على امامي السوط promastigote لطفيلي اللشمانيا *L. tropica* خارج الجسم الحي In vitro .

المواد وطرائق العمل : Materials and methods

الاوساط المستخدمة في الدراسة

وسط الاكار المغذي: Nutrient agar

حضر الوسط باذابة (23) غم من الوسط في لتر من الماء المقطر، وضبط الاس الهيدروجيني pH عند (7.2)، ثم عقم بجهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة (121)^{o}م وضغط (1.5) جو لمدة (15) دقيقة، وصب في الاطباق.

وسط تنشيط البكتريا: Initial medium

حضر الوسط باذابة (20) غم من الكلوكوز Glucose، (1) غم من NH_4Cl و (5.44) غم من KH_2PO_4 في لتر من الماء المقطر المعقم، اضيف اليه (6) مل من محلول الاملاح المعدنية (Marques *et al.*, 1986).

وسط انتاج السكر المتعدد الدهني: Production medium

حضر الوسط باذابة (20) غم من الكلوكوز، (0.5) غم من NH_4Cl، (2.72) غم من KH_2PO_4 و (6) مل من محلول الاملاح المعدنية (Marques *et al.*, 1986).

عينة البكتريا : Bacterial sample

تم الحصول على عزلة نقية من بكتريا *Escherichia coli* من مختبر البكتريولوجي /قسم علوم الحياة/كلية العلوم /جامعة الكوفة.

تنمية البكتريا Bacterial growth

نميت العزلة المأخوذة على وسط الاكار المغذي في حاضنة بدرجة حرارة (28)^{o}م ولمدة (24) ساعة، بعدها حفظت بدرجة حرارة (4)^{o} م لحين الاستعمال.

- نشطت البكتريا على الوسط الاولي Initial medium اذ زرعت البكتريا في (3) مل من وسط التنشيط وحضنت بدرجة حرارة (28 – 32)^{o} م ولمدة (18) ساعة.
- نقل (2%) من وسط التنشيط الى وسط الانتاج Production medium وهو افضل وسط لانتاج السكر المتعدد الدهني (Nuaman, 2002) وحضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة (150) دورة/دقيقة بدرجة حرارة (28)^{o} م ولمدة (72) ساعة.

استخلاص السكر المتعدد الدهني

Extraction of lipopolysaccharide (LPS)

اتبعت طريقة Learen *et al.* (1987) المحورة من قبل Nuaman (2002) وكما يلي :-

- اضيفت مادة $EDTA\text{-}Na_2$ الى وسط الانتاج بتركيز (2) ملي مول، وضعت الدوارق في حاضنة هزازة بدرجة حرارة (37)^{o} م ولمدة (30) دقيقة.

- عوملت الخلايا بجهاز الذبذبات فوق الصوتية Ultra sonicator لمدة (30) ثانية بتردد قدره (20) ذبذبة في الثانية لتكسير الخلايا مع مراعاة استخدام الثلج المجروش.
- رسبت الخلايا بجهاز المنبذة المبردة بقوة (27420 g) لمدة نصف ساعة عند درجة حرارة (4)^{o}م.
- جمع الراشح ونبذ بالقوة نفسها ولمدة ساعة للتخلص من جميع بقايا الخلايا البكترية.
- اضيف الاسيتون الى الراشح بنسبة 5 : 1 (حجم/حجم) وترك بدرجة حرارة (4)^{o} م لمدة (24) ساعة للحصول على السكر المتعدد الدهني بشكل دقائق عالقة بيضاء.
- استخدم جهاز Rottary evaporator بدرجة حرارة (40 – 50)^{o} م لغرض الحصول على راسب السكر المتعدد الدهني بشكل سائل كثيف لزج.
- صبت المادة في طبق بتري ونقلت الى الحاضنة بدرجة (32)^{o} م ولمدة (48) ساعة لغرض تجفيفها، وحفظت لحين الاستعمال.

أختبار الفعالية التثبيطية للسكر المتعدد الدهني

- لغرض اختبار حساسية أمامي السوط لراسب السكر المتعدد الدهني LPS تم تحضير محاليل مركزة من هذا المستخلص في الماء المقطر ثم عقمت بالترشيح باستخدام المرشحات الغشائية Membrane filter (0.22) وحفظت بالثلاجة كخزين لحين استعمالها في تحضير التراكيز المختلفة من المستخلص ، ثم اضيف مالايقل عن ثلاث مكررات من كل تركيز في اليوم التالي من اضافة لقاح أمامي السوط الثنائي الطور. بعدها تم حساب عدد الخلايا خلال مراحل زمنية مختلفة 24 ،72 ،96 ،120 . وتم مقارنة تراكيز المستخلص المختلفة مع عينة السيطرة.
- استخدمت التراكيز العالية من السكر المتعـــدد الدهني 100 ،250 ،500 مايكروغرام /مل. باحجام 0.1 ،0.3 ،0.5 مل على التوالي كجرعات عالية.
- استخدمت التراكيز الواطئة من السكر المتعدد الدهني 25 ،50 ،75 مايكروغرام /مل . باحجام 0.1 ،0.3 ،0.5 مل على التوالي كجرعات منخفضة.

