مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22 (3) 2017

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

تأثير السكر المتعدد المستخلص من كبسولة بكتريا *Klebsiella pneumonia* كمحفز مناعي للأرانب المختبرية المصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*

اسامة ناظم نجرس ، عهود مزاحم شاكر

كلية العلوم التطبيقية ، جامعة سامراء ، سامراء ، العراق

الملخص

أجريت الدراسة للمدة من من شهر كانون الاول 2013 لغاية تشرين الثاني 2014 وقد تضمنت دراسه تأثير متعدد السكريات المحفظي (K - Capsular Antigen) المستخلص من بكتريا *Klebsiella Pneumoniae* على الاستجابة المناعية في ذكور الارانب البيض النيوزلندية المصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* المسبب لداء الزحار الاميبي Amoebic dysentry وذلك بالاعتماد على عدة معايير شملت دراسة التغيرات الحاصلة في مستويات تراكيز المحركات الخلوية الخاصة بعملية البلعمة وعرض المستضد و المناعة الخلوية المتمثلة بالانترفيرون كاما IFN-γ ، والبين ابيضاض−10 (IL–10) interleukin والبين ابيضاض 12 (IL–12) ومعامل البلعمة و عيوشية خلاياPMNs والخلايا اللمفية والتشكل الزهري التائي الفعال والكلي والبائي ومعامل انقسام خلايا نخاع العظم وتفاعل ارثس وفرط الحساسية الاجل والاستجابة المناعية الخلطية المتمثلة بالكلوبيولينات المناعية النوعية IgG, IgM باستخدام تقنية الإليزا وقد توصلت الدراسة الحالية إلى ارتفاع كل المؤشرات المناعيه بعد التمنيع بالمستضد واستمرار ارتفاعهم بعد الخمج بالطفيلي وتبين من الدراسة الحالية امكانية استخدام السكر المتعدد المستخلص من بكتريا *Klebsiella Pneumoniae* بوصفه معدلاً مناعياً مؤثراً لتحفيز كل من المناعة الطبيعية والمكتسبة ضد الخمج بداء الزحار الاميبي في الارانب البيض.

المقدمة

يعد طفيلي اميبا النسيج *Entamoeba histolytica* من الاوالي المهمة الشائعة الانتشار في العالم ويسبب للإنسان داء الاميبا Amoebiasis , ويقدر عدد المصابين به في جميع انحاء العالم بـ 480 مليون اصابة ويتسبب في وفاة (40 – 110الف) حالة سنويا . [1]ويحتل داء الاميبا المرتبة الثالثة بعد الملاريا Malaria والبلهارزيا Bilhariasis في حالات الوفاء[2] . يستوطن الطفيلي الامعاء الغليظة ولاسيما منطقة الاعور Cecum ونهايات الامعاء الدقيقة ويسبب اعراض مرضية symptomatic amoebiasis. ويمكن ان تنتقل الاصابة إلى شخص اخر عن طريق الماء والطعام الملوث ببراز الاشخاص المصابين الحاوي على الطور المتكيس المعدي للطفيلي[3]. وبما ان استراتيجية العلاج التقليدي في علاج داء الزحار الاميبي غير تامة الوضوح, فضلا عما يرافق استعمال الادوية من اضرار جانبية, وبتواصل تقدم البحوث والدراسات بشكل واسع فقد تم دراسة استخدام المعدلات المناعية Immunomodulation في تعديل الاستجابة المناعية ضد الطفيلي عن طريق تثبيط أو تحفيز خلايا معينه في الجهاز المناعي الخلوي بوصفها احدى الوسائل العلاجية أو لغرض انتاج الكلوبيولينات المناعية المعروفة, ويعد السكر المتعدد للبكتريا السالبة لصبغة كرام من المعدلات المناعية الجيدة والمستخدمة سابقا [4] لامتلاكه تأثيرات محفزة لمكونات الجهاز المناعي ، اذ يعمل على تحفيز البلاعم الكبيرة والخلايا الوحيدة ويؤثر على تمايز الخلايا الوحيدة إلى انواع اخرى من الخلايا[4], كما تعمل الذيفانات الداخلية Endotoxins على تحرير المحركات الخلوية الالتهابية Proinflammotory cytokines مثل البين ابيضاض (1,4,8,10) (IL-1,4,8,10) والانترفيرون كاما (INF-Y) gamma interferon [4]. ولغرض الكشف عن السبل الكفيلة والمفيدة في السيطرة على الطفيلي عن طريق تحفيز أو تعديل الاستجابة المناعية للمضيف لغرض الحماية من الاصابة بداء الزحار الاميبي ظهر الهدف من هذا البحث دراسه تاثير السكر المتعدد المستخلص من بكتريا *K. pneumoniae* على تعديل الاستجابة المناعية في الارانب المختبرية النيوزلندية ضد الخمج المنفعل بداء الزحار الاميبي اذ وجد وبعد الاطلاع على ما نشر من البحوث العلمية السابقة انه لم يسبق استخدامه كمحاولة لتحديد تأثيره بوصفه محفزًا أو منشطًا لمناعة المضيف ضد هذا المرض.

المواد وطرائق العمل

تحضير المحاليل والدواريء والصبغات

حضرت محاليل تقدير متعدد السكريات المحفظي حسب طريقة [5] ومحاليل عزل وتشخيص الطفيلي حسب طريقة[6], اما محاليل الاختبارات المناعية فقد حضر دارئ الفوسفات الملحي PBS حسب طريقة[7] ومحلول واطيء التوتر والكولجسين والتثبيت حسب [8]عالق كريات الدم الحمر للخروف ومصل المضاد للارنب [9] ومتمم الفار وفق طريقة[10].

عينة البكتريا

تم الحصول على عزله بكتريه من *Klebsiella pneumoniae* النقية من مختبر الاحياء المجهرية في كلية العلوم التطبيقية وتم تأكيد التشخيص باستخدام عدة Api-20E بعد تنمية البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ, وقد تم اجراء هذا الكشف للتأكد من وجود المحفظة وذلك حسب طريقة[11], كما تم استخلاص الكبسولة وفق الطريقة المتبعة من قبل[12] مع بعض التحويرات التي اجرتها[13], وتم اجراء الفحوصات الكيموحيويه التقليدية, حيث اجري اختبار مولش للكشف عن السكريات حسب طريقة [14], وقدر كميه السكر المنقى

من مستخلص الكبسولة باستعمال طريقة الفينول – حامض الكبريتك المذكورة من قبل [15]

عينات الطفيلي

تم الحصول على عينات طفيلي *E. histolytica* من المراجعين والراقدين في مستشفى سامراء العام والذين يعانون من اسهال شديد الى متوسط وفي معظم الحالات يعانون من اسهال دموي, وشخصت العينات بالطريقه المتبعة من قبل [16], وتم عزل الطفيلي حسب طريقه[17] وقد تم حساب عدد الاكياس وتحديد جرعه الحقن, حيث تم تحديد جرعة الحقن عن طريق حساب عدد الاكياس في كمية (0.1) مل وحددت الجرعة بمقدار 4×10^3 كيس جرعة اصابة لكل ارنب يتم تجريعه فمويا(تم تحديد الجرعة من قبل الباحث), واستخدمت ذكور الارانب بعد تحديد جرعة الحقن, ثم تم تجريع الارانب باكياس الطفيلي عن طريق الفم وتم التحري عن اكياس الطفيلي في براز الارانب المصابة يومياً ولمدة اسبوعين بعد الخمج للتأكد من حدوث الاصابة بالطفيلي وتم التأكد من حدوث الخمج عن طريق تحضير عدة مسحات من غائط الارانب المصابة على شريحة زجاجية وفحصها تحت المجهر ومشاهدة الطفيلي واطواره المختلفة وتم استخدام محلول لوكل ايودين local iodin وطريقة التطويف بالمحلول السكري للكشف عن الطفيلي

الحيوانات المختبرية

استعملت في هذه الدراسة ذكور الارانب النيوزلندية البيض والتي تم الحصول عليها من المركز الوطني للرقابة والبحوث الدوائية وتراوحت اوزان الحيوانات المستعملة من 1000 – 1800غم بينما تراوحت اعمارها من 10 – 18 شهر وغذيت الحيوانات بالعليقة الجاهزة الخاصة للحيوانات المختبرية واعطيت الماء والغذاء على نحو مستمر طوال مدة الدراسة .

تصميم التجربة

تم استخدام 90 من ذكور الارانب بعد التأكد من سلامتها من الامراض الظاهرية, و تم تقسيمها إلى ثلاثة مجاميع رئيسة وكل مجموعة تضم 30 ارنبا, كما وتم تقسيم المجاميع الرئيسة إلى سته مجاميع ثانوية كل مجموعة شملت خمسه ارانب.

مجموعه المستضد K: تم تمنيع 30 ارنب بمستضد متعدد السكريات واجري التمنيع وفق طريقة [18] و [19], حيث استخدمت طريقة الحقن تحت الجلد(Subcutaneous) وفي العضله Intramuscular كطريقة لاعطاء الجرع للحيوانات بواقع 1 مل لكل حيوان, واستخدمت التراكيز (10, 20, 40, 100) مكغم / مل. وقد تم الاعتماد على هذه التراكيز بعد معرفه التركيز السمي للمستضد و بعد انتهاء فتره التمنيع تم سحب الدم واجراء الفحوصات المناعية ومن ثم تم تجريعها بالطفيلي وبعد اسبوعين تم كذلك سحب الدم منها واجراء الاختبارات المناعية مره اخرها.

مجموعه الطفيلي (سيطرة موجبة): تم تجريع (30) ارنب بطفيلي *E. histolytica* بجرعة فموية مقدارها 4×10^3 من اكياس Cyst الطفيلي, وقد تم فحص براز الحيوانات يومياً للتأكد من حدوث الخمج وبعد اسبوعين من الاصابة تم تقسيم الحيوانات إلى سته مجاميع وكل مجموعة تم استخدامها في تجربة مناعية مختلفة.

مجموعه السيطرة السالبة: تم معاملتها بمحلول الملحي الفسيولوجي وسحب الدم لاجراء الفحوصات المناعية سابقة الذكر

المعايير المستخدمة في الدراسة:

1- تاثير مستضد K على عيوشيه الخلايا اللمفية وعيوشيه متعددة اشكال النوى:

حيث تم عزل خلايا (PMNs) تبعاً لطريقة [20], وعزلت الخلايا اللمفاوية وفقاً لما جاء في [21] وحساب عيوشيتها اعتمادا على طريقة [22][9].

2- تاثير المستضد على عمليه البلعمة في الزجاج وفق طريقة [20].

3- تاثير المستضد على التشكل الزهري التائي الفعال والكلي واعتمدت على طريقة [20].

4- تاثير المستضد على التشكل الزهري البائي B - Rosette حيث اعتمدت طريقة [23], ولدراسة تأثيره على تفاعل ارثش Arthus Reaction اعتمدت طريقة [24] لذلك الغرض.

5- تفاعل فرط الحساسية الاجل Delayed type hypersensitivity (DTH) فقد كان حسابه وفق طريقة[25].

6- تأثيره على معدل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم في الارانب وفق طريقة [8].

7- تأثيره على المحركات الخلوية من خلال الكشف عن وجود الانترفيرون كاما IFN – γ وبين ابيضاض -10 (IL - 10) وبين ابيضاض-12 (IL - 12) فقد اجري باستخدام تقنية Elisa .

8- كما تم اجراء فحوصات الكلوبيلنات المناعية IgM , IgG لمجموعة الطفيلي بعد اسبوعين من الخمج. بطريقه الاليزا.

التحليل الاحصائي استخدم اختبار التباين باتجاه واحد One Way ANOVA وتم استخدام اختبار t لتحليل نتائج قياس مستويات المحركات الخلوية والكلوبيولينات المناعية والتجارب المناعية معنوياً بين الحيوانات المعاملة بمستضد K - Antigen مع السيطرة السالبة ومقارنة السيطرة الموجبة مع الحيوانات المعاملة بالمستضد K - Antigen مع طفيلي *Entameba hisotlytica* وتم تثبيت النتائج على شكل (المعدل + الانحراف المعياري) (Mean ± Standard Deviation)

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج هذه الدراسه ان وسط الإنتاج الذي يتكون من نقيع القلب والدماغ BHI والمضاف اليه 3 % خلاصة الخميرة و 2 % مالتوز كان وسطاً ملائماً لإنتاج متعدد السكريد المحفظي , وتم وضع المستخلص في جهاز Lypholyzor للحصول عليه بشكل مسحوق ابيض اللون, وتم قياس كمية السكر الكلية في نموذج المستخلص بطريقة الفينول – حامض الكبريتيك ،اذ بلغت 2500 مكغم/مل وقد اعتمدت على طريقة[26].

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

تأثير المستضد (K) على عيوشية خلايا متعددة اشكال النوى (PMNs) والخلايا اللمفية: يبين الجدول (1) ان النسبة المئوية لعيوشية الخلايا PMNs لمجموعة الحيوانات المعاملة بمستضد (K) ارتفعت ولكن ارتفاعاً غير معنوي بمستوى ($P < 0.05$) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة حيث كانت (95.9 , 91.2 %) على التوالي وكانت هذه النتائج متوافقة مع [27] عند استخدامها تراكيز (10,5) مكغم / مل من مستخلص كبسولة بكتريا *Klebsiella pneumonia*. أما بالنسبة لعيوشية الخلايا اللمفية (جدول 2) فقد ارتفعت ارتفاعاً غير معنوي بمستوى ($P < 0.05$) مقارنة مع السيطرة السالبة حيث كانت (96.2 ,92.6%) على التوالي, وتدل هذه النتائج على ان استخدام المستضد (K) امن وذلك لكونه لم يقتل الخلايا PMNs والخلايا اللمفية او قلل من نشاطها واتفقت هذه النتائج مع [24])حيث عُدْ متعدد السكريد المحفظي بتركيز (10) مكغم / مل المستخلص من بكتريا Klebsiella امن عند حقنه داخل جسم الانسان ولعدد من المتطوعين. اما بعد تجريع الحيوانات المختبرية الممنعة بالمستضد بطفيلي *E. histolytica* لوحظ ان عيوشية الخلايا PMNs والخلايا اللمفية (الجدول3 و 4) لم تتأثر بوجود الطفيلي وبقيت مرتفعة بنسبة مقارنة لفترة قبل الخمج به وهذا يدل على ان المستضد الذي تم استخدامها كلقاح هي من الممنعات الجيدة والامنة لكونها لم تقتل الخلايا PMNs واللمفية حيث بقيت حية ولم يتاثر عددها ولا وظيفتها حتى بعد الاصابه بالطفيلي.

جدو (1) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا (PMNs) للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K)

المجموعة	عيوشية الخلايا PMNs %) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K-Antigen	1.203 ± 95.98	a
Negative control	6.67 ± 91.22	A

جدول (2) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفية للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K)

المجموعة	عيشيه الخلايا اللمفية% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K-Antigen	0.837 ± 96.200	A
Negative control	2.759 ± 92.62	a

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

جدول (3) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا(PMNs) للحيوانات المنعة بالمستضد (K) مع طفيلي *E . histolytica*

المجموعة	عيوشية الخلايا PMNs %) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K-E	1.11 ± 94.52	a
Positive control	1.75 ± 94.280	a

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

جدول (4) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفية للحيوانات المنعة بالمستضدK مع طفيلي *E . histolytica*

المجموعة	عيشيه الخلايا اللمفية% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K-E	1.004 ± 94.34	a
positive control	2.18 ± 94.58	a

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير المستضد K على عملية البلعمة في الزجاج .

