Iraqi Journal of Science

استخدام عديد السكريد الشحمي و الكلوكان كمعدل مناعي لخمج الجروح

سهاد سعد محمود ، اليس كريكور اغوب

قسم التقنيات الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد – العراق.

الخلاصة

تم جمع ١٠٠ عينة سريرية من اخماج جروح مرضى راقدين في مستشفى اليرموك التعليمي و الكاظمية التعليمي للفترة من ١-٣ الى ١-٩ -٢٠٠٤.

اظهرت نتائج الزرع الهوائي ان ٨٦ عينة من اصل ١٠٠ عينة اعطت نتائج موجبة وكانت بكتريا *Pseudomonasaeruginosa*و *klebsiella pneumonia* اكثر العزلات تواجدا .اجري اختبار الحساسية لبكتريا *P.aeruginosa* و *K.pneumonia* واظهرت النتائج ان النوعين من البكتريا اظهرت اعلى حساسية تجاه مضاد الاميبنيم فيما كانت مقاومة لمضاد الاموكسيكلاف و السيفالكسين.

استخلص عديد السكريد الشحمي من العزلة البكتيرية الاكثر مقاومة لمضادات الحياة *P.aeruginosa(*pa8) بواسطةطريقة الفينول الساخن ومن ثم تم تنقيته جزئيا باستخدام كروموتوغرافيا الترشيح بهلام Sepharose-6-B واظهرت النتائج ان نسبة الكاربوهيدرات والبروتينات في المستخلص المنقى جزئيا كانت ٣٧.٥%و ١.٥% على التوالي وكان المستخلص خال من الاحماض النووية.

اظهرت النتائج ان التمنيع بعديد السكريد الشحمي بتركيز ٥٠ مايكروغرام والكلوكان بتركيز ١٠ مايكروغرام واستخدامهما معا كخليط بالتلركيزين السابقين اعطى افضل نتائج من خلال ظهور حالة الشفاء للجلد المخمج ببكتريا(Pa8) *P.aeruginosa*a .

THE USE OF LIPOPOLYSACCHARID AND GLUCAN AS IMMUNMODULATOR OF WOUND INFECTIONS

Alice Krikor Melconian , Suhad Saad Mahmood

Department of Biotechnology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad-Iraq.

Abstruct

One hundred clinical samples were collected from infected wounds of patients admitted in Al-Yarmouk and Al-Kadymia hospital from 1-3 to1-9-2004.

The results of aerobic culture appeard that 86% of bacterial isolates showed positive results and the bacteria Pseudomonasaeruginosa and klebsiella pneumonia was the most common isolates.

Antibiotic susceptibility test was performed for *P.aeruginosa* and K.pneumonia and the results appear the two types of bacteria sensitive to imipenium and resistant to amoxiclave and cephalexin.

Lps was extracted from the most drug resistant isolate *P.aeruginosaa*(Pa8) by hot phenol method and partial purified by gel filtration chromatography using sepharos-6-B and the results showed that carbohydrate and protein ratio in partial purified extracted were 37.5%and1.5% respectively,and the extract was free of amino acid.

The results of immune by lps in 50Mg and glucan in 10 Mg and use the two substances together in the same concentrations gave best results appear through wound healing of skin that infect by *P.aeruginosaa* (Pa8)

المقدمة

تنتج الجروح wounds من تمزق الجلد و الذي يعد العائق الرئيسي لحدوث الاخماج بوساطة البكتريا الممرضة (1)ويحدث الخمج عندما تستوطن الجروح بكتريا لها القدرة على التضاعف فضلا عن انتاجها لعوامل الفوعة التي تمكنها من التغلب على الجهاز المناعي(2) .

وتعد اخماج الجروح الناتجة من الاصابات الخطرة والعمليات الجراحية من التعقيدات الشائعة التي تسبب زيادة في نسبة الامراضية و الوفيات(3,4) ان مصادر تلوث الجروح عديدة وتشمل المصادر الخارجية مثل الهواء والاحياء المستوطنة للجلد المحيط بالجرح والمصادر الداخلية مثل الاحياء المستوطنة للغشية المخاطية و التي توجد بشكل نبيت طبيعي (Normal flora) كما ان التلامس مع المعدات الطبية الملوثة ومع الاشخاص الحاملين للبكتريا تعد ايضا من مصادر التلوث للجروح(4,5)

تستوطن الجروح انواع بكتيرية عديدة منها : *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* و *Proteus vulgaris* و *Citrobacter freundi* و *Enterobacter cloacae* ،فضلا عن البكتريا اللاهوائية مثل: *Clostridium spp.*، *Bacteroides fragilis*، (6,1).

