تاثير عديد السكرايد polysaccharides المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aurginosa* على نمو امامية السوط لطفيليات *Leishmania major* خارج الجسم الحي

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

تاريخ تسليم البحث : ٢٠١٠/٩/٢٢ ؛ تاريخ قبول النشر : ٢٠١٠/١٢/٩

ملخص البحث :

تضمن البحث دراسة تاثير مادة عديد السكرايد polysaccharides المفرز خارج خلايا البكتريا *Pseudomonas aureginosa* على تثبيط نمو امامية السوط لطفيلي اللشمانيا الجلدية *Leishmania major* خارج جسم الكائن الحي *in vitro*.

اظهرت النتائج ان لمستخلص عديد السكرايد وبمختلف تراكيزه تاثير مثبط على نمو امامية السوط ، اذ اظهر التركيز 50 مياكرو غرام/سم ^{3} نسبة تثبيط 36.3 بينما كانت في تراكيز 250 مياكرو غرام/سم ^{3} نسبة التثبيط 81 عند الساعة 96 بعد التعريض.

كما بينت الدراسة ان لمستخلص عديد السكرايد تاثير على عدد وزمن الجيل فقد ادت كافة التراكيز الى خفض عدد الجيل وزيادة في زمن الجيل مع فترات التعريض .

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

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

Abstract:

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

The results showed that the various concentration of polysaccharides has an inhibition effect on the growth of promastigote , the concentration of 50 mg/cm^3 showed a 36.3 inhibition ratio while it is 81 at concentration of 250 mg/cm^3 after 96 hour of exposing .

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

المقدمة:

يصنف داء اللشمانيا من قبل منظمة الصحة العالمية WHOكواحد من الامراض الطفيلية الخمسة التي تبدي المنظمة اهتمامها لمعالجتها والقضاء عليها (Al-Jebouri,2002).

يعد داء اللشمانيا الجلدية cutaneous lieshmaniaisis مرضا جلديا شائعا في العديد من اقطار العالم ويعد العراق من البلدان التي يتوطن فيها هذا المرض ،حيث يعرف محليا بحبة بغداد Baghdad boil (Junaid ,1980).

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

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

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

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

طرائق العمل

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

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

زرعت طفيليات اللشمانيا باضافة 0.1سم٣ من محلول اللوك الحاوي على امامية السوط الحية وبعمر 4 ايام الى قناني زجاجية سعة 25سم ^{3} وبمقدار $2.5*10^{5}$ خلية /سم^{2} وحضنت القناني بدرجة 26 ْم لمدة 4 ايام و ثم حدد عدد امامية السوط في كل مزرعة باستخدام شريحة عد كريات الدم Haemocytometer، وفي حالة النمو الكثيف تخفف بالمحلول الفسلجي .

تم استخلاص عديد السكرايد من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* المجهزة من قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة الموصل .واتبعت الطريقة التي استعملت من قبل Taei (1992) في استخلاصه وحضرت التراكيز 250,200,150,100,50 مياكرو غرام/سم^{3} من المستخلص .

النتائج والمناقشة

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

حيث يشير الى اختزال في اعداد امامية السوط بعلاقة عكسية مع زيادة التراكيز خلال فترات النمو المختلفة ،فقد اظهرت نتائج الدراسة ان نسبة التثبيط كانت بين 36.3% الى 81%عند التركيزين 50, 250 مياكرو غرام/سم^{3} على التوالي بعد 96 ساعة من التعريض .

ويبين الجدول (2) تاثير مستخلص عديد السكرايد على عدد الاجيال لامامية السوط ، فقد ادى الى اختزال عدد الاجيال الى 7.219 عند التركيز 250مياكرو غرام/سم^{3} بعد 96ساعة من المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة التي كانت 6.86.

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

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

كما وجد Dudman(1985) بان عديد السكرايد المستخلص من بكتريا الرايزوبيوم له مدى واسع للتفعيل البيولوجي بواسطة ارتباطه مع عدد كبير من الجزيئيات وعمل معقد منها .

واتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه Al-Grawy(1999) عند استخدامه السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *E.coli* لمعالجة اخماج الجهاز البولي في الجرذان.

واتفقت النتائج ايضا مع Nuaman(2002) عند استخدامه السكر المتعدد المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aureginosa* حيث كان له الاثر في انخفاض اقطار واوزان الاكياس العذرية لطفيلي الاكياس المائية .

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

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

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

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

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

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

* الرقم يمثل المعدل لخمس مكررات .

الجدول 2 : تأثير تراكيز مختلفة لعديد السكرايد على عدد الأجيال لأمامية السوط للشمانيا الجلدية *Leishmania major* لفترات نمو مختلفة .

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

* الرقم يمثل المعدل لخمس مكررات .

الجدول 3 : تأثير تراكيز مختلفة لعديد السكرايد على زمن الجيل لأمامية السوط للشمانيا الجلدية *Leishmania major* لفترات نمو مختلفة .

فترة التعريض (ساعة) / المعاملة مايكرو غرام/سم^3	24	48	72	96
	المعدل *±الانحراف القياسي	المعدل *±الانحراف القياسي	المعدل *±الانحراف القياسي	المعدل *±الانحراف القياسي
الضابط	0.032±9.37	0.15±10.33	0.01±10.47	0.23±13.99
50	0.057±11.4	0.19±11.1	0.27±11.288	0.04±12.24
100	0.025±13.9	0.5±11.51	0.03±11.954	0.059±12.565
150	0.17±15.6	0.1±12.6	0.12±12.52	0.14±12.817
200	0.02±18.15	0.12±13.59	0.017±16.26	0.4±13.02
250	0.02±19.96	0.23±16	0.11±13. 52	0.08±13.4

* الرقم يمثل المعدل لخمس مكررات .

References

1. Al-Jebouri,N.N.A.(2002). Study of the effect of some purine analogs on growth and metabolism of Leishmania major promastigotes M.Sc. thesis Collage of Education, Tikrit University ,Iraq.

2- Junaid, N. D. (1986) .Treatment of cutaneous lieshmaniaisis with infra red . Int .J .Dermat ., 25(7): 470-472.

3-Zukerman , A. and Lainson , R . (1977) . Leishmania in parasitic protozoa vol 1 Academic press. New York . P .57-133.

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

5- Wagner , H .; Stuppner ,H.; Schafer ,W . and Zenk , M. (1988) . Immunologically active of polysaccharides of *Echinacea purpurea* cultures. Phytochemistry , 27:119-126.

6-Ali, A. A. (1999) .Immunodulation in mice against infection with hydaytid dieses by polysaccharides pulluan .Ph.D. thesis, Coll. Edu. University of Mosul.

7- Ibrahim L.A .A. (2000). Biological and Immunological study for hydatid cyst Ph.D. thesis , Coll. Sci, Al- Mustansiria University , Iraq.

8-Tobie .E .J,; Brand T.V. ; Mehlman B. (1950). Cultural and physiological observation on *Trypanosoma rhoderseinse* and *T. gambienes* , J . Parasitol ,30 : 48-54.

9- Taei, A .A. K . (1992). The role of types of strain of *Pseudomonas aeruginosa* to induct sugarht syndrome .MSc . Thesis, University of Al-Mustansyria.

10- Dudman , W.F. (1985). The polysaccharides and oligosaccharides of Rizobium and their role in infection process .Carbohydrates Res.188 128-137.

11- Al-Grawy ,J .G. A. (1999). A study on the use of bacterial lipopolysaccharide as an immunomodulater and immunoprophylactic agent in urinary tract infection in rats . Ph.D thesis , Coll. Sci. Univ . Baghdad.

12-Nuaman , I. T. (2002). Modulation of immune response in BALB/c mice against infection with hydatid disease by polysaccharide extracted from *Pseudomonas aeruginosa* .M. Sc. Thesis , Coll. Edu. Univ. Mosul .

13-Al-Mutaywiti,S.S.y.(2005). Effect of lipopolysaccharide extracted from *Escherichia coli* in immune response of BALB/c mice against infection with secondary hydatid disease M.Sc . thesis , Coll. Edu. Univ. Baghdad .

14- Chia, E.L. (2007). Extraction and functional analysis of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. MSc. Thesis, Department graduate of Cosmotic Science, China.

15- Shanmuqan, A. ; Mahalakshmi, T.S. and Vino, A.B. (2007). Antimicrobial Activity of polysocchrides isolated from the cattle bone of *Sepia oculeata* (orbingy, 1848) and *Sepia brevimana* (steenstrup, 1875) : An Approach to selected antimicrobial activity for human pathogenic microorganisms. J. Fish. Aquatic Sci. , 3:268-274.

16- Barrosa, P.A. ; Marco, J.D. ; Colvpina , M.; Kato, H. ; Korengu, M. and Hashiguchi, Y. (2007). Atrial of immunotherapy against *Leishmania amazonesis* infection *in vitro* and *in vivo* with z-100, apolysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis* alone or combined with meglumine antimoniate. J. of Antimicrobial Chemotherapy, 59(6) : 1123-1129.

17- Fattah, M. I. (1990). Non-specific activation of mice peritoneal macrophage with Rhizobium polysaccharide .M. Sc. Thesis. University of Al-Mustansyria.