قد اظهرت نتائج هذه الدراسة ارتفاعاً غير معنوياً بمستوى معنوية ($P < 0.05$) في معدلات معامل البلعمة للمستضد K مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة حيث كانت (65.6 , 60.7 %)على التوالي (جدول5) . وقد جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع [27] حيث بينت قدرة متعدد السكرايد المحفظي لبكتريا *K. pneumonia* على زيادة الفعالية البلعمية,كما واظهرت النتائج بقاء معامل البلعمة مرتفع حتى بعد تجريع الحيوانات الممنعة بمستضد K بطفيلي *E. histolytica* كما في الجدول (6) مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث كانت (33.1% , 44.7) على التوالي بمستوى معنوية $P < 0.05$ وهذا يدل على ان اللقاح حفز فاعلية البلاعم على التهام الطفيلي, ولهذه العملية اهمية بالغة في حماية الجسم حيث تعد عملية قتل الطفيليات عن طريق الخلايا البلعمية خطوة اساسية بوصفها خط دفاعي اولي غير متخصص ضد المسببات المرضية[28]. وجاءت هذه النتائج متوافقة مع [29] عند معامله الحيوانات المخمجة بطفيلي *G. lamblia* مع السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Escherichia coli* مقارنة مع السيطرة الموجبة وتتفق ايضا مع [30] حيث استخدم السكر المتعدد المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ولاحظ ارتفاع معامل البلعمة قبل الخمج بدأ الاكياس العدرية وبعده,

تلعب البلاعم Macrophage دوراً مهماً في استجابة المضيف ضد الاميبا المعوية فالبلاعم تعد كمبيد للاميبا بعد اثارتها للعامل المميت للاورام الفا TNF-∝ وانترفيرون كاما IFN-γ [31], وان الالية التي يقضي بها على الطفيلي تتم عن طريق مستقبلات خاصة على سطوح البلاعم مثل $TLR_{(2)}$, $TLR_{(4)}$, $TLR_{(9)}$, والبلاعم التي تنقصها هذه المستقبلات تظهر استجابة غير قوية ضد *E. histolytica* وتدل النتائج التي توصلنا اليها على ان المستضد يعمل على تنشيط خلايا Macrophages لعملية البلعمة عن طريق تحفيزها لانتاج كميات كبيرة من اوكسيد النتريك (No) الذي يعد ساما وقاتلا للاميبا وتعزى اهميه اوكسيد النتريت المنتج من خلايا البلعمة الى قدرته على تنشيط فعالية انزيم reductase Ribonucleotide حيث وجد ان هذا الانزيم يكون حساس للمستويات الواطئه من اوكسيد النتريك[32]

جدول (5) النسبة المئوية للفعالية البلعمية للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضدات (K)

المجموعة	عيوشية الخلايا PMNs %) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة p
K – Antigen	3.36 ± 65.6	b
Negative control	11.56 ± 60.7	b

جدول (6) النسبة المئوية للفعالية البلعمية لحيوانات الممنعة بالمستضد (K) مع طفيلي *E . histolytica*

المجموعة	عيشيه الخلايا اللمفية% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K – E	11.68 ± 44.72	b
Positive control	11.50 ± 33.10	c

تأثير المستضد K في التشكل الزهري التائي

يعد فحص التشكل الزهري من التقنيات التي تستخدم لدراسة الاستجابة المناعية الخلوية من خلال التحري عن عدد الخلايا التائية النشطة اذ تكون العلاقة خطية بين عدد الزهرات المتكونة للخلايا التائية النشطة وبين العدد الكلي للخلايا التائية [33] , وبين الجدول (7) ان المستضد K لم يظهر فرق معنوي بالنسبة للتشكل الفعال مقارنة مع السيطرة السالبة (68.6 , 70%) على التوالي ولكن اظهر فرق معنوي بالنسبة للتشكل الكلي (80.4 , 73.1%)على التوالي ويمكن تفسير الانخفاض الذي حصل في النسبة المئوية للتشكل الزهري للخلايا اللمفاوية الى ان مستخلص الكبسولة قد يلعب دور في عملية احاطة مستقبلات الخلايا اللمفاوية التائية ولا سيما الخاصة بالارتباط مع كريات الدم الحمر للخروف وبهذا يمنع عملية الارتباط ان تتم بين كريات الدم ومستقبلاتها وبالتالي عدم تكون الشكل الزهري أو يسبب موت الخلية اللمفاوية بنسب معينة عند استخدام مستخلص الكبسولة فالخلايا الميته لا تتمكن من تكون الشكل الزهري. يبين الجدول (8) ارتفاع نسبة الشكل الزهري التائي والفعال والكلي معنوياً بمستوى ($p < 0.05$) بعد الخمج بالطفيلي مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث كانت نسبة المستضد K مع الطفيلي بالنسبة للشكل الفعال 49.2%) ,80.1) والكلي (86.5 , 56.2%) وهذا يدل على قدره المستضد على تحفيز الخلايا اللمفية التائيه, حيث تعتبر السكريات المتعددة من التراكيب المهمة في الاستجابة المناعية لا نها تمتلك مستضد عالي القدرة [34] حيث تعمل على تنشيط الجهاز المناعي وزيادة الخلايا وحيده النواة والكريات المحببة granulocytosis في الدم [35] وقد ذكر الباحث[36] ان جدار الخلية والاجزاء المكونة لها القدرة على تنشيط الخلايا البلعمية وتنشيط الخلايا التائية.

جدول (7) النسبة المئوية للتشكل الزهري التائي الفعال والكلي للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد(K)

المجموعة	الشكل الزهري الفعال % المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	قيمة P	الشكل الزهري الكلي % المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	قيمة P
K- Antigen	3.65 ± 68.6	b	7.32 ± 80.4	a
Negative control	2.62 ± 70.12	b	1.51 ± 73.10	b

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

جدول(8) النسبة المئوية للتشكل الزهري الفعال والكلي للحيوانات الممنعة بالمستضد (K) مع طفيلي ***E . histolytica***

المجموعة	الشكل الزهري الفعال%	قيمة P	الشكل الزهري الكلي %	قيمة P
	المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M		المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	
K- E	3.53 ± 80.14	A	0.99 ± 86.54	a
Positive control	9.19 ± 49.28	B	9.52 ± 56.20	b

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير المستضد k في التشكل الزهري البائي

يعد اختبار التشكل الزهري البائي احدى وسائل قياس المناعة الخلطة المعتمدة على الخلايا البائية وتمتلك هذه الخلايا مستقبلات (Fc receptor CD16) والكلوبيولينات المناعية السطحية Surface immunoglobulins حيث يعد الاول مستقبلاً لمكونات المتمم, وتشتغل هذه الصفة لتميز الخلايا اللمفاوية البائية عن طريق ربط خلايا الدم الحمر للخروف والمعامل بالضد IgG والعامل المتمم بالخلايا اللمفاوية البائية[38] ويبين الجدول (9) ارتفاع نسبة التشكل الزهري البائي معنوياً بمستوى($p < 0.05$) لمستضد (K) حيث كانت و (76.4, 56.7%) على التوالي مقارنة مع السيطرة السالبة, وقد جاءت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجدول (10) متوافقة مع [37] التي وجدت ان التمنيع بمستخلص الكبسولة لبكتريا *Klebsiella pnenmoniae* ادت إلى زيادة النسبة المئوية للتشكل الزهري البائي بعد الخمج بالطفيلي. وقد ارتفعت نسبة التشكل الزهري البائي حيث كانت مجموعة المستضد K مع الطفيلي مرتفعة معنوياً بمستوى ($p < 0.05$) بنسبة (79.5 ,59.3%) مقارنة بالسيطرة الموجبة على التوالي, ويعود السبب في ارتفاع الخلايا اللمفية البائية مع وجود الطفيلي الى ان الطفيلي يعتبر مستضد غريب فيحدث فعالية التحفيز المناعي العام والذي يشاهد على شكل مقاومة غير متخصصة تجاه الطفيلي حيث يعمل على تحفيز الخلايا البائية وهذا ما لاحظناه من زياده التشكل الزهري البائي وتمايز الخلايا الناتجة عنها إلى خلايا البلازما Plasms Cells والتي تحرر كميات كبيرة من الضد[39] وهذا ما اكدته الجداول اللاحقة بزياده نسبه الاجسام المضادة, وكما تعمل هذه الاضداد على مهاجمه الطفيلي فلا يتمكن الطفيلي المرتبط مع الضد والمتمم من مقاومة الخلايا البلعمية اذ تقضي عليه وهذا ما اكدته نتائجنا من ارتفاع معامل البلعمة عند وجود الطفيلي .