ان سبب فشل علاج كثير من الاصابات البكتيرية هو ظهور المقاومة المفرطة لمدى واسع من المضادات ،لذا اتجهت الدراسات لاكتشاف مركبات لها القدرة على تثبيط هذه الاصابات او تمتلك القدرة على العمل كمساعدات (Adjvant) للجهاز المناعي(7,8,9).

وقد تم التعرف على كثير من هذه المواد والتي سميت بالمعدلات المناعية (Immunomodulator)وهي مركبات تؤثر في النظام المناعي فتنظم الاستجابة المناعية Immun) (response بشكل سلبي او ايجابي ومن ثم اعطاء المضيف القدرة علىمقاومة الاصابات المايكربية(10).توجد انواع عديدة من المعدلات المناعية منها ما يكون ذات طبيعة بروتينية (proteins) او ببتيدات(peptidies) او بروتينات سكرية (Glycoproteins) او عديد سكريد شحمي (Lipopolysaccharide) ومن المعدلات البمناعية المعروفة الكلوكان(Glucan) المستخلص من جدار الخميرة وعديد السكريد الشحمي المستخلص من البكتريا السالبة لملون غرام التي عرفت قابليتها على تحفيز الجهاز المناعي(11).

المواد وطرائق العمل

شملت الدراسة ١٠٠ عينة اخذت من جروح مصابة بالاخماج لمرضى راقدين في المستشفيات ولكلا الجنسين وباعمار مختلفة.

تشخيص العزلات

تم تنقية العزلات بعد نقلها الى المختبر على وسط الماكونكي الصلب التفريقي وقد تم تشخيص الانواع البكتيرية السالبة لملون غرام وبالاعتماد على(12) وكذلك بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية الموصوفة من قبل(13) .

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

استخدمت المضادات الحيوية الاموكسيكلاف٣٠ مايكروغرام اقرص والاميكاسين٣٠ مايكروغرام اقرص والسفتازديم٣٠ مايكروغرام اقرص و السيفالكسين٣٠ مايكروغرام اقرص والكلورمفينكول٣٠ مايكروغرام اقرص و الكولستين١٠ مايكروغرام اقرص و السبروفلوكساسين٥ مايكروغرام اقرص و الجنتامايسين 10مايكروغرام اقرص والاميبينم١٠مايكروغرام اقرص و الببراسلين١٠٠ مايكروغرام اقرص هذ تم اجراء اختبار الحساسية حسب الطريقة الموصوفة من قبل(14) قيست المنطقة الخالية من النمو باستعمالالمسطرة بالمليمترات وتم مقارنة النتائج مع الجدول الخاص لمعرفة مدى مقاومة او حساسية العزلات لذلك المضاد.

الاستخلاص و التقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي من العزلة المحلية (Pa)*P.aeruginosa*

تم الاستخلاص و التنقية الجزئية بالاعتماد على طريقة جونسن وبيري ﴿ 15 ﴾ وهي طريقة تعتمد على استخدام الانظيمات قبل الاستخلاص بالفينول الحار اما بالنسبة لتنقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي فكانت باستخدام كروموتوغرافيا الترشيح بالهلام باستخدام هلام sepharos-6B

تقدير كمية الكاربوهيدرات

قدر كمية الكاربوهيدرات للمستخلص الخام والمنقى جزئيا للعزلة المحلية *Pseudomonas aeruginosa* Pa8 بالاعتماد على طريقة دوبوا وجماعته [16] عند الطول الموجي ٤٩٠ نانوميتر.

تقدير كمية البروتين

قدر تركيز البروتين للمستخلص الخام والمنقى جزئيا بالاعتماد على طريقة لوري وجماعته (17) عند الطول الموجي ٦٠٠ نانوميتر.