عينة اللشمانيا : Leishmania samples

تم الحصول على العينات لطفيلي اللشمانيا الجلدية *L. tropica* من المرضى الراقدين في مستشفى الحلة العام ومختبر الصحة العام في محافظة بابل (شكل 1) . حيث اخذت العينة من الجلد بعد تعقيمه بـــ 70 % كحول اثيلي ثم سحب 0.2 مل من تحت منطقة القيح باستخدام محقنة طبية نظيفة استخدمت في تحضير المسحة المباشرة Direct smear واستنبات الطفيلي (الحيالي ،2000) .

تحضير المسحة المباشرة للطفيلي: Direct smear preparation

يوضع جزء من العينة التي تم اخذها من تحت الجلد على شريحة زجاجية نظيفة ثم تجفف وتثبت بواسطة الكحول المثيلي لمدة 1-2 دقيقة وبعد غسلها بالماء المقطر تصبغ الشريحة بصبغة كمزا Geimsa s stain 10-15% لمدة 30 دقيقة ثم تغسل بالماء المقطر وتجفف وتفحص تحت المجهر الضوئي وبالعدسة الزيتية x100 (شكل 2).

استنبات طفيليات اللشمانيا: Leishmania culture

وضعت طفيليات اللشمانيا في الوسط الزرعي الثنائي الطور Tobie's medium للحصول على نمو جيد للامامي السوط في وقت قصير(1950 ، Tobie *et al*.). يتكون هذا الوسط من طورين ، وسط شبه الصلب Semisolid Phase والوسط السائل Liquid medium ومكونات هذين الوسطين كما يأتي: -

الوسط شبه الصلب Semisolid medium كل لتر يحتوي على :-

NaCl	6.91gm	KCl	0.29gm	Peptone	1.0gm
$CaCl_2H_2O$	0.22gm	D-glucose	0.77gm	*Beef extract*	0.3gm
$NaHCO_3$	0.1gm	Agar	4.0gm	D.W	800ml
		PH=	7.4±0.1		

تذاب كل المـــواد الصلبة بالماء المقطرعدا الدم والمضاد الحيوي ويعدل ال pH الى 7.2 .يضاف الى هذا الوسط 200 مل دم ارنب غير مخثر و50 غم من المضاد الحيوي Gentamycine ثم يوضع الوسط في الموصدة عند ضغط يعادل الضغط الجوي ولمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 121 مْ وتؤخذ منه 5 مل على شكل عالق في قنينة ذات غطاء محكم توضع بشكل مائل للحصول على اكبر مساحة سطحية لتنمية الطفيلي مع مراعاة عدم التلوث وتحفظ بالثلاجة .يستخدم هذا الوسط للعزل الاولي للطفيلـــــــي وتنميته (Alder & Theodor , 1929).

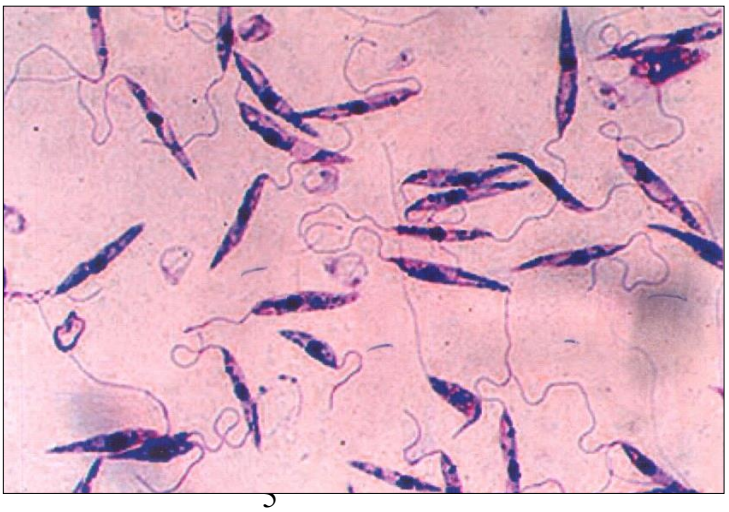
الوسط السائل Liquid medium كل لتر يحتوي على :-

NaCl	6.91gm	KCl	0.29gm	Beef extract	0.3gm
$CaCl_2$	0.22gm	D. Glucose	0.77gm	Brain heart infusion	10gm
$NaHCO_3$	0.1gm	Peptone	1.0gm	D.W	800ml
		pH=	7.4±0.1		

وصف من قبل Al-Bashir (1992) الذي حوره عن الوسط شبه الصلب الخاص بـــ Alder & Theodor (1929) الذي يستخدم لانتاج اعداد كبيرة من الطفيلي . كل لتر يحتوي على 200 مل دم الارنب الغيرمختثرالمخفف بنسبة 2 :1 (ماء - دم) والمضاد الحيوي والتي اضيفت بعد تعقيم الوسط بالموصدة عند ضغط يعادل الضغط الجوي لمدة 20 دقيقة. كل هذه الاوساط حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة . ثم خزنت بدرجة 4 مْ لحين الاستعمال.