جدول (9) النسبة المئوية للشكل الزهري البائي للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K)

المجموعة	(عيوشية الخلايا PMNs %)	قيمة P
	المعدل ± الانحراف المعياري	
K- Antigen	3.130 ± 76.400	a
Negative control	8.174 ± 56.72	c

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

جدول (10) النسبة المئوية للتشكل الزهري البائي للحيوانات الممنعة بالمستضد (K) مع طفيلي ***E . histolytica***

المجموعة	عيشيه الخلايا اللمفية%	قيمة P
	المعدل ± الانحراف المعياري	
K- E	8.83 ± 79.58	a
positive control	13.94 ± 59.30	b

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير مستضد K على معامل الانقسام الخيطي لنخاع العظم

يبين الجدول (11) زيادة معنوية بمستوى($p < 0.05$) في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم للمستضد (K) مقارنة مع السيطرة السالبة حيث ارتفعت بنسبة (76.8 ,53.8%)على التوالي وتتفق دراستنا هذه مع[40] حيث استخدمت الالاجنيت (عديد السكريد الخارجي المخاطي) المنتج من بكتريا الزوائف الزنجارية حيث لاحظت ارتفاع معامل انقسام نخاع العظم ولا تتفق مع [13] حيث انخفض معامل انقسام نخاع العظم عند استخدامه مستخلص كبسولة بكتريا *Acinetobacter baumannii* . وتدل النتائج التي توصلنا اليها ان المستضد (K) كان له تأثير محفز على انقسام خلايا نخاع العظم حيث انه اثر على الخلايا السدوية (Stromal cells) الموجودة في نقي العظم من خلال تحفيزها لا طلاق عدد من الوسائط الخلوية الضرورية لانقسام وتمايز الخلايا الجذعية (Stem cells) الى الأنواع

المختلفة من خلايا الدم [41], كما يبين الجدول (12) ارتفاع معامل الانقسام معنويا بمستوى ($p < 0.05$) بعد الخمج بالطفيلي مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث ارتفع مجموعه المستضد K بنسبة (% 82.1 , 48.5) على التوالي والسبب في زياده ارتفاع معامل الانقسام لنخاع العظم بسبب دخول جسم غريب وهو الطفيلي الذي استنزف عدد كبير من الخلايا البيضاء لكي تقاوم الجسم الغازي وبالتالي كانت هناك زياده في معامل الانقسام لكي تعوض عن النقص الحاصل بالكريات الدم البيض.

جدول (11) النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضدات (K)

المجموعة	عيوشية الخلايا PMNs %) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K- Antigen	5.82 ± 76.82	a
Negative control	7.43 ± 53.86	C

جدول (12) النسبة المئوية لمعامل انقسام نخاع العظم للحيوانات الممنعة بالمستضد (K) مع طفيلي *E . histolytica*

المجموعة	عيشيه الخلايا اللمفية% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K- E	3.87 ± 82.16	A
positive control	2.87 ± 48.50	B

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

6- تأثير المستضد K على تفاعل الارثس وفرط الحساسية الاجل

اظهرت النتائج حدوث ارتفاع معنوي بمستوى معنوية ($P < 0.05$) لتفاعل الارثس كما في جدول (13) حيث يظهر ارتفاع سمك وسادة القدم المحسسة بكريات الدم للخروف للحيوانات الممنعة بالمستضد (K) حيث بلغت سمك وسادة القدم المقاسة بالملمتر (0.8 ,1.7) على التوالي أما الجدول (14) فيظهر تفاعل فرط الحساسية الاجل حيث استمرت وسادة القدم في الارتفاع وبلغت ذروتها بعد 24 ساعة, حيث بلغ (0.8,1.5) على التوالي مقارنه مع السيطرة السالبة وبعد (48) ساعة بدأت سمك وسادة القدم بالانخفاض والمبين في جدول(15) حيث بلغ ارتفاع سمك الوسادة للحيوانات المعاملة بالمستضد K بنسبه (0.8, 1.3) على التوالي مقارنه بالسيطرة السالبة وقد جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع [27] حيث استخدمت مستضدات الكبسولة لبكتريا *K. pnumaniae* وكذلك اتفقت مع [42] الذي استخدم معقد بروتين سكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Pasteurella multocida* وقد لاحظ استمرار زيادة سمك وسادة القدم بعد مرور 48 ساعة وكذلك مع[43] وتتفق كذلك مع ما توصل اليه [45][44] باستخدام السكر المتعدد الدهني والسكر المتعدد المستخلص من بكتريا *Psudomnes aeruginosa* . ويمكن ان تعزى الزيادة في سمك وسادة القدم إلى تأثير السكر على الخلايا البلعمية وتفعيلها الذي يؤدي بدورة إلى زيادة اعداد الخلايا اللمفية والذي يؤدي إلى حصول تنسيق بينهما وتنظيم حجم الاستجابة المناعية الخلوية ويزيد من افراز مركبات اللمف المنظمة للاستجابة المناعية مما يؤدي الى انتفاخ وسادة القدم [46]. وأوضحت نتائج الدراسة الحالية ان المعاملة باللقاح (K) ادت إلى رفع معامل فرط الحساسية الارثس والاجل, والذي يمكن ان يعود كما اسلفنا إلى التأثيرات المحفزة للقاح على الخلايا المنتجة للكلوبيولينات المناعية وعلى خلايا البلعم الكبير مما ادى إلى زيادة المعقدات المناعية وتحفيز نظام المتمم مع زيادة في هجرة خلايا البلاعم الكبيرة إلى موقع حدوث التفاعل مما يؤدي إلى تجمع هذه الخلايا ومن ثم رفع معدل فرط الحساسية قياساً مع السيطرة وهذا يتفق مع ما أكده [47] الذي وجد ان اللقاح المتعدد السكريد المحفظي ادى إلى زيادة انتاج الكلوبيولينات المناعية ولاسيما IgM , IgG وزيادة في تفاعل فرط الحساسية الاجل واشار ان اللقاح ينشط فاعلية Macrophage في تعزيز الاستجابة المناعية ولاحظ وجود علاقة طردية بين نتائج فرط الحساسية ومعامل البلعمة فقد وجد ان هنالك زيادة في هذا العامل وقد يعزى إلى كفاءة اللقاح على تحفيز خلايا البلعمة والذي يؤدي بدورة إلى تحفيز الخلايا التائية لإنتاج الحركيات الخلوية التي تؤدي الى سحب خلايا البلعم الكبير إلى موقع التفاعل وهذا ما اكدته نتائج دراستنا من ارتفاع معامل البلعمة وارتفاع الخلايا التائية وكذلك الزيادة في المحركات الخلوية . كما يجب ان نذكران تحفيز عملية البلعمة وتنشيطها وزيادة تركيز الانزيمات المختلفة يؤدي للقيام بعملية قتل اكثر فعالية ولكنها مؤدية إلى تحطيم موقعي للأنسجة [47][46].

جدول (13) فرط الحساسية العاجل او الارثس بعد (4) ساعات للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد(K)

المجموعة	تفاعل ارثس بعد 4 ساعات المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
K- Antigen	4.383 ± 1.2	a
Control Negative	4.489 ± 0.8	b

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

جدول (14) فرط الحساسية العاجل او الارش بعد (24) ساعات للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K)

قيمة P	فرط الحساسية الاجل بعد(24)ساعة المعدل ± الانحراف المعياري	المجموعة
a	4.383 ± 1.5	K- Antigen
b	4.489 ± 0.8	Control Negative

جدول (15) فرط الحساسية الاجل بعد (48) ساعات للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K)

قيمة P	فرط الحساسية الاجل بعد 48 ساعة المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	المجموعة
a	4.383 ± 36.480	K- Antigen
b	4.489 ± 17.320	Negative Control

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير المستضد K على مستوى البين ابيضاض 10(IL-10)

أوضحت النتائج ارتفاعاً معنوياً بمستوى ($P < 0.05$) لمستوى البين ابيضاض 10(IL-10) للمستضد (K) مقارنة مع السيطرة السالبة حيث ارتفعت بنسبة (18.7,33.5) بيكو غرام / مللتر على التوالي كما في جدول (16) وجاءت هذه النتائج متفقة مع [48][49] حيث ارتفع لديهم مستوى البين ابيضاض 10 في الفئران بعد حقنها بلقاح البكتريا *K .pnemaniae*, كما وتبين النتائج المبينة في الجدول (17) مستويات البين ابيضاض 10 للحيوانات المختبرية بعد تجريعها بالطفيلي, ولوحظ الاستمرار في ارتفاع البين ابيضاض 10 اكثر من السابق بعد التمنيع بفروق معنوية بمستوى ($P < 0.05$) مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث ارتفعت بنسبة (23,48.5) بيكو غرام / مللتر على التوالي وجاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات [50][51][52], كما انها جاءت غير متفقة مع [53] , وقد اكدت الدراسة الحالية والعديد من الدراسات إلى ان مستضدات الطفيلي تعمل على تحفيز انتاج الحركات الخلوية المختلفة (IL-4 TNF-α -IL) INF-γ , 10 التي لها دور في مقاومة الطفيلي كما وجد ان للخلايا البلعمية Macrophages والعدلاتNeutrophil دور دفاعي في حالة الزحار الاميبي حيث يعمل البين ابيضاض 10 (IL-10) على تثبيط انتاج العوامل الالتهابية مثل العامل المميت للأورام من نوع الفا TNF-∝ وبالتالي يؤدي إلى تقليل انتاج اوكسيد النتريك كما اكده[54], وقد وجد [55] في حالة الخمج بطفيلي *E.histolytica* ان بعض الجزيئات الخاصة المسمى LPPG Lipopeptidophosphoglycon والمعروضة على سطح الطور المتغذي للطفيلي يتم تمييزها من قبل مستقبلات خاصة موجوده في المضيف كما ان هذا التداخل الذي يحصل ما بين هذه المستقبلات وجزيئات (LPPG) يؤدي إلى تحرير البين ابيضاض 8 , 10 , 12 والعامل المميت للأورام من نوع الفا (IL - 8 , 10 , 12 , TNF-∝) من قبل الخلايا الوحيدة Monocyte للإنسان واشار[56] ان البين ابيضاض 10 يساهم في مقاومة المضيف من خلال قيامه بالحفاظ على الحاجز الطلائي للأمعاء وان البين ابيضاض 10 يعمل على تحفيز انتاج المادة المخاطية Mucin بوساطة الخلايا الكأسية goblel Cell في الطبقة الظهارية epithelium layer وقد لوحظ في الفئران التي لديها نقص في البين ابيضاض 10 (IL-10) تكون الخلايا الظهارية Epithelium Cells لها غير قادرة على انتاج Mucin الذي يعتبر المركب الاساسي للحد من التصاق الاميبا بالامعاء[57], وقد وجد[54] ان النقص في البين ابيضاض 10 في الفئران المختبرية يؤدي إلى زيادة في قابلية الخمج بالأميبا ويزيد من إمراضية الطفيلي .

جدول (16) مستوى البين ابيضاض 10 (IL-10) للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضدات (K,)

قيمة P	بين ابيضاض 10(IL-10) (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	المجموعة
a	8.89 ± 33.54	K-Antigen
b	3.01 ± 18.72	Negative control

جدول (17) مستوى البين ابيضاض10(IL-10) للحيوانات الممنعة بالمستضد (K) مع طفيلي *E . histolytica*

قيمة P	بين ابيضاض 10(IL-10) (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	المجموعة
a	2.47 ± 48.52	K – E
a	8.33 ± 23.06	Positive control

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير المستضد k على مستوى البين ابيضاض 12 (IL-12)

بينت النتائج المبينه في جدول (18) ارتفاع معنوي بمستوى ($P < 0.05$) للبين ابيضاض 12 (IL-12) للمستضد K , (17.6 37.7) بيكو غرام / مللتر مقارنه بالسيطره السالبه على التوالي وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع [58] حيث بين ان متعدد السكريد

الشحمي LPS لأغلب البكتريا السالبة لكرام يساعد على تحفيز البين ابيضاض 12 (IL-12) حيث ارتفع بوجود LPS المستخلص من بكتريا *Brucella abortus* نتيجة وجود مستقبل CD_{14} على سطح البلاعم Macrophage, كما ويعتبر Lipoproteins المنتج من بكتريا Spitochaetal دورا محفزا للبين ابيضاض 12 من خلال هذه المستقبلات.

اما نتائج تأثير المستضد بعد الخمج بالطفيلي المبين في جدول (19) فنلاحظ ارتفاع مستوى البين ابيضاض 12(IL-12) اعلى من النتائج السابقة الذكر بوجود المستضد وحده حيث ارتفعت نسبة المستضد(K) ارتفاعاً معنويا بمستوى ($p < 0.05$) حيث بلغت نسبته (17.3 , 36.4) بيكو غرام / مللتر وجاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي تؤكد ان الابتدائيات الطفيلية لها دور فعال في تحفيز البلاعم والخلايا الشجيريه لإنتاج البين ابيضاض 12(IL-12)[59], وبالنسبة لطفيلي *Trypanosome cruzi* فإن الطور المتقبي Trypomastigole يحفز البلاعم لإنتاج البين ابيضاض 12 (IL-12) في الفئران وكذلك الحال بالنسبة لطفيلي المقوسات الكونديه *Toxoplsma gondii* [60].

جدول (18) مستوى البين ابيضاض 12(IL-12) للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K)

المجموعة	بين ابيضاض 12 (IL-12) (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري S.D ± M	قيمة P
K-Antigen	4.563 ± 37.740	A
Negative control	2.976 ± 18.620	C

جدول (19) مستوى البين ابيضاض 12(IL-12) للحيوانات الممنعة بالمستضد (k) مع طفيلي *E . histolytica*

المجموعة	بين ابيضاض 12 (IL-12) (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري S.D ± M	قيمة P
K – E	4.383 ± 36.480	A
Positive Control	4.489 ± 17.320	B

الاحرف الانكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير المستضد k على مستوى الانترفيرون كاما ($IFN-\gamma$):

اوضحت النتائج المبينة في جدول (20) ارتفاع مستوى الانترفيرون كاما $IFN-\gamma$ للمستضد (K) معنويا بمستوى ($P < 0.05$) مقارنة مع السيطرة السالبة حيث بلغت نسبته (2.7, 20.3) بيكو غرام / مللتر أما بعد التجريع بالطفيلي نلاحظ في جدول (21) ارتفاع الانترفيرون كاما $IFN-\gamma$ اعلى من السابق وبفروق معنوية بمستوى ($P < 0.05$) حيث ارتفعت نسبته مقارنة مع السيطرة الموجبة (42.6 , 16.4) بيكو غرام / مللتر على التوالي , وقد جاءت هذه النتائج متفقة مع [61] الذي اجرى تجربته خارج جسم الكائن الحي لمعرفة قدرة البلاعم على قتل طفيلي *E . histolytica* من خلال مزيج بين الانترفيرون كاما $IFN-\gamma$ مع جرعة (100) مايكروغرام من السكر المتعدد الدهني LPS المستخلص من بكتريا *Mycobacterium tuberculosis* على البلاعم المنشطة من نخاع العظم للفئران حيث قتلت البلاعم خلال التجربة (24−60%) من الاميبا خلال 6 ساعات, وفي داخل الجسم يعمل كل من انترفيرون بيتا $TNF-\beta$ المنتج من الخلايا التائية T cell وانترفيرون الفا $TNF-\propto$ المنتج من البلاعم وخلايا T على تعزيز فاعلية البلاعم ويعتبر متعدد السكر الدهني LPS مع انترفيرون كاما $IFN-\gamma$ و انترفيرون الفا $TNF-\propto$ ذات تأثير سام غير مباشر على طفيلي الاميبا حيث ان فعالية انترفيرون كاما $IFN-\gamma$ على البلاعم تعزز اشارات إلى انترفيرون الفا $TNF-\propto$ ويعتبر عامل النمو TGF-B هو بداية عمليه التبلعم لإبادة الاميبا, وتستطيع البلاعم من القضاء على الاميبا من خلال اوكسيد النتريك حيث بين[62] فعالية البلاعم في الفئران مع ارتفاع الانتروفيرون كاما $IFN-\gamma$ بالاضافة إلى المعاملة بمتعدد السكريد الشحمي LPS حيث اعطت نتائج عالية من انتاج اوكسيد النتريك مع انخفاض الفعالية الاميبية بنسبة 26−97% , وتوجد الكثير من الدراسات لتي تشير الى دور انترفيرون كاما $IFN-\gamma$ في القضاء على الطفيليات وعلى طفيلي الاميبا بالخصوص حيث ان ارتفاع انترفيرون كاما $IFN-\gamma$ يوفر حماية ضد الاميبا من خلال تحفيز البلاعم Macrophage وخاصه العدلة Neutrophils داخل الجسم ولا يستطيع الانترفيرون كاما $IFN-\gamma$ ان يحقق هذا بدون مساعدة أو تعزيز مناعي حيث بين [63] ان ارتفاع الانترفيرون الفا $TNF-\propto$ مع كاما $IFN-\gamma$ مع البين ابيضاض2 (IL-2) المنتج من خلايا T , CD_4 كلها متناسقة العمل ضد الاميبا وتكون ذات فعل تأزري لقتل ناشطات الاميبا, كما تتفق دراستنا مع [64] حيث اعتبر الانترفيرون كاما $IFN-\gamma$ هو الخطوة الاولى لصناعة لقاح ضد الاميبا حيث ارتفع عنده انترفيرون كاما $IFN-\gamma$ وسايتوكينات Th_2 والبين ابيضاض2 (IL-2) وعامل تنخر الاورام الفا $TNF-\propto$ كما استطاع من توفير الحماية ضد الاميبا, وجاءت دراستنا متفقة ايضا مع [64] الذي استخدم الانترفيرون كاما $IFN-\gamma$ و البين ابيضاض12 (IL-12) والبين ابيضاض10 (IL-10) لصنع لقاح للإنسان ضد طفيلي *E. histolytica* وهناك الكثير من الدراسات التي تدل على استخدام الانترفيرون كاما $IFN-\gamma$ كلقاح بمساعدة العديد من السايتوكينات

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

المنتجة من Th_1, حيث ان Th_1 تحفز وتعزز اللقاحات مثل IL-12 الذي تم استخدامه كلقاح ضد طفيلي *Leishmania major* [65]الملاريا [66] والمقوسات الكونديه *Toxoplsma gondii* [67].

جدول (20) مستوى الانتروفيرون كاما IFN – γ للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K)

المجموعة	انترفيرون كاما IFN – γ (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري S.D ± M	قيمة P
K–Antigen	6.078 ± 32.720	a
Negative control	7.886 ± 20.360	b

جدول (21) مستوى الانتروفيرون كاما IFN – γ للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K) مع طفيلي *E . histolytica*

المجموعة	انترفيرون كاما IFN – γ (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري S.D ± M	قيمة P
K – E	3.473 ± 42.600	a
Positive Control	3.827 ± 16.400	b

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

تأثير المستضد K على مستوى الكلوبيولينات المناعية IgG و IgM .

اظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً بمستوى ($p < 0.05$) للمستضد (K) ولكلا الكلوبيولين المناعيين IgG,IgM حيث يبين الجدول (22) مستوى الكلوبين المناعي IgG والجدول (23) مستوى الكلوبين المناعي IgM . وبلغت نسبة الكلوبين المناعي IgG لمجموعة المستضد (K) مع وجود الطفيلي مقارنة مع السيطرة الموجبة (2.2, 3.5) مليغرام/ديسيلتر على التوالي أما الكلوبين المناعي IgM فقد بلغت نسبته للمستضد (K) مقارنة مع السيطرة الموجبة هي (1.2, 4.8) مليغرام/ديسيلتر وهذه النتائج جاءت متوافقة مع العديد من الدراسات التي تشير إلى ارتفاع الاجسام المضادة IgM,IgG في مصول المصابين بالطفيلي حيث ان الامراضية التي يحدثها الطفيلي تقود إلى استجابة مناعية متمثلة بإنتاج الاجسام المضادة [68] حيث اتفقت ايضا مع [69][70] حيث ارتفعت مستوى الاجسام المضادة في الحيوانات المصابة تجريبياً بالطفيلي ولكن لم يكن معنوياً وكذلك مع [71] حيث وجد الزيادة الحاصلة في IgM اعلى من الزيادة الحاصلة في IgG وكذلك مع [72] حيث ارتفع IgM ,IgG في الاشخاص المخمجين بالطفيلي وتتفق ايضا مع [73] حيث لاحظ ارتفاع IgG عند حقن جسم الارانب بكميات كبيرة من طفيلي *E histolytica* حيث اشار إلى ان IgG من اكثر الاضداد الموجودة في المصل حيث تؤدي دوراً كبيراً في النظام المناعي وذلك من خلال قيامها بمعادلة السموم ونظراً لبقائها فترة طويلة في الدم فهي قادرة على حماية المضيف من حالات تكرار الخمج بالطفيلي, في حين كانت النتائج غير متوافقة مع [74]) حيث انخفضت الاجسام المضادة في الحيوانات المجرعة تجريبيا. ويعزى السبب في ارتفاع مستوى الكلوبيولينات المناعية بعد التعرض للمستضد (K) هو ان المستضد يعتبر ذيفانات خارجي يعزز تكوين الضد وعندما يتم التجريع بالطفيلي فانه يعتبر مستضد اخر دخل الجسم فيحدث فعالية التحفيز المناعي العام والذي يشاهد على شكل مقاومة غير متخصصة تجاه الخمج وذلك من خلال عمله على تحفيزه الخلايا البائية على الانقسام بعدها تبدأ خلايا B بالتضخم وبالانقسام المتكرر وتمايز الخلايا الناتجة عنها إلى خلايا البلازما Plasma Cells والتي تستجيب بتحرير كميات كبيرة من الضد ونوع اخر من الخلايا هي خلايا الذاكرة [75] كما يعزى السبب في ذلك إلى تزامن الاستجابة المناعية الخلوية من خلال الزيادة في اعداد الارومات اللمفية مع الانتاج العالي للخلايا البلازمية التي تعمل على تكوين الاضداد التي تهاجم الطفيلي فلا يتمكن الطفيلي المرتبط مع الضد والمتمم من مقاومة الخلايا البلعمية اذ تقضي عليه وهذا ما اكدته نتائجنا من ارتفاع معامل البلعمة عند وجود الطفيلي.

جدول (22) مستوى الكلوبين المناعي IgG للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (k) مع طفيلي *E . histolytica*

المجموعة	مستوى الكلوبين IgG(mg/dl) المعدل ± الانحراف المعياري S.D ± M	قيمة P
K – E	0.482 ± 3.5400	a
Positive Control	0.433 ± 2.2400	b

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

جدول (23) مستوى الكلوبين المناعي **IgM** للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (K) مع طفيلي ***E . histolytica***

قيمة P	مستوى الكلوبين Igm (mg/dl) المعدل ± الانحراف المعياري S . D ± M	المجموعة
a	0.367 ± 4.800	K – E
b	0.308 ± 1.20	Positive Control

الاحرف الانكليزية المتشابه دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p < 0.05$ مقارنة بين المجاميع

المصادر

1-Tan, Z.N.; Wong, W.K.; Nik Zairi, Z.; Abdullah, B.; Rahmah, N.; Zeehaida, M.; Rumaizi, S.; Lalitha, P.; Tan, G.C.; Olivos-Garcia, A. and Lim, B.H. (2010). Identification of *Entamoeba histolytica* trophozoites in fresh stool sample: comparison of three staining techniques and study on the viability period of the trophozoites. Tropical Biomedicine. 27(1): 79–88

2-Choi, M. H., Sajed, D., Poole, L., *et al* . (2005). An usual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attak. Mol. Bio. 10;9689-9699

3- Fotedar, R.; Stark, D.; Beebe, N.; Marriott, D.; Ellis, J. and Harkness, J. (2007). Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin. Microbiol. Rev., 20(3): 511-532.

4-Belloni, A.; Aubert, D.; Gomez-Marin, J; E; Le Naour R.; Bohnomme A.; Guenounou M. and Pinon J. M. (2000). Involvement of tumor necrosis factor-α during infection of human monocytic cells by *Toxoplasma gondii* . Parasitol. Res., 86 : 406 – 412

5- Johanson, K. G. and perry, M. B. (1976). Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. can. J. Microbiol. 22: 29-34 .

6-John, D. T. & Petri, J. W. A. (2006). Medical Parasitology. q[th ed] . Saunders Elsevier.

7-Myers, R. L. (1995). Immunology A Laborotry Manual ,2nd Edition. Wm. C. Brown publishers. page 83

8- Allen, J. W.; Shuller, C. F.; Mendes, R. W.; and Lah, S. A .(1977) Asimplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchange using 5 - bromodeoxy - uridine tablets. Cytogent. cell. Genet. 18: 231 - 237.

9-Hudson, L. and Hay. F. C. (1980). Practical Immunology. 3[th]ed Black well Scientific Publication, Oxford London.

10-السعدي ، حسن علي حسين. (2005). دراسة بكتيرية ومناعية للانزيم الحال للبروتين نوع – أ – المستخلص من بكتريا *Proteus Mirabilis* المعزولة من خمج السل البولية. أطروحة دكتوراة ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.

11-Atlas, R.M. (1995). Principles of Microbiology. 1st ed. Mosby-Year Book, USA.

12- Taylor, W. H; and Juni, E. (1961). Pathwaya for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide. J. Bacteriol. 81: 688 - 693 .

13- الخفاجي , سيناء مهدي شاكر (2006). دراسة عن كبسولة بكتريا *Acinetobacter baumannii* وتأثيرها على الاستجابة المناعية . اطروحة دكتوراة, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية

14-Plummer, D. T. (1978). An introduction to practical biochemistry. 2nd ed. McGrrow. Hill book Company. U. K England.

15-Dubois, M.; Gilles, K. L.; Hamilton, H. K.; Roberts, P. A.; and Sman, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substance. Anal . Chem . 28 : 350 - 356 .

16-Singh, A.; Ericttouft, B.H. and William, A.C. (2009). Rapid diagnosis of intestinal parasitic protozoa. J. Infect. Dis.,61(3): 280-286.

17-Clark , C. G and Diamond, L. S. (2002). Methods of Cultivation of huminal parasitic protists of Clinical importance. Clin . Microbiol . Rev., 15 (2): 329 - 341.

18-Griffiths, E.; Stevenson, P.; Thorpe, R. and Chart, H. (1985). Naturally occuring antibodies in human sera that react with the iron - regulated outer membrane protein of *Echerichia Coli*, Infect. IMMUN. 47 (3): 808-813.

19-Tomas, J. M.; Benedi, V. J.; Ciurana, B and Jofre, J. (1986). Role of Capsule and O Antigen in Resistance of *klebsiella pneumonia* to serum Bactericidal activity. Infect. Immun. , 54 (1): 85 - 89 .

20-Cech, P. and. Lahrer, R. I. (1984). Heterogenicity of Human Neutrophil Phagolysosomes: Functional Consequences for Candidacidal Activity, Blood , 64 : 147 – 151.

21- Boyum, A. (1968). Isolation on mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab . Invest . 21 : 77 – 89-

22-Nonoyama, S.; Kojo, H.; Mine, Y. Nishida, M.; Goto, S. and Kuwahara, S. (1979). Inhibitory effect of *pseudomonas aeruginosa* on the pheagocytic and killing of Rabbit polymorphonuclear leukocytes: Mechanism of action of a Polymorphonuclear leukocytes inhibitor, Infect . Immun. 24: 399 – 403

23- Mendes, N. E.; Tolnal, M. E. A.; Silveira, N. P,; Gillbertsew, R. B.; and Metz Gar, R. S. (1973). Technical aspects of the rosette lest used to detect human complement receptors (B) and Sheep erythrocyte binding (T) Lymphocytes. J. Immunol. 111: 861 – 867.

24-Cryz , S . J.; Furer, E . and Germanier , R . (1985). Safety and immunogenicity of *Klebsiella pneumonia* K1 Capsular Polysaccharide vaccine in human , J . Infect . Dis. 151: 665 – 671.

25-Black wood, L. I. and Rowe, J. I. (1987). Suppression of delayed type hypersensitivity and cell -Mediated immune responses to *Listerria monocytogenes* induced by *Pseudomonas aeruginosa* . Infect . Immune , 55: 639 - 644 .

26-Dubois, M.; Gilles, K. L.; Hamilton, H. K.; Roberts, P. A .; and Sman, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substance . Anal . Chem . 28 : 350 – 356.

27-Al-Kabi , S. J. M.(2006). A study Of The Effect Of Some Antigens Of *Klebsiella pneumoniae* On The Immune Response. Ph.D. Thesis. Al- Mustansiriya University.(in Arabic).

28-Macatonia, S.E.; Hosken, N.A.; Litton, M. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. J . Immun154:5071–5079.

29-يوسف، سهيله يعقوب. (2005).الاستجابة المناعية في الجرذ النرويجي *Rattus rattus norvegicus* ضد الاصابة بداء الجيارديا باستخدام السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Escherichia coli* . رسالة ماجستير , كلية التربية, جامعة الموصل.

30-Ali, A.A. and Abdulla I.T. (2004). Specific and non-specific cellular Immunity in BALB/C mice against infection with hydatid disease by the polysaccharide extracted from Pseudomonas aeruginosa III Delayed type hypersensitivity and phagocytosis. Riv. Parasitol., XX (LXIV),1:17-24

31- Moonah, S.N.; Jiang, N.M.; Petri ,W.A.(2013). Host immune response to intestinal amebiasis. PLoS Pathog. 9:e1003489. 10.1371/journal.ppat.1003489.

32-Serbina, N.V.; Salazar-Mather, T.P.; Biron, C.A.; Kuziel, W.A. and Pamer, E.G.(2003). producing dendritic cells mediated innate immune defence TNF/iNOs - against bacterial infection. Immun. 19 :59-70

33- Weir, D.M. (1973). Handbook of Experimental Immunology Vol. 2: Cellular immunol. pp: 2712-2718. Black well Scientific Publication. Oxford

34-Root, S. and Strauch, M. (1959). Immune hisological diagnosis of Listeriosis. J. Pathol. 17: 227-233.

35-Conklins, A.R. and siddique, I.H. (1976). Certain chemical and Biological Properties of phenol extracts from Listeria monocytogenes. Am. J. Vet. Res. 37: 1331-1336.

36- Campbell, P.A.; Schuffler, C. and Rodriguez, G.C. (1976). Listeria cell wall fraction: AB cell adjuvant. J. Immunol. 116: 590-594.

37- Nakne, A.; Minagawa, T.; Kohanawa, M. and Moriyan, M. (2005). Interactions between endogenous gamma interferan and tumor necrotic factor in host resistance against Primry and Secondary Listeria monocytogenes infections 73: 3331 - 3337.

38- Bellani, J.A. (1985). Immunology 3ed W.B. Saunders Company. philadelphia, Lendon, Toranto, Mexico city, Riodejaneiro ,sydnuy ,Tokyo .

39-Levinson, W. and Jawetz, E. (2000). Medical microbiology and immunology 6 th ed. Lange medical Books / Mc Grow Hill Medical Publishing Division. U.S.A

40- عيسى، رجوه حسن ؛فرحان، عباس عبود ؛المظفر، سامي مهدي. (2007). دراسة تاثير الالجنيت المنقى من بكتريا الزوائف الزنجاريه على الاستجابة المناعية. مجله الفتح العدد الثلاثون

41-Knupp, C.; Pekala, I.H. and Cornelius, P. (1988).Extrensive bone marrow necrosis in patients with cancer and tumor necrosis factor activity in plasma. Am. J. Hematol., 29:20-25

42- Ryu, H. and Kim, C. (2000). Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. J. Vet. Sci., 1(2): 87 – 95.

43-Salas - tellez, E.; Nunez - delArco, A.; Tenorio, V; Diaz, E.; delaraza, M. and Suarez-Guemes, F. (2005). Subcellular fraction of Brucella ovis distinction induce the production of interleukin -2,interleukin-4,and interferon–Y in mice, Can. J.Vet. Res. 69(1):53-57

44-Ali, A.A. and Abdulla, I.T. (2003). Immunomodulation in BALB/c mice against infection with hydatid disease by the lipopolysaccharide extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. II. Blood picture, Riv. Parassitol., XX (LXIV) -1 : 11 – 16.

45-Ali, A.A. and Abdulla I.T. (2004).Specific and non-specific cellular Immunity in BALB/C mice against infection with hydatid disease by the polysaccharide extracted from *Pseudomonas aeruginosa* III Delayed type hypersensitivity and phagocytosis. Riv. Parasitol., XX (LXIV),1:17-24.

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

47-Klugman KP, Kenyon, T.A.; Rumisha, D.; Huebner,. (1987). Protective Activity of Vi-capsular polysaccharide vaccine Aginsat typhoid fever. The Lancet. Vol:1165-1169.

48-Moore, T.A., perry, M.L., Getsoian, A.G.,. Newstead, M,W., Standifor, T.J .(2002). Divergent Role of Gamma Interferon in a Murine Model of Pulmonary versus Systemic *Klebsiella pneumoniae* Infection Infect. Immun. vol. 70 no. 116310-631.
49-Yoshida, k.; Matsumoto, T.; Tateda, K.; Uchida, K.;Tsujimoto, S.; Yamaguchi, K.(2001). Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. J Med Microbiol. 50(5): 456 - 61.
50–انور , شيلان اكبر. (2014) .دراسة وبائية مناعية للخمج بطفيلي *E. histolytica / E. dispar* بين الاطفال المراجعين لمستشفى الأطفال في كركوك مع محاولة علاجية باستخدام Deferoxamine والزنك كعلاج بديل للزحار الأميبي. اطروحة دكتوراه, كلية التربية, جامعة تكريت
51–الخزعلي , رغد خويطر مايح .(2014) . دراسة لمستوى البين ابيضاض 17, عامل التنخر الورمي – الفا والبين ابيضاض10 وبعض التغيرات الدموية للمرضى المصابين بالاميبا الحالة للنسج *Entamoeba histolytica*. رسالة ماجستير كلية العلوم للبنات, جامعة بغداد
52-Isabel, W.; Marcela, A.; Ismael, M.; Itzmel, R.; Lourdes, A.; Eduardo, F.; Constantino, L.; and Armando, I. (2010). The Role of Lipopeptido phosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica* Biomed & Biotechnol, Articale ID 254521, Page,12 .
53-Garcia, Z.; Rojas, L.; Esquivel, V.; and Ostoa, S. (2007). Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/ chemokine network in amoebiasis. Parasite Immunol. Articale Dol : 10: 136-148
54- Moonah, S.N.; Jiang, N.M.; Petri, W.A. (2013). Host immune response to intestinal amebiasis. PLoS Pathog. 9: e1003489. 10.1371/journal.ppat.1003489
55- Maldonado - Bernal C., Kirschning C.J., Rosenstein Y., Rocha L.M., Rios-Sarabia N., Espinosa- Cantellano M., Becker I., Estrada I,, Salazar-González R.M., López - Macías C., Wagner H., Sánchez J., Isibasi A. (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. Parasite Immun. ;27(4): 127-37.
56-Kyou-Nam C., Stephen M., and Eric R. (2010). The NF-κB p50 Subunit Is Protective during Intestinal *Entamoeba histolytica* Infection of 129 and C57BL/6 Mice. Infect. Immun.;78(4): 1475-1481.
57-Shinjiro, H.; Amon, A.; Suzanne, E.; Thomas, A.; Edward, H.; and Eric, H. (2006).Resistance of C57BL/6 mice to Amoebiasis is Mediated by nonhemopoietic cell but requires hemopoietic IL-10 production. American Association of Immunologists, 177: 1208-1213
58- DeKruyff, R.H., Gieni R.S., and Umetsu, D.T. (1997). Antigen-drivenbutnot lipopolysaccharide - drivenIL-12 productionin macrophage srequires triggering of CD40.J. lmmunol. 158:359-366.
59-Gazzinelli, R.T., Camargo, M.M., AlmeidaI.E., Morita Y.S., Giralda M., Acosta Serranom, A., Hieny S., Englund, P.T., Ferguson, A.J., ravassos, L.R., and Sher, A.(1997).identification and characterization of protozoan productsthat trigger the synthesisof1L-12 by inflammmatory. macrophages Chem.lmmunol. 68:136-152 .
60- Camargo, M.M., Almeida I. E., Pereira M.E.S., Ferguson M. A.j., Travassos L.R., and Gazzinelli R.T. (1997). Glycophosphatidylinositol. – anchoredmucin - like glycoproteinsisolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the of proinflammatory cytokines by macrophages. J. Immunol. 158:5890-5901.
61- Ghadirian E., and Salimi, A.(1993).In vitro effect of recombinant interferon gamma in combination with LPS on amoebicidal activity of mutine Kupffer cells *Immunobiol.* 188: 203-219.
62- Denis M.,and Chadee K. (1989). Cytokine activation of murine macrophages for in Vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infèct. Immun. 57:1750-1756.
63- Haque, R.; Mondal, D.; Shu, J.; Roy, S.; Kabir, M.; Davis, A.N.; Duggal, P.; Wilium, A. PETRI, J.R. (2007). Corrlation of interferon –γ production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. Am J Trop Med Hyg vol. 76 no. 2 340-344.
64-Guo, X., Stroup, S. E., and Houpt, E. R.(2008). Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN-γ. Mucos. Immunol. 1:139-146
65- Kenney, R. T., D. L. Sacks, J. P. Sypek, L. Vilela, A. A. Gam, and K. Evans-Davis. (1999). Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. J. Immunol. 163:4481-4488.
66-Su, Z.; Tam, M. F.; Jankovic, D.; and Stevenson. M. M. (2003). Vaccination with novel immunostimulatory adjuvants against blood-stage malaria in mice. Infect. Immun. 71:5178-5187
67-Cuppari, A. F., V. Sanchez, B. Ledesma, F. M. Frank, A. Goldman, S. O. Angel, and V. Martin. (2008). *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. Vaccine 26:5040-5045.
68- Stewart, J. (2002). Parasitic Infections Pathogenesis and Immunity In: Medical Microbiology, by: Greenwood, David; Richard C. B. Slack and John F. Peutherer, 17th edn., Printedin China by RDC Group Limited:154-160.
69-Wright, R.L.; Seaner, R.M.; Keepers, T.R.; Wilkins, L.A. and Petri, W.A. (2002). The mouse model of amoebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4 T-cells. J. Immunol., 169(15):440-450.

70-Jarillo-Luna, R.A.; Campos - Rodriguez, R. and Tsutsumi, V. (2002). *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse, neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. Exp. Parasitol., 101(13):40-56.

71- Ximénez, C.; Hernández, J.; Melendro, E.; and Ramíro, M. (1990). Fecal and serum anti-amebic antibodies in acute intestinal amebiasis. Arch. Invest. Med (Mex). ;21 (1):239-44.

72-AL-khushali M.N. (2012). Toxoplasmosis in Relation to *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Infection. D. J. M ; 2(1):38-45

73-Abioye, A.A., Lewis, E. A., and Mcfarlane, H. (1972). Clinical Evaluation of Serum Immunoglobulins in Amoebiasis. Immunolo. ;23: 937 - 946.

74-Costa ,C.AX., Nunes, A. C Ferreira, J. A., Gomes, M.A., Caliari, M.V.(2010). *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement . Published online 3: 23.

75- Levinson, W. and Jawetz, E. (2000). Medical microbiology and immunology 6 th ed. Lange medical Books / Mc Grow Hill Medical Publishing Division. U.S.A

Stady of Effect of *Klebsiella pneumonia* K- *a ntigen* as a immune catalyzer for laboratory rabbits infected with *Entamoeba histolytica*

Osama N. Negres , Ohood M Shakir
College of Applied Science , University of Samarra , Samarra , Iraq

Abstract

Conducted this study for the duration from the December 2013 until November 2014. and our study have included extrated capsular polysaccharide (K-Antigen) from *Klepsiella pneumoniae* and study chireffection the immune response in Neusland albino rabbits(male) infected whith *Entamoeba histolytica* that cause amoebic dysentery disease depending on several criteria, including study the changes in variables cytokineetics concentration levels that response on phagocytosis and antigen presenting proscess like INF-Y, IL-10 and IL-12 and phagocytosis coefficienit, and B T cells PMNs and lymphocytes cell life span, the T and B rossite formation test the miotic index factor for bone marrow cell Arthus reaction, dilayed hypersensitivity, measure the humoral immune response that responsting by immunoglobulins like IgG, IgM using ELISA Technic.

And The current study accessed to elevated all immuniyy indicator after immunization with (k) antigen and also continue in elavation after the infection with parasite,and we indicated from this study the possibility to use the capsular polysacchride (k antigen) that extracted from *Klebsiella pneumoniae* as immunological modificicatory that can stimulate both innate (natural)and acquiredimmunity agnest amoebic dysentery infection in white rabbite.