تقدير كمية الاحماض النووية

قدرت كمية الاحماض النووية للمستخلص الخام والمنقى جزئيا بالاعتماد على طريقة[18] ·

الانموذج الحيواني

تم استخدام ٢٧ فارا سويسري بوزن ٢٠-٢٥ غراما وبعمر ٤ –٨ اسابيع حيث قسمت هذه الفئران الى ١٢ مجموعة بواقع ٣ فئرات لكل مجموعة اذ تم احداث جرح في المنطقة الظهرية لهذه المجاميع ومن ثم معاملتها بتراكيز مختلفة من عديد السكريد الشحمي 12.5و٢٥و٥٠مايكروغرام وكذلك معاملتها بثلاث تراكيز من الكلوكان ١٠و٥٠و١٠٠مايكروغرام ثم تم معاملة المجموعة الاخيرة بخليط من عديد السكريد الشحمي بتركيز ٥٠ مايكروغرام و الكلوكان بتركيز ١٠ مايكروغرام اذ تم اختيار هذه التراكيز بالاعتماد على الخطوتين السابقة اما بالنسبة لمجاميع السيطرة فقد تم معاملتها بمحلول الملح الفسيولوجي و الدكستروز.

تم احداث جرح في المنطقة الظهرية للفئران المعاملة وتم تخميجه ببكتريا *P.aeruginosa* (Pa8) بعد اربعة ايام بالنسبة للفئران المعاملة بعديد السكريد الشحمي اما بالنسبة للفئران المعاملة بالكلوكان فقد تم احداث الخمج بعد اربع ساعات اما بالنسبة للمجاميع المعاملة بخليط عديد السكريد الشحمي و الكلوكان فقد حدث الخمج بعد اربع ساعات ايضا ثم بعد سبعة ايام تم قتل الفئران و تحضير المقاطع النسيجية.

النتائج و المناقشة

اظهرت نتائج زرع العينات في ظروف هوائية على وسط ماكونكي نمو ٨٦ عزلة من اصل ١٠٠ عينة ٨٦٪ بينما اظهرت ١٤ عينة نتائج زرع سالبة وهذا قد يعود الى ان بعض الانواع المسببة لاخماج الجروح تكون ذات متطلبات نمو خاصة Fastidious او قد يعود الى كون البكتريا تنمو في ظروف لاهوائية او يكون المريض قد تلقى علاجا مضادا للبكتريا قبل اخذ العينة اذ اظهرت نتائج التشخيص الكيموحيوية و بالاعتماد على مصنف بيركي [١٣]ان ٢٦ عزلة 30,2 يعود لبكتريا *P.aeruginosa* و ٢٠ عزلة 23٪ تعود لبكتريا *K.pneumonia* و ١٦ عزلة وبنسبة 18,6تعود لبكتريا E.coli و ٩ عزلات 10.4تعود لبكتريا *C.freundai* اما عدد عزلات *Proteus spp.* و *E.cloaeca* فكانت ٨ عزلات 9.3٪ و ٧عزلات 8.1٪ على التوالي.

الجدول ١: الاعداد والنسب المئوية للانواع البكتيرية المعزولة من اخماج الجروح

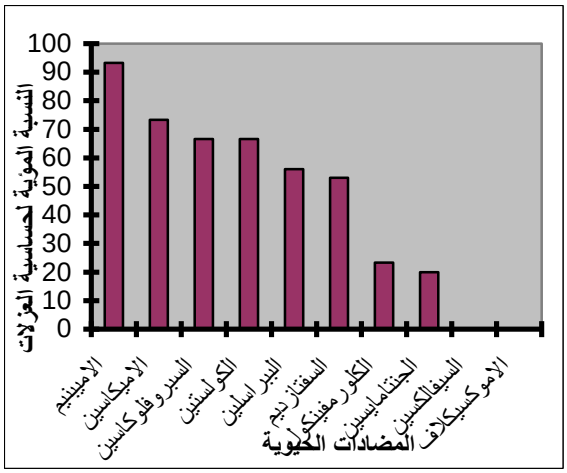
نوع البكتريا	العدد	النسبة المئوية %
Pseudomonas aeruginosa	*26*	*30.2*
Klebsiella pneumoniae	*20*	*23*
Escherichia coli	*16*	*18.6*
Citrobacter freundi	*9*	*10.4*
Proteus spp.	*8*	*9.3*
Enterobacter cloacae	*7*	*8.1*
المجموع	*86*	*100%*

اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية

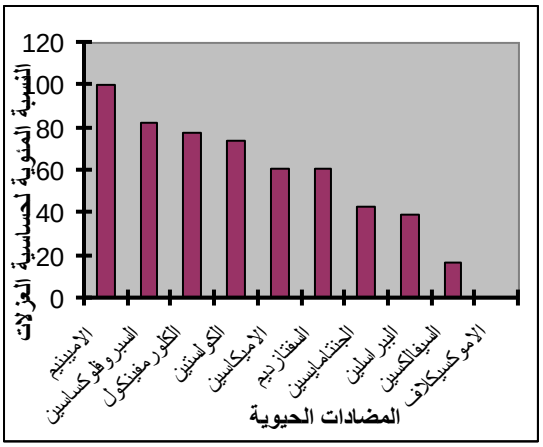
تم اختبار حساسية كل من بكتريا *P.aeruginosa* و *K.pneumonia* تجاه كل من المضادات الاميبنيم والاموكسيكلاف و البيراسلين و الجنتامايسين و السفتازديم و السيفالكسين و الاميكاسين و الكلورمفينكول و السبروفلوكساسين و الكولستين.اظهرت نتائج الاختبار (الشكل١) ان بكتريا *P.aeruginosa* اظهرت حساسية عالية و بنسبة ٩٣.٣% تجاه مضاد الاميبنيم وهذه النتيجة مقاربة لما حصل عليها(19) و الذين كانت عزلاتهم حساسة بنسبة ٨٩% اما بالنسبة لمضاد الاموكسيكلاف و السيفالكسين فلم تظهر البكتريا اي حساسية وهذه النتائج تتفق مع(21,20) ويعزى هذا الى قابلية بكتريا *P.aeruginosa* على انتاج انزيمات البيتالاكتام واسعة الطيف

التي تعطي مقاومة لمدى واسع من مضادات البيتالاكتام و السيفالوسبورينات والتي لا تتاثثر بعمل مثبطات الانزيمات (حامض الكلافيولانك)(22).

اما بالنسبة لبكتريا *K.pneumonia* اظهرت نتائج الاختبار(الشكل٢) ان البكتريا حساسة بنسبة ١٠٠% تجاه مضاد الاميبنيم اما لمضادات البيتالاكتام فلم تظهر البكتريا اي حساسية تذكر وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره (23) والذين اكدوا قابلية البكتريا لانتاج انزيمات البيتالاكتميز التي لا تتاثر بعمل حامض الكلافيولانك.



الشكل ١: النسب المؤية لحساسية بكتريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية.



الشكل ٢: النسب الؤية لحساسية بكتريا *K.pneumonia* للمضادات الحيوية

الاستخلاص و التنقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي

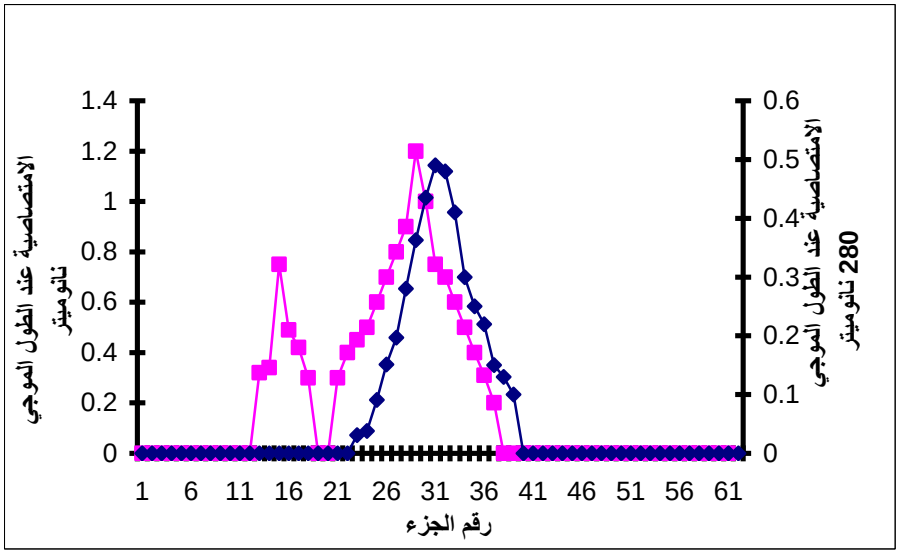
اختيرت العزلة (Pa8) *P·aeruginosa* التي اظهرت مقاومة عالية لاغلب المضادات المستخدمة (١٠ انواع)؛ لغرض استخلاص عديد السكريد الشحمي. تم تنمية العزلة في وسط نقيع القلب والدماغ وباستخدام الحاضنه الهزازة، اذ يعد وسط نقيