دراسة متعدد السكريد المحفظي المستخلص من بكتريا *Klebsiella planticola* على بعض وظائف الخلايا PMNs

اسامة باسم عبد الخالق الصفار

كلية مدينة العلم الجامعة – قسم علوم الحياة

الكاظمية – بغداد – العراق

O2004B2005@yahoo.com

المستخلص

اخذت ٤ عزلات من *K. Planticola* من المراكز البحثية، تم اعادة تشخيص البكتريا اعتماداً على الخصائص الزرعية والكيميائية الحيوية، اختيرت العزلة Kp4 لاستعمالها في بقية التجارب اللاحقة وذلك لكفاءتها في إنتاج حامض الكالكتويورونك Galacturonic acid وبتركيز (٢٩) مايكروغرام/مل كدليل الإنتاج الفائض من متعدد السكريد المحفظي ، وإعطائها صفات تشخيصية كيميائية حيوية نموذجية وثبات هذه الصفات طيلة فترة البحث. تم استخلاص وتنقية متعدد السكريد المحفظي Capsular Polysaccharides CPS باستخدم وسط (Brain heart Infusion broth) مضاف اليه الخميرة وسكر المالتوز لغرض الإنتاج، تم استخلاص CPS باستخدام (Cetavlon) وتنقيته بالكحولات ،وقدر تركيزه بعد تنقيته اذ بلغ (167) مايكروغرام/مل. شمل تأثير مستضد متعدد السكريد المحفظي المنقى CPS بالتراكيز (50,20,10,5) مايكروغرام/مـل المعزولة من بكتريا (Kp4) *K. planticola* على الاستجابة المناعية لتحقيق ذلك أجريت الاختبارات المناعية آلاتية على خلايا الدم المحيطي للإنسان في الزجاج (in vitro): قابلية النمو (Viability) للخلايا البلعمية متعددة اشكال النوى (PMNs)، وبلعمة (Phagocytosis) خميرة *Candida albicans* وهجرة (Migration) الخلايا متعددة اشكال النوى تحت الاكاروز أمكن الحصول على النتائج آلاتية: أدت تراكيز CPS (50,20) مايكروغرام/مل إلى انخفاض في كل من النسبة المئوية قابلية النمو الخلايا (PMNs) ومعامل البلعمة وكان هذا التأثير معنويا بمستوى ($p<0.05$) مقارنة مع معاملة السيطرة، أما التركيز (٥٠) مايكروغرام/مل فقد استطاع ان يثبط هجرة الخلايا (PMNs). أدت تراكيز CPS (10,5) مايكروغرام/مل إلى زيادة معامل البلعمة معنويا بمستوى ($p<0.05$) مقارنة مع معاملة السيطرة.

المقدمة

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

تتصف بكتريا *K. Planticola* بامتلاكها محفظة سميكة يبلغ سمكها ١٦٠ نانوميتر مؤلفة من معقد لسكريات متعددة حامضية لاحتوائها على حامض الكالكتويورونك (Galacturonic acid) والذي يؤدي دورا مهما في تثبيت التركيب الغشائية للبكتريا (11).

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

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

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

المواد وطرائق العمل

الصفات المظهرية:

تم الحصول على ٤ عزلات جاهزة ومشخصة من قبل المراكز البحثية في جامعة النهرين وجامعة بغداد. ولتاكد تم اعادة الاختبارت التشخيصية حيث زرعت العينات على الأوساط الزرعية أكار الدم Blood Agar و أكار الماكونكي MacConky Agar ثم حضنت بحرارة (٣٧)° م لمدة (٢٤) ساعة للحصول على المستعمرات ، نقلت ونقيت المستعمرات وتمَّ

تنقيتها إلى مستعمرات منفردة وشخصت حسب الطرائق المعتمدة من قبل Macfaddin (١٨).

التصبيغ بملون غرام Gram stain:

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

الاختبارات الكيميائية الحيوية

Biochemical Tests:

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

- Indole Test
- MR-VP Test
- Simmon Citrate
- Urease Test
- Triple Sugar Iron Agar
- Malonate
- Catalase Test
- Oxidase Test

التحري عن وجود المحفظة باستعمال التصبيغ السالب Negative staining:

اتبعت طريقة المسحة الرطبة بوضع قطرة من الحبر الهندي على شريحة زجاجية نظيفة ونقلت مستعمرة فتية بعمر (١٨ – ٢٤) ساعة ومزجت مع الحبر مزجا جيدا ثم وضع غطاء الشريحة وسحبت لتكوين مسحة وبعثرة تكتلات الخلايا . فحصت بالعدسة الزيتية ، دل وجود الهالة الشفافة غير المصبغة بالحبر على وجود المحفظة (6) .

التحري عن متعدد السكريد المحفظي كمياً

أجريت الطريقة حسب ما جاء في Bitter and Muir (1962). حيث نميت العزلات في وسط Tryptic Soya broth. وطردت مركزيا وأضيف إلى الراسب PBS واجريت عملية الطرد المركزي مرة اخرى وأضيف إلى الراسب PBS وطردت مركزياً. وأخذ ١ مل من الراشح واضيف حامض الكبريتيك المركز اليه وبعد حمام مغلي لمدة ٥ دقائق. برد المزيج وأضيف إليه مادة Carbazole إذ تحول لون المزيج الى الوردي، يترك المزيج ساعتين. ثم قرأت الامتصاصية على طول موجي (٥٣٠) نانوميتر.حضر في الوقت نفسه منحنى قياسي باستعمال حامض الكالكتويورونك Galacturonic acid بتراكيز (٦٠، ٥٠، ٤٠، ٣٠، ٢٠، ١٠) مايكروغرام/مل، ويمثل الشكل (١) المنحنى القياسي لتقدير تركيز الحامض واعتمد في حساب تراكيز حامض الكالكتويورونك للعزلات المنتجة من خلال المنحنى القياسي.

اختيار العزلة الكفوءة المنتجة لمتعدد السكريد المحفظي: أجريت الطريقة وفقا لما جاء في Cryz *et al.*, (1985) حيث نميت العزلة الكفوءة في وسط إنتاج متعدد السكريد المحفظي بإضافة الخميرة و سكر المالتوز Maltose إلى وسط Brain heart infusion (BHI) السائل وبعدها نقل المزروع البكتيري إلى دورق وحضن

الدورق بالحاضنة الهزازة. نقل المزروع إلى أنابيب طرد مركزي وأزيلت الخلايا وجمع الراسب وحفظ بحرارة (- ٢٠)° م لحين استعماله. جمع الراشح وعقم بالترشيح، أضيف السيتافلون إلى الراشح، ثم ترك المزيج في دورق على جهاز Magnetic Starrier. أعيدت عملية الطرد المركزي، ثم جمع الراسب وأذيب بمحلول $CaCl_2$. أضيف الكحول الاثيلي إلى المحلول السابق. وترك على Magnetic Starrier لكي يتم فصل الأحماض النووية الموجودة مع العالق. رسبت الأحماض النووية بالكحول بوساطة الطرد المركزي. رسب متعدد السكريد المحفظي بزيادة تركيز الكحول الاثيلي ثم طرد مركزيا. جمع الراسب وأذيب بالماء المقطر المعقم تمت التنقية باستعمال قمع الفصل لثلاث مرات وبحجم مساوٍ من محلول الفصل جمعت الأطوار المائية وأجريت لها عملية الفرز الغشائي Dialysis . ورسب متعدد السكريد المحفظي النقي باستعمال الايثانول وجمع الراسب بالطرد المركزي. أجريت عملية الفرز الغشائي مرة أخرى وعقم متعدد السكريد المحفظي النقي Purified CPS بمرشحات وحفظ في أنابيب معقمة بالمجمدة (-٢٠)°م.

عزل الخلايا البلعمية متعددة اشكل النواة:

عزل الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى Polymorphonuclear cells (PMNs) من الدم المحيطي للانسان بعد سحب الدم منه. وعزلت خلايا (PMNs) تبعا لطريقة Cech and Lehrer (1984)، بعدها مزجت محتويات الأنبوبة بلطف ووضعت في الحاضنة لمدة (٤٥) دقيقة. البكتيرية من المزروع بالطرد المركزي

لوحظ تكون طبقتين السفلى تحوي خلايا الدم الحمر والعليا تحوي البلازما الغنية بخلايا الدم البيض ، نقلت إلى إنبوبة أخرى معقمة وغسلت الخلايا بمحلول هانكس HBSS لعدة مرات.علقت الخلايا بالوسط الزرعي النسيجي RPMI – 1640 . وحسبت الخلايا اعتماداً على طريقة Hudson and Hay (١٥)، باستخدام صبغة التريبان الزرقاء وساطة شريحة عدّ خلايا الدم Haemocytometer تحت المجهر الضوئي اذ عدت الخلايا المصبوغة ميتة أما الخلايا التي لم تأخذ الصبغة فهي على الاغلب خلايا حيّة .

تأثيرمتعدد السكريد المحفظي المنقى على قابلية النموالخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs).

اتبعت طريقة Nonoyama *et al.,* (1979) حيث حضر عالق الخلايا البيض متعددة أشكال النوى (PMNs) في وسط RPMI – 1640. حضرت تراكيز نهائية من متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى هي (٥، ١٠، ٢٠، ٥٠، ١٠٠) مايكروغرام / مل في الوسط RPMI – 1640 في أنابيب بلاستيكية معقمة. أضيف ٠.٥ مل عالق الخلايا (PMNs) من كل تركيز من تراكيز CPS في أنابيب معقمة مع ترك إنبوبة بالتركيز صفر لكل من المستضدين كمعاملة سيطرة. حضنت الأنابيب لمدة ساعة واحدة. ثم حسبت (٢٠٠) خلية لأستخراج النسبة المئوية قابلية النمو الخلايا بإستعمال صبغة التريبان الزرقاء باعتبار الخلايا المصبوغة ميتة

وباستخدام القانون الآتي (١٩):

عدد الخلايا الحية

النسبة المئوية لقابلية النمو الخلايا البلعمية= ---------- × ١٠٠

العدد الكلي

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

اعتمدت طريقة Cech and Lehrer (1984) حيث حضر عالق الخلايا البلعمية متعددة اشكال النوى (PMNs)، كما حضر عالق الخميرة بتركيز (٨×١٠^{٦}) خلية/ مل. وحضرت تراكيز من متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى (٥، ١٠، ٢٠ ،٥٠)مايكروغرام/مل. وحضرت إنبوبتا سيطرة بتركيز صفر، وأضيف عالق PMNs والخميرة بنسبة (٤:١) على التوالي. واضيف (٠.٢٥ مل) مصل الدم ووضعت في حمام مائي هزاز للفترات الزمنية (٣٠، ٦٠، ٩٠، ١٢٠) دقيقة. بانتهاء كل فترة زمنية حضرت مسحات من كل تركيز على شرائح زجاجية نظيفة. تركت لتجف ثم ثبتت بالكحول المثيلي وصبغت بصبغة Giemsa ،

فحصت بالعدسة الزيتية وعُدَّت (٢٠٠) خلية لحساب معامل البلعمة Phagocytic Index (PI) وكالاتي 5)

عدد الخلايا البلعمية الملتهمة

معامل البلعمة PI = ---------- × ١٠٠

عدد الخلايا الكلي

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

أجريت على وفق ما جاء في Nonoyama *et al.,* (1979) حضر متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى بالتراكيز (٥، ١٠، ٢٠، ٥٠) مايكروغرام/مل في وسط RPMI – 1640 ثم أضيفت محتويات الأنبوبة إلى وسط الهجرة في أطباق. أضيف محلول PBS إلى وسط الهجرة واعتبر سيطرة سالبة. أضيف ١ مل من (Phytohemagglutinin PHA) بتركيز (١٠) مايكروغرام/مل إلى وسط الهجرة واعتبر سيطرة موجبة. بردت الأطباق بحرارة (٤)^{o} م ، ثم ثقبت طبقة الاكاروز وضع عالق الخلايا PMNs في كل حفرة معمولة في أطباق السيطرة السالبة والموجبة ، حضنت في غاز CO_2 لمدة (24) ساعة.

بعد انتهاء مدة الحضن ثبتت الخلايا باستعمال الكحول المثيلي ثم أزيلت طبقة الاكاروز وأهملت. صبغت الأطباق بصبغة Giemsa لمدة (٢٠) دقيقة. فحصت الأطباق تحت المجهر الضوئي، لحساب المسافة التي تحركتها الخلايا .

قدَّر قطر دائرة الهجرة ثم استخرج عامل تثبيط الهجرة Migration Inhibition Factor (MIF) وفقا لطريقة (Federlin *et al*,.1971) وحسب القانون الاتي (١٠) :

$$\text{عامل تثبيط الهجرة (MIF)} = \frac{\text{قطر دائرة الهجرة (ملم) في معاملة الاختبار}}{\text{قطر دائرة الهجرة (ملم) في معاملة السيطرة}}$$

التحليل الإحصائي .

حللت النتائج إحصائيا باستخدام اختبار تحليل التباين باتجاه واحد Anova one way كما أستخدم اقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) للبحث عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة وعلى مستوى معنوية (٠.٠٥) وثبتت النتائج بشكل (المعدل الحسابي + الانحراف المعياري).

النتائج والمناقشة

الصفات الزرعية والفحص المجهري:

أظهرت نتائج المبينة في جدول ١ الزرع ان مستعمرات بكتريا *Klebsiella planticola* استطاعت النمو على وسط الماكونكي وخمرت سكر اللاكتوز فيه وأعطت مستعمرات ورديه براقة ذات قوام مخاطي وهي صفة مميزة لهذه البكتريا ، اما مستعمراتها على وسط أكار الدم فكانت شفافة لماعة غير محللة لكريات الدم الحمراء (16)، أوضحت نتائج الفحص ألمجهري للشرائح ألمحضره من تلك المستعمرات وباستخدام التصبيغ بطريقة غرام أنها عصيات قصيرة سالبة لملون غرام اتخذت هيئة مفردة أو مزدوجة أو بشكل سلاسل قصيرة ، (14) .

التشخيص الكيميائي الحيوي

أشارت النتائج المبينة في الجدول (٢) إلى الفحوصات الكيميائية الحيوية والتي اعتمدت لتاكيد نوع العزلة *K. planticola* وفقا لما جاء في (٢٠) .

التحري عن وجود المحفظة Capsule

أظهرت النتائج أن جميع العزلات قد امتلكت المحفظة بعد ان تم التحري عن وجود المحفظة باستعمال طريقة التصبيغ السالب Negative staining، ويوضح الشكل (٢) مسحة لأحدى هذه العزلات مصبوغة بطريقة التصبيغ السالب باستعمال الحبر الهندي إذ تلاحظ المحفظة بشكل هالة شفافة تحيط ببقية جسم الخلية البكتيرية في حين تظهر الأرضية سوداء معتمة (6).

التحري عن متعدد السكريد المحفظي كمياً.

بالرغم من ان طريقة التصبيغ السالب أثبتت امتلاك جميع العزلات محفظة ألا انه كان لابد من التحري عن متعدد السكريد المحفظي كميا لاختيار أكفأ العزلات

بالإنتاج، لذا فقد أجريت طريقة قياس كمية حامض الكالكتويورونك Galacturonic acid العزلة المختارة قيد الدراسة

اختيار العزلة الكفوءة في انتاج متعدد السكريد المحفظي:

تم اختيار العزلة Kp4 من بكتريا *K. planticola* جدول (٣) وذلك من خلال صفات نموذجية في الفحوصات الكيميائيه الحيوية التي أجريت لها وإثناء اختبارها عن كفاءتها في أنتاج حامض الكالكتويورونك واحتوائها على محفظة كبيرة الحجم وثبات صفاتها الزرعية طيلة فترة البحث.

استخلاص وتنقية متعدد السكريد المحفظي Capsular polysaccharides (CPS):

وجد ان وسط BHI مع خلاصة الخميرة وسكر المالتوز كان وسط ملائم لانتاج CPS. كما يعد استخدام Cetavlon ضرورياً في عملية فصل متعدد السكريد المحفظي. في حين ان الأحماض النووية الموجودة تتم إزالتها بترسيبها بكحول ethanol. جمع متعدد السكريد المحفظي CPS بمعاملته ethanol ثم تمَّ التخلص من بقايا البروتينات من خلال فصلها بمذيبات عضوية هي مزيج من كلوروفورم – بيوتانول (٥:١) على التوالي .أثبتت هذه الطريقة كفاءتها بالحصول على متعدد السكريد المحفظي النقي Purified CPS وتمَّ التأكد نوعياً من وجوده بإجراء اختبار مولش Molish test (٢١).

ومقارنتها مع المنحني القياسي لتراكيز محضرة من هذا الحامض (11).

ان تركيز متعدد متعدد السكريد المحفظي المنقى Purified CPS تم تقديره باستعمال طريقة الفينول– حامض الكبريتيك المركز Dubois *et al.,* (1956) من خلال رسم العلاقة بين تراكيز الكلوكوز القياسي والامتصاصية على طول موجي ٤٩٠ نانوميتر إذ وجد ان تركيز متعدد السكريد المحفظي المنقى الذي تمَّ الحصول عليه بلغ 167 مغم/مل.

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

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بعد معاملة الخلايا البلعمية متعددة أشكال بالتراكيز (٥،١٠،٢٠،٥٠،١٠٠) مغم/مل من متعدد السكريد المحفظي CPS ولمدة ساعة واحدة، الجدول (٤) إن التراكيز (٥،١٠) مايكروغرام/مل من متعدد السكريد المحفظي لم تكن ذات تأثيرا معنويا في قابلية النمو للخلايا البلعمية (PMN) بمستوى ($p<0.05$) في الوقت الذي كان للتراكيز ٢٠، ٥٠، ١٠٠ مغم/مل تأثيرا معنويا في قابليتها على النمو بمستوى ($p<0.05$) حيث انخفضت النسبة المئوية قابلية النمو هذه الخلايا مقارنة مع معاملة السيطرة وكذلك الحال عند استخدام التركيز ١٠٠ مايكروغرام/مل إذ انخفضت النسبة المئوية قابلية النمو الخلايا البلعمية من 96.8 في معاملة السيطرة إلى (83.6) عند التركيز ١٠٠ مايكروغرام/مل على التوالي، كما يلاحظ من الجدول انه لا توجد فروق معنوية بمستوى ($p<0.05$) بالنسبة

المئوية قابلية النمو الخلايا (PMNs) بين التركيزين ٥٠ و ٢٠ مغم/مل.

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

بينت النتائج الموضحة في جدول ٥ تاثير CPS المنقى على عملية التهام الخميرة كما في شكل ٣ ان معدلات معامل البلعمة (Phagocytic Index PI) لخلايا PMNs المعاملة بالتراكيز (50, 20, 10, 5) مايكروغرام/مل من مستضد متعدد السكريد المحفظي لفترات زمنية مختلفة مقارنة بالسيطرة.إذ يلاحظ من الجدول ان معامل البلعمة يزداد مع زيادة الزمن تدريجياً بشكل معنوي حتى وصل أقصاه عند ٩٠ دقيقة ثم عاد لينخفض خلال ١٢٠ دقيقة ولجميع التراكيز المستعملة ومن ذلك يلاحظ أن هناك علاقة وثيقة بين عامل الوقت ومعامل البلعمة وان كفاءة الخلايا للالتهام تزداد بمرور الوقت ،فيما تبدأ بعد الدقيقة ٩٠ بفقدان قدرتها على الالتهام ، وقد برر ذلك Lock *et al.*, (1990) إلى زيادة تركيز الانزيمات الحالة والمواد السامة التي تنتج من قبل الخلايا نفسها نتيجة هذه العملية. وبينت ان هناك انخفاض معنوي على مستوى ($p<0.05$) بزيادة التركيز ولجميع الأوقات المستخدمة بالتجربة كما لوحظ عدم وجود فرق معنوي بمستوى ($p<0.05$) بين التركيزين (10,5) مايكروغرام/مل في الزمن (٩٠،١٢٠) دقيقة. ان عملية البلعمة تتم بواسطة الخلايا الوحيدة النواة في الدم التي تتحول الى خلايا البلعم الكبير عند وصولها الى الانسجة وتقوم بعملية البلعمة، ويمكن قياس فاعلية هذه الخلايا ونشاطها من خلال عملية الالتهام وقابليتها على التخلص من الجراثيم والأجسام الغريبة الداخلة للجسم بما يعرف بعملية البلعمة Phagocytosis (1). يوفر متعدد السكريد المحفظي للبكتريا حاجزا فيزيائيا ضد عملية البلعمة antiphagocytic barrier يعترض عملية ارتباط مكونات العامل المتمم مع مستلماتها على الخلايا البلعمية (2).

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

اشارت النتائج في جدول (٦) الى تأثير متعدد السكريد المحفظي المنقى على هجرة الخلايا البلعمية (PMNs) وعامل تثبيط الهجرة Migration Inhibition Factor (MIF) حيث بينت ان التراكيز (٢٠،١٠،٥) مايكروغرام/مل من متعدد السكريد المحفظي المنقى أدت إلى زيادة في قطردائرة الهجرة عندما بلغت (16.87,17.6,18.5)ملم على التوالي وتعد هذه الزيادة معنوية بمستوى ($p<0.05$) للتركيز (٥) مايكروغرام/مل مقارنة مع معاملتي السيطرة السالبة والموجبة (PHA) في حين ان الزيادة للتركيزين (20,10) مايكروغرام/مل غير معنوية بمستوى ($p<0.05$) مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة وأدى التركيز (٥٠)مايكروغرام/مل إلى انخفاض معنوي بمستوى ($p<0.05$) في قطر دائرة الهجرة مقارنة مع معاملة السيطرة، وسجلت

المعاملة بمادة (Phytohemagglutinn (PHA حيث بلغت ٨.١٢ ملم. وعند مقارنة قيم القياسية المعتمدة والواردة في (Bures *et al.*, 1986) والتي هي كالأتي:

قيمMIF من 0.8–1.2: هجرة طبيعية.

قيمMIF من1.2– ٢: تحفيز الهجرة.

قيم MIF من صفر– ٠.٨: تثبيط للهجرة.

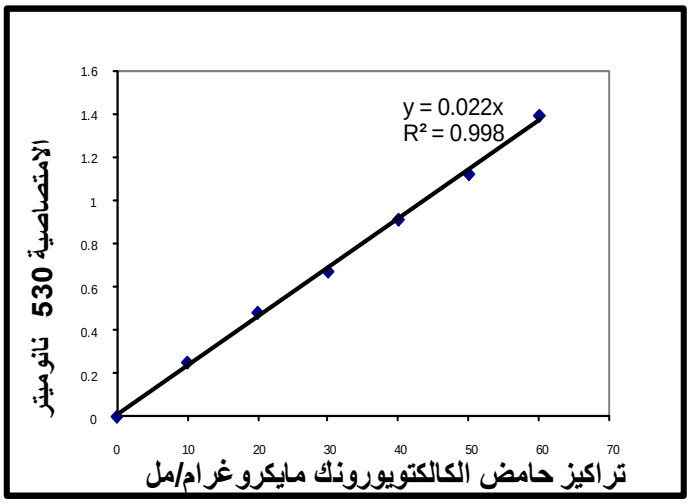
بينت النتائج ان جميع تراكيز متعدد السكريد المحفظي كانت ضمن الحدود الطبيعية للهجرة عدا التركيز (٥٠) مغم\مل ومعاملة السيطرة الموجبة (PHA) فأنهما وقعا ضمن القيم المثبطة للهجرة. يتضح ان كل من التركيز (50) مايكروغرام/مل من متعدد السكريد المحفظي المنقى أدى إلى هجرة الخلايا (PMNs) هجرة عشوائية مقارنة بمعاملة السيطرة الموجبة.أن عملية تثبيط هجرة الخلايا البلعمية (PMNs) داخل الجسم الحي تتم بمساعدة الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة (Th) لان إفراز عامل تثبيط الهجرة (MIF) من قبل الخلايا (T–cell) يؤدي إلى تثبيط هجرة الخلايا البلعمية عن موقع حـــدوث الالتهاب(22).

اقل قيمة (PHA) التي تم الحصول عليها مع القيم (MIF)

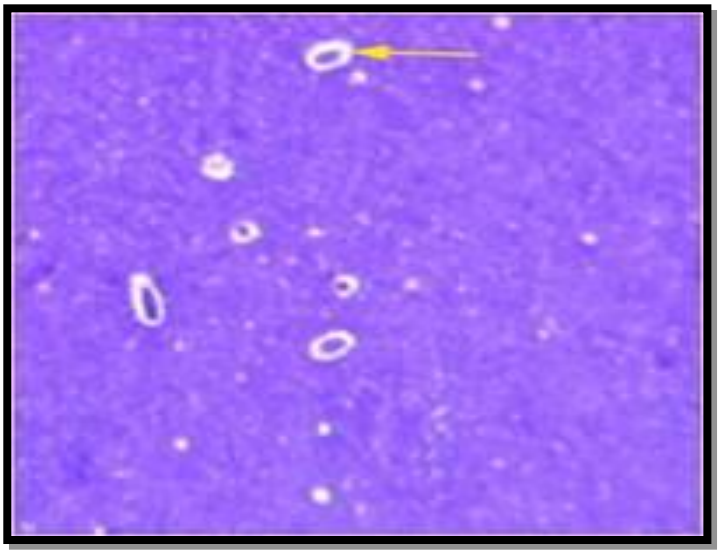
ويعد عامل التنخر الورمي Tumor Necrosis Factor TNF)) هو المسؤول عن تثبيط هجرة خلايا الدم العدلة تحت الاكاروز بدليل ان الأضداد المحضرة ضد هذا العامل هي الوحيدة القادرة على معادلة إزالة فعالية ثبيط الهجرة (٢٣).

الاستنتاجات

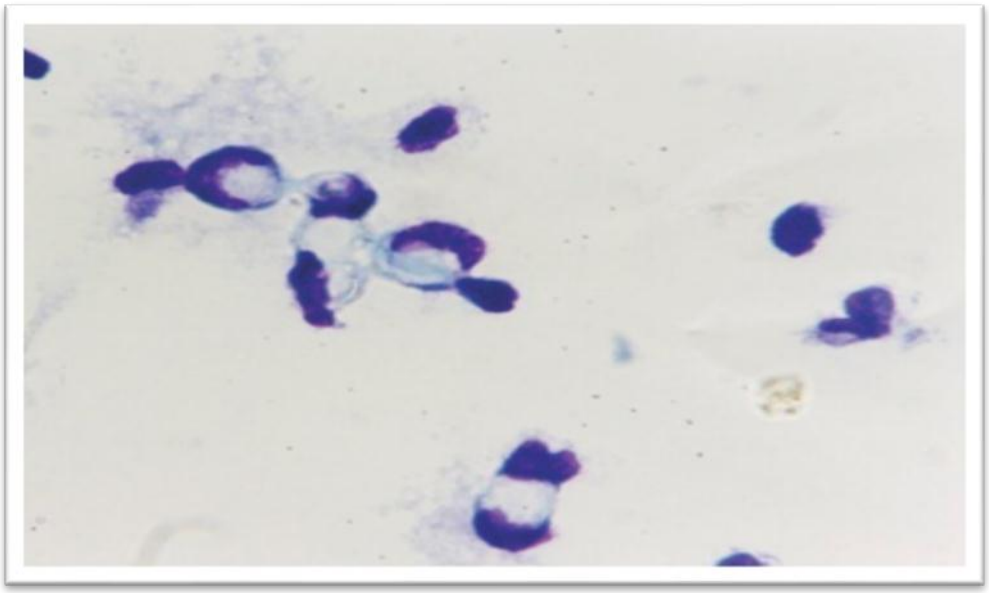
أظهرت عزلات بكتريا *Klebsiella Planticola* وامتلاكها جميع العزلات محفظه capsule. أدى استخدام التراكيز المختلفة من مستضدي CPS المنقى في هذه الدراسة الى تحفيز الاستجابة المناعية اللانوعية من خلال زيادة وظائف وفعاليات الخلايا المناعية المستخدمة واعتمد مدى التحفيز على تركيز هذه المستضدات لذا فمن الممكن الاستفادة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



شكل ١. المنحنى القياسي لتقدير تركيز حامض الكالكتويورونك الموجود في متعدد السكريد المحفظي.



شكل ٢. مسحة لبكتريا K. planticola توضح المحفظة Capsule.



شكل ٣. خلايا (PMNs) الملتهمة لخلايا خميرة *C. albicans*.

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

Isolates	MacConky agar	Blood Agar	Morphology
K. planticola	Pink colony mucoid	White colony	Bacilli

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

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

جدول ٣. تراكيز حامض الكالكتويورونك الموجود في متعدد السكريد المحفظي لعزلات بكتريا *K. planticola*

رقم العزلة	تركيز Galacturonc acid(مايكروغرام /مل)
Kp1	**25**
Kp2	**18**
Kp3	**27**
Kp4	**29**

جدول ٤. النسبة المئوية لقابلية النمو الخلايا البلعمية متعددة النوى (PMNs) باستخدام تراكيز مختلفة من متعدد السكريد المحفظي CPS المنقى.

تركيزCPS)((مايكروغرام/مل)	النسبة المئوية لقابلية النمو الخلايا البلعمية متعددة النوى (المعدل ±الانحراف المعياري)
صفر (سيطرة)	٠.١٠ ± ٩٦.٨a
٥	٠.٤٠ ± ٩٦.١a
١٠	٠.٧٠ ± ٩٥.٨ a
٢٠	٠.٨١ ± ٩٢.٣ b
٥٠	٠.٨٣ ± ٩١.٦ b
١٠٠	٤.٠٠ ± ٨٣.٦c

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

جدول ٥. تأثير مستضد CPS على بلعمة خميرة *C. albicans*

تركيز (CPS) (مايكروغرام/مل)	معامل البلعمة (PI) %			
	وقت التعرض			
	٣٠	٦٠	٩٠	١٢٠
صفر(سيطرة)	١.٢٩ ± ٦٣.٦٨ A	٧٤.٢٠ ٢.٣٥± A	٠.٦٤± ٧٧.٩٦ A	١.٢٤± ٧٦.٣٣ a
٥	١.٤٦± ٦٤.٥٧ A	٧٣.٤٤ ١.٨٢± A	٢.٦٦± ٨٥.٧٧ B	٢.٢١± ٨٣.٤٥ b
10	٠.٩٩± ٦٠.٣٠ A	٧٥.٧٥ ١.٩٩± B	١.٥٨± ٨٦.٢٢ B	١.١٤±٨٤.٦ b
20	٠.٥٢± ٥٤.٤٥ B	٦٧.٩٣ ١.٤٣± C	٢.٥٣± ٧٣.٧١ C	١.٣٦± ٧٢.٨ C
50	٢.٣٦± ٥٣.٢٥ B	٦٤.٦١ ٢.٤١± D	١.٥± ٦٦.٦٨ D	١.٥± ٦٥.٤٢ D

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

جدول ٦. تأثير متعدد السكريد المحفظي المنقى على هجرة الخلايا البلعمية (PMNs) تحت الاكاروز.