يضاف 2 مل من الوسط السائل الى الوسط شبة الصلب ويحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال. لغرض تنمية الطفيليات في هذا الوسط ينقل لقاح Inoculum بحجم 0.1 مل من الوسط السائل الحاوي على نمو جيد لامامية السوط الى الوسط الزرعي بوساطة محقنة طبية معقمة ويحفظ في حاضنة بدرجة 26 مْ ثم يتابع نمو وتكاثر الطفيليات لهذة الأوساط باستخدام المجهر الضوئي لأيام متتالية والحرص على عدم تلوث الأوساط إلى أن يصل العـــــدد (1×10^7 -1×10^7) طفيلي /مل

شكل(1): النوع الرطب لقرحة اللشمانيا الجلدية *L.tropica*



شكل(2): أمامي السوط للشمانيا الجلدية مصبغة بصبغة كمزا Geimsa stain
من قبل Killik KR.(1990)

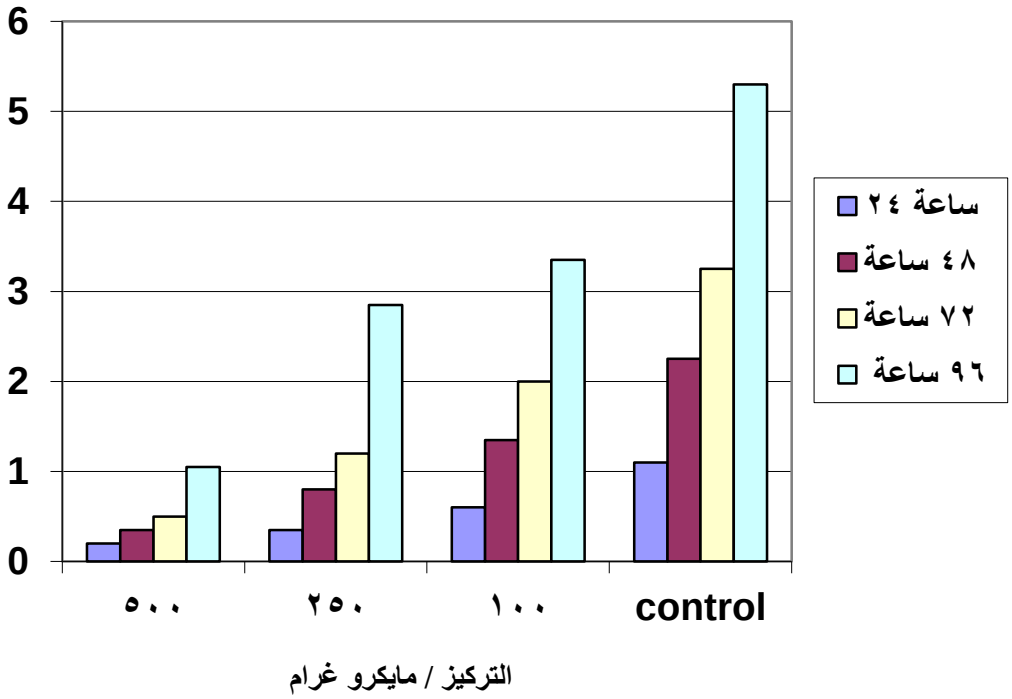
النتائج : Results

تحديد الطور اللوغاريتمي لأمامي السوط للشمانيا الجلدية *L.tropica* .

يبين جدول (1) و(2) تاثير التراكيز العالية والواطئة من السكر المتعدد الدهني على عدد اماميات السوط لطفيلي اللشمانيا (مجموعة السيطرة) النامي في وسط توبي والذي حدد طوره اللوغاريتمي Log phase بوساطة شريحة عد كريات الدم الحمراء Haematocytometer . حيث ان النمو الخطي يزداد لحد فترة 96 ساعة وتنعدم الزيادة الخطية بعد هذة الفترة ، لذلك عدت هذة الفترة من النمو بالطور اللوغاريتمي Log phase لأمامي السوط (شكل 3). وكان عدد الاجيال 5.61جيل وزمن الجيل 16.65.

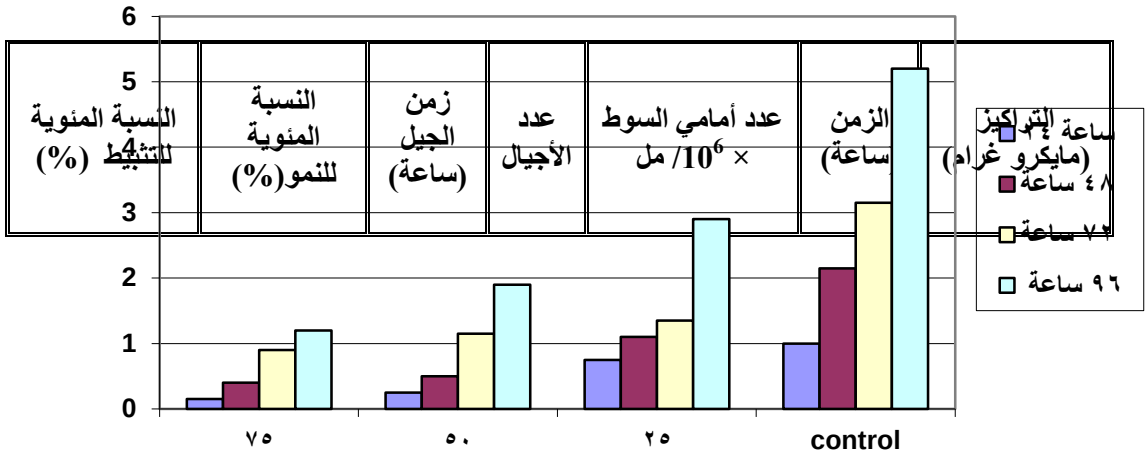
تاثير السكر المتعدد الدهني LPS لبكتيريا *E.coli* على نمو أمامي السوط للشمانيا الجلدية *L.tropica* .

تم في الدراسة الحالية تحديد فعالية السكر المتعدد الدهني المضاف بتراكيز مختلفة الى وسط النمو ضد امامي السوط ، حيث تم قياس معدل عدد امامي السوط القادرة على الحركة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وتم تحديد مدى تاثير المستخلص على نمو اللشمانيا من خلال ملاحظة منحنى النمو (شكل 3، 4). أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان مستخلص السكر المتعدد الدهني فعالا ضد أمامي السوط لطفيلي اللشمانيا ، إذ اظهر نسبة تثبيط وهي 78 % ،85 % عند التركيزيين 75 ،500 مايكروغرام/ مل على التوالي وأدى إلى اختزال عدد الأجيال إلى 3.28 جيلا عند التركيز 500 مايكروغرام/ مل بعد 96 ساعة من المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة التي كانت 5.61 ، اما بالنسبة للتركيز 75 مايكروغرام/ مل فكان الانخفاض الى 3.6 جيلا مقارنة بمجموعة السيطرة (5.61) .كذلك التركيزيين 75 ،500 مايكروغرام/ مل سجل زمن جيل مقداره 25.83 و28.2 ساعة على التوالي ، مقارنة بمجموعة السيطرة التي سجلت 16.65 ساعة (جدول 1 ، 2).



شكل(3) :تاثير التراكيز العالية من السكر المتعدد الدهنيLPS على نمو أمامي

السوط للشمانيا الجلدية *L.tropica* .



التراكيز (مايكرو غرام)	الزمن (ساعة)	عدد أمامي السوط $\times 10^6$/ مل	عدد الأجيال	زمن الجيل (ساعة)	النسبة المئوية للنمو(%)	النسبة المئوية للتثبيط (%)

التركيز /

شكل(4) :تأثير التراكيزالمنخفضة من السكر المتعدد الدهني LPS على نمو أمامي السوط للشمانيا الجلدية *L.tropica* .

جدول(1): تأثير التراكيز العالية من السكر المتعدد الدهني LPS على عدد أمامي السوط وعدد الأجيال وزمن الجيل والنسبة المئوية للنمو والتثبيط

التراكيز (مايكرو غرام)	الزمن (ساعة)	عدد أمامي السوط × 10^6 / مل	عدد الأجيال	زمن الجيل (ساعة)	النسبة المئوية للنمو(%)	النسبة المئوية للتثبيط (%)
500	24	0.1	0.9	24	18	82
	48	0.25	1.7	26.4	15	75
	72	0.4	2.22	30.9	15	76
	96	0.95	3.28	28.2	19	85
250	24	0.25	1.7	15.17	13	69
	48	0.7	2.9	15.9	35	65
125	24	0.15	1.21	18.05	22	88
	72	1.1	3.47	20.01	36	64
	96	2.75	4.72	19.75	53	53
100	24	0.5	2.47	9.17	54	46
	48	1.25	3.64	12.7	60	40
	72	1.9	4.21	16.5	61	39
	96	3.25	5.01	18.8	63	41
Control	24	1.0	3.34	6.8	100	-
	48	2.15	4.38	10.5	100	-
	72	3.15	5.01	14.23	100	-
	96	5.2	5.61	16.65	100	-

F المحسوبة الكلية= *25.9
F الجدولية(0.05)=6.36

***فروق معنوية تحت مستوى دلالة (0.05).**

جدول(2): تأثير التراكيز المنخفضة من السكر المتعدد الدهني LPS على عدد امامي السوط وعدد الأجيال وزمن الجيل والنسبة المئوية للنمو والتثبيط

88	22	20.56	2.21	0.4	48	
70	30	21.56	3.22	0.9	72	
78	24	25.83	3.6	1.2	96	
69	31	13.2	1.7	0.25	24	**50**
64	26	18.45	3.47	0.5	48	
62	38	19.67	3.53	1.15	72	
67	37	22.11	4.12	1.9	96	
33	77	7.68	3.07	0.75	24	**25**
47	53	13.3	3.47	1.1	48	
66	44	18.55	3.74	1.35	72	
51	56	19.45	7.80	2.9	96	
-	100	6.8	3.34	1.0	24	**Control**
-	100	10.5	4.38	2.15	48	
-	100	14.23	5.01	3.15	72	
-	100	16.65	5.61	5.2	96	
F المحسوبة الكلية= *50.6 **F الجدولية(0.05)=6.36**						

***فروق معنوية تحت مستوى دلالة (0.05).**

المناقشة : Discussion

اصبح من الواضح ان داء اللشمانيا يعد من الاوبئة المنتشرة عالمياً، لذلك من لضروري ايجاد العلاج المناسب له لاسيما ان توفر مواد طبية وصيدلانية فعالة وبدون اعراض جانبية للقضاء على المرض امر محدود جداً.

تم استخدام السكر المتعدد الدهني (LPS) المستخلص من بكتيريا *E.coli* كمادة مؤثرة على حيوية وفعالية طفيليات اللشمانيا الجلدية والدراسات حول استخدام هذة المادة غير متوفرة وانما تم استخدام هذة المادة ضد حيوية الرؤيسات الاولية لطفيلي المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus* كمعدلات مناعية مما اعطت نتائج جيدة في تحفيز الجهاز المناعي وبالتالي في قتل هذة الرؤيسات والحد من انتشارها (المتيوتي ،2005).

يعتمد معظم الاشخاص الذين يعيشون في المناطق الموبوءة بداء اللشمانيا بصورة كبيرة على المعالجة بالطب الشعبي للتخفيف من اعراض المرض ، وقد اتجهت الدراسات الحالية نحو التحري عن المستخلصات النباتية والبكتيرية والتي لها فعالية مضادة للشمانيا، ويتم ذلك باستخدام الشكل المسوط للطفيلي Promastigote وذلك لسهولة ابقائه تحت الظروف المناسبة خارج الجسم الحي *In vitro* وكذلك فان دراسة امامية السوط يمكن ان تشير الى احتمالية وجود فعالية مضادة للشمانيا للمادة التي يتم اختبارها (Chan-Bacab and Pena-Rodriguez , 2001) حيث تلاحظ الفعالية من خلال التأثير على اعداد أمامي السوط وعلى زمن الجيل وعدد الجيل لها وهذا ما قمنا بدراسته في هذا البحث حيث تم اثبات وجود تأثير سمي مضاد للشمانيا للسكر المتعدد الدهني خارج الجسم الحي من خلال تأثير هذه المستخلصات على نمو أمامي السوط في وسط توبي وكذلك تأثيرها على عدد وزمن اجيالها. وعموماً فقد تم تحديد عدد أمامي السوط النامية في وسط توبي خلال فترة (96) ساعة من النمو أي خلال الطور اللوغارتمي Log phase حيث لوحظ إن أعداد أمامي السوط تتضاعف عدة مرات بزيادة فترة النمو حتى تصل الى الطور اللوغارتمي حيث بلغ العدد (5.2×10^6) طفيلي/سم^3 جدول (1) وشكل (3و4) وتشبه هذه النتيجة الى حدٍ ما جاء به الحيالي (2000) حيث وصل عدد أمامي السوط النامية في وسط توبي خلال الطور اللوغارتمي الى ($3 - 5 \times 10^7$) طفيلي/سم^3 لطفيليات *L. donovani* و *L. major*، في حين بلغت أعداد أمامي السوط لطفيليات *L. major* حوالي (3.45×10^7) طفيلي/سم^3 (الخان، 2001) وما يقارب ($2 - 4 \times 10^7$) طفيلي/سم^3 لطفيليات *L. tropica* و *L. donovani* (الزهاوي، 1988).

وقد تم حساب عدد الجيل وزمن الجيل (مجموعة السيطرة) لأمامي السوط للشمانيا الاستوائية *L. tropica* حيث بلغ (5.61) جيلاً و (16.65) ساعة على التوالي عند فترة الطور اللوغارتمي جدول (1و2). وفي ضوء هذه النتائج تبين ان هناك تأثيراً سمياً واضحاً للسكر المتعدد الدهني على نمو طفيليات *L. tropica* وذلك من خلال

ملاحظة الانخفاض التدريجي لاعداد أمامي السوط مع زيادة تراكيز المستخلصات المستخدمة وهذا يتفق مع ما جاء به الخان (2001) في اثناء دراسته على تأثير مستخلصي الحنظل والشفلح على نمو أمامي السوط لطفيليات *L. major* ؛ كذلك دراسته على تأثير نفس المستخلصات على نمو طفيلي المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* (الخان، 2002). فضلاً عما جاء به(2002) Arteen و AL-Ne'aimy حيث أدى تعريض أمامي السوط لطفيليات *L. major* لتراكيز مختلفة من كبريتات النحاس اللامائية إلى حدوث انخفاض تدريجي في أعداد أمامي السوط والذي يزداد بزيادة التركيز وفترة التعريض.

اظهرت النتائج ان قيمة التركيز نصف القاتل L.D.50 لمستخلص السكر المتعدد الدهني هي (25) مايكروغرام عند الطور اللوغارتمي للنمو هي 51% الجدول (2) والشكل (4) في حين كانت قيمة L.D.50 للتركيز (250) مايكروغرام هي 53 % الجدول (1) .

وقد أدت تراكيز مستخلص السكر المتعدد الدهني 500 و75 مايكروغرام والتي كانت الافضل في تاثيراتها والى حدوث نسبة تثبيط في النمو وصلت الى (85%) و (78%) ، على التوالي حيث كانت عدد امامي السوط 0.95 × 10^6 و 3.28 جيل للتركيز 500 مايكروغرام وعدد امامي السوط 1.2×10^6 و3.6 جيل للتركيز 75 مايكروغرام خلال الطور اللوغارتمي وهذا يتفق مع ما جاء به(2002) AL-Ne'aimy و Arteen حيث أدى تعريض أمامي السوط لـ *L. major* لتركيز (12.5) مايكروغرام/سم^3 من كبريتات النحاس اللامائية إلى انخفاض النمو بنسبة (64%)، كما تتفق هذه النتائج مع الحيالي (2000) في دراسته تأثير عقار الكلوروبرومازين على نمو وايض *L. donovani* و *L. major* حيث وجد ان استخدام التراكيز العالية (20) و (25) مايكروغرام/سم^3 أدى لحدوث تثبيط في النمو بنسبة (90%) لامامية السوط لـ *L. donovani* و *L. major* على التوالي. وقد يعود التأثير التثبيطي لهذه المستخلصات الى احتوائها على مركبات فعالة تؤثر على نمو أمامية السوط خارج الجسم الحي حيث يعد السكر المتعدد الدهني للبكتريا السالبة لصبغة كرام من المعدلات المناعية التي لاتزال البحوث المكثفة تسلط الضوء عليه نظراً لما يتمتع به من خواص كيمياوية تنعكس على تأثيراته الحيوية اذ أشارت البحوث إلى ان السكر المتعدد من المواد الطبيعية التي لها القابلية على زيادة الفعالية الوظيفية والايضية للبلاعم في عمليات البلعمة وقتل الجراثيم، ومنها السكر المتعدد الدهني المستخلص من جرثومة *Escherichia coli* (Ulevitch, 2003) وان Ellner and Spagnnolo,1989; Ulevitch *et al*.,1990; Johnson, 1994; السكر المتعدد الدهني عندما يرتبط بخلايا معزولة من الكبد يؤدي الى انتاج عامل نخر الورم Tumor Necrosis Factor (TNF) وافرازه، كما انه يحفز الخلايا وحيدة النواة على بناء العامل الوسيط نفسه وإفرازه (Su *et al*., 2002). يتضح ان هناك تشابه بين تركيزي 75 و500 مايكروغرام في التاثير التثبيطي ربما يعود ذلك الى اختلاف في الوزن الجزيئي بينهما لان السكر المتعدد الدهني استخلص على مراحل وهذا ما يتفق مع ماذكره (Pier,1982) ان السكر المتعدد الدهني ذي اوزان جزيئية عالية ويؤثر بالتراكيز الواطئة وهذا مايفسر تاثير التراكيز الواطئة في الدراسة الحالية . ومن ناحية اخرى قد يعود سبب تاثير السكر المتعدد الدهني الى التصاقه على مستقبلات الخارجية لجدار اللشمانيا مما ادى الى منع اتصالها بالمحيط الخارجي مما اثر على حيويتها. فقد درست Al-Taei (1996) تاثير السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتيريا Rhizobium spp على حيوية وفعالية الرؤيسات الاولية للاكياس المائية Hydatid cysts ولاحظت ان هذة المادة قد اثرت على حيوية وفعالية الرؤيسات الاولية بشكل كامل بنسبة (100 %) بعد اليوم العاشر وعند التركيزيين 125 ،250 مايكروغرام /مل . وربما يكون تاثير السكر المتعدد الدهني LPS المستخدم ضد اللشمانيا الجلدية في الدراسة الحالية ربما تداخلت مع أو ازاحت الاحماض الدهنية المهمة داخل الخلية اذ تضمن الى حد ما على بناء المركبات الاخرى مثل البروتينات والكاربوهيدرات والاحماض النووية حيث اوضح الخان (2001) ان هناك تغيرات في نوعية الأحماض الدهنية لامامي السوط *L.major* المعاملة بالتركيز النصف القاتل L.D.50 من مستخلصي الشفلح والحنظل مقارنة بمجموعة السيطرة بعد 96 ساعة وتباينت نوعية الاحماض الدهنية لكل معاملة . وربما يعود هذا التغير في المحتوى الدهني لامامي السوط المعاملة وغير المعاملة الى نوع الاحماض الدهنية الموجودة في الوسط (Gutteridge & Coombs , 1977) حيث ان الدهن A الوجود في السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* له تاثير السموم الداخلية للشمانيا (Al-Musaui, 2002). لذا نستنتج من الدراسة الحالية ان للسكر المتعدد الدهني تاثيرات فعالة ضد اللشمانيا الجلدية لذا نوصي بتوسيع الدراسة في هذا المجال لتحديد افضل تركيز يمكن استخدامه في مثل هذة الدراسات خارج وداخل الجسم الحي لفتح افاق جديدة في معالجة داء اللشمانيا الجلدية .

المصادرالعربية: **References**

الجبوري، شيماء عبدالله احمد (2005).تاثير المستخلصات المائية لنباتي الدفلة *Nerium oleander* والسبحبح *Melia azedarach* على نمو وايض طفيليات اللشمانيا الاستوائية امامية السوط

promastigote *Leishmania tropica* خارج الجسم الحي. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية.

الحيالي، هيثم لقمان شهاب (2000). تأثير دواء الكلوروبرومازين Chloropromazine على نمو وايض بروماستيجوت (Promastigote) طفيليات اللشمانيا. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

الخان، حسين اسماعيل ارتين نزار (2001). تأثير المستخلصات المائية لنباتي الشفلح *Capparis spinosa* والحنظل *Citrullus colocynthis* على نمو وايض امامية السوط لطفيليات اللشمانيا الجلدية promastigotes *Leishmania major* خارج الجسم الحي. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

الخان، حسين اسماعيل ارتين نزار (2002). تأثير المستخلصات المائية لثمار نباتي الشفلح *Capparis spinosa* والحنظل *Citrullus colocynthis* على نمو المشعرات المهبلية *Trichomonas vaginalis* خارج الجسم الحي. مجلة علوم الرافدين، 13 (1) : 83 – 90.

الزهاوي، سعادة مجيد (1988). دراسة تأثير فصائل الدم وبعض المركبات على نمو ومحتوى اللشمانيا من الاحماض النووية والبروتينات. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

الكواز، الهام عبد الواحد (1991). علم الطفيليات النظري. (مترجم). دار الحكمة للطباعة والنشر. جامعة الموصل/العراق.

المتيوتي ، صدام سالم ياسين (2005). تاثير السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتيريا *Escherichia coli* في الاستجابة المناعية للفئران البيض ضد الاصابة بداء الاكياس العدرية الثانوي .رسالة ماجستير،كلية التربية ، جامعة الموصل.

مولان، عبد اللطيف وميرو، وجدان محمد صالح (1990). علم الطفيليات الابتدائية والديدان المسطحة الطفيلية. الجزء الاول. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

المصادرالاجنبية

Abraham, G., Leo, Y. S., Singh, M. and Wong, S. Y. (1997). A case report of visceral leishmaniasis in Singapore. Ann. Acad. Med. Singapore, 26 : 713 – 716.

Al- Bashir NT, Rassam MB & AL- Rawi BM.(1992). Axenic cultivation of amastigotes of Leishmania donovani & L. major & their infectivity. Ann. Trip. Med. Parasitol.; 86: 487- 502.

Alder S and Theodor O.(1929). The distribution of sand flies & Leishmania in Palestine, Syria & Mesopotamia. Ann. Trop. Med. Parasitol.; 23: 269-306.

Al-Khawajah, A. (1998). Recent trends in the treatment of cutaneous leishmaniasis. Department of Pharmacology, College of medicine, King Faisal University, Dammam, Saudi Arabia.

Al-Musawi, K.H.R. (1998). Effect of crude pyocyanine & alginate produced by local Pseudomonas aeruginosa on cellular immune response in mice. M.Sc.thesis. Coll.Sci. Al-Mustansiria Uni.Iraq.

Al-Taei A.F.M. (1996).Activation of macrophage with immunoraduators and the effect of this activation upon the infection with Echinococcus granulosus .Ph.D. thesis,college of sciences,Al-Mustansiria Uni.Iraq.

Arteen, H. I. and AL-Ne'aimy, Y. M. A. (2002). Effect of anhydrous copper sulphate on the growth of Lieshmania major promastigotes in vitro., J. Edu, Sci. 14 (4) : 81 – 89.

Chan-Bacab, M. and Pena-Rodriguez, L. M. (2001). Plant natural products with Leishmanicidal activity. Nat. Prod. Rep., 18 : 674 – 688.

Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis : Public health aspects and control. Clin. Dermatol., 14 : 417 – 423.

Ellner, J. J. and Spagnnolo, P. J. (1989). Suppression of antigen and mitogen induced human-T-lymphocyts DNA synthesis by bacterial lipopolysaccharide : medition by monocyte activation and production of prostaglandins. J. Immunol., 123 (6) : 2689 – 2695.

Gracia, L. S. and Bruckner, D. N. (1993). "Diagnostic medical parasitology" 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington. D. C.

Gutteridge, W. E. &Coombs, G.H. (1977). Biochemistry of parasitic protozoa.The MacMillan press Ltd. London.

Hazra, B., Golenser, J., Nechemiya, O., Bhattacharyya, S., Azzam, T., Domb, T. and Frankenburg, S. (2002). Inhibitory activity of diospyrin derivatives against Leishmania major parasites in vitro. Indian J. Pharmacol., 34 : 422 – 427.

Heeres, J.; Backy, J.; Nostmarrs, J.H.;Vancutsem,J.M.(1979). The synthesis and antifungal activity of ketocarnzol. A new potentorlly spectrum antifungal agent,J. Med.Chem.,22:1993-2005.

Herwaldt, B. (1999). Leishmaniasis. Lancet, 354 : 1191 – 1199.

Ibrahim ,L.A.A. (2000). Biological & immunological study for hydatid cyst, Ph.D. thesis,Coll.Sci. Al-Mustansiria Uni.Iraq.

Jansson, P. E.; Lindberg, A. A.; Lindberg B. and Wollin, R. (1981). Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharide from enterobacteriaceae. Eru. J. Biochem., 115 : 571 – 577.

Killik KR. .(1990). The life cycle of Leishmania in the sand fly with special reference to the form infective to vertebrate host Ann. Prasitol. Hum.; 5: 37-42.

Learen, D. B.; Brestel, E. P. and seetharama, S. (1987). Hypochlorite scavengings by pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun., 55: 1813-1818.

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.

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.

Pier, G. B. (1982). Cross protection by Pseudomonas aeruginosa polysaccharide infection & immune .38:1117-1122.

Su, G. L.; Goyert, S. M.; Fan, M.; Aminlari, A.; Gong, K. Q.; Klein, R. D.; Myc, A.; Alarcon, W. H.; Steinstraesser, L.; Remick, D. G. and Wang, S. C. (2002). Activation of human and mouse kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 283 (3) : 640 – 645.

Tobie, E. J., Brand, T. V. and Mehlman, B. (1950). Cultural and physiological observation on Trypanosoma rhodesiense and Trypanosoma gambiense. J. Parasitol., 36 : 48 – 54.

Ulevitch, R. J., mathison, J. C.; Schumann, R.; Tobias, P. S. (1990). A new model of macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharide. J. Trauma., 30 (12) : S 189 – S 192.

Ulevitch, R. J. (2003). Regulation of receptor dependent activation of the innate immune response. J. Infect. Dis., 187 (2) : S 351.

Vidyashankar, C. (2002). Leishmaniasis. eMedicine. Com. Inc.

WHO (1999). Division and control of tropical diseasea-leishmaniasis control. Comments and questions. Britannica. Com. Inc.

WHO (2002). Leishmaniasis. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

Effect of the Lipopolysaccharide Extracted from *Escherichia coli* on Growth of *Leishmania tropica* Promastigote *In Vitro*

Ahmed K. Al-hamiary **Dr.Maher Al-Kuraishy** **Ahmed M. Al-Mosawy**

Dentistry college-Babylon Uni. **Sciences college-Babylon Uni.** **Dentistry college-Babylon Uni.**

Abstract :

In the present study, the inhibitory effect of lipopolysaccharide extracted from *Escherichia coli*, on growth of *Leishmania tropica* promastigote in vitro was investigated.The results showed that the lipopolysaccharide investigated had a marked inhibitory effect, at different concentration on growth of the promastigote .The concentration 100 µg\ml showed 41% inhibition ratio where as it is about 50% at both 25,250 µg\ml ,representing L.D.50. The concentration 50 µg\ml showed 67% inhibition ratio . 75 & 500 µg\ml showed the highest inhibition ratio as it was 78% and 85% , respectively . Lipopolysaccharide had the same inhibitory effect on number of cells , number of generation and the generation time.