تركيز (CPS) مغم/مل	قطر منطقة الهجرة (ملم)	عامل تثبيط الهجرة (MIF)
صفر(سيطرة سالبة)	١.٣٤ ± ١٧.٦٨a	1
٥	٠.٥٣ ± ٢٠.٥٠b	1.102
١٠	٠.٤٢ ± ١٨.١٧ab	1.053
٢٠	٠.٦٢ ± ١٧.٩٧a	1.019
٥٠	٠.٦٦ ± ١١.٥٦c	0.775
PHA(سيطرة موجبة)	٠.٤٢ ± ٨.١٢d	0.464

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

Abstract

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

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

-The concentrations of CPS (5, 10) µg/ml increased (Phagocytic indexI), with significant differences ($p<0.05$) in comparison to the control treatment.

المصادر

1. Athamna, A.; Ofek,L.; Keisari,Y.; Markowitz,S. and Sharon,N. (1991). Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella planticola* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte derived macrophages , Infect . Immun . 59:1673-82.
2. Alvarez, D.; Merino, S.; Tomas,J.M.; Benedi,V.J. and Alberti,S.(2000) Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in Lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella* clinical isolates . Infect. Immun. 68(2):953 – 955.
3. Bitter,T. and Muir,H.M. (1962).A modified uronic acid carbazole

reaction . Anal. Biochem. 4:330 -334.

4. Bures, J.; Horak,V.; Buresova, E.; Fixa,B.; Komarkova,O. and Hartman,M .(1986).Colicinogeny in chronic inflammatory Bowel Disease .Scand.J.Gastroenterol. 21:819-823.
5. Cech,P. and Lahrer,R.I. (1984). Heterogenicity of Human Neutrophil phagolysosomes :Functional Consequences for Candidacidal Activity ,Blood ,64 :147 -151.
6. Collee, J.G. ; Fraser,A.G. ; Marmion,B.P. and Simmons, A.(1996).Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology, 14th ed. Churchill Livingston. New York.
7. Cryz,S.J.; Fürer,E. and Germanier , R. (1985). Safety and immunogenicity of *Klebsiella planticola* capsular polysaccharide vaccine in human, J. Infect. Dis. 151 :665-671
8. Dubois,M. ; Giles, K.A.; Hamilton ,J.K.; Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances , Anal. Chem. 28:350-356.
9. Fang, F.C.; Sandler, N. and Libby , S. J. (2009). Liver Abscess caused by *mag* A^+ *Klebsiella planticola.* in North America , J. Clin. Microbiol. 43(2):991-992.
10. Federlin , K. ; Maini, R. N.; Russell, A.S. and Dumonda, D.C. (1971). Micro method for peripheral leucocytes migration in Tuberculin Sensitivity , J. Clin. Path. 24:533-536
11. Frirdich,E.; Bouwman, C.; Vinogradov, E. and Whitfield ,C.(2005). The role of Galacturonic acid in outer membrane stability in *Klebsiella planticola* . J. Biol. Chem.280(30):27604-12.
12. Hansen , D. S. ; Mestre, F. ; Alberti, S.; Hernandez- Alles, S. ; Alveraz, D. ; Sanchez, A. D. ; Gill, J.; Merino, S.; Tomas, J. M. and Benedi , V.J. (1999). *Klebsiella planticola* lipopolysaccharides O typing : Revision of prototype strain and O- group distribution among clinical isolates from different sources and countries , J. Clin. Microbiol. 37(1):56-62.
13. Ho, C.Y. ; Lo, T.W. C. ; Leung, K. N. ; Fung , K.P. and Choy, Y. M. (2006). The immunstimulating activities of ant- tumor polysaccharide from K1 capsular (polysaccharide) antigen isolated from *Klebsiella planticola* . Immunopharm. 46:1-13.
14. Holt, J.G..; Krieg, N.R..; Sneath, P.H.A.; Staley,J.T. and Williams, S. T.(1994).Bergey,s manual of determinable bacteriology 9th ed . William and Wilkins, Baltimore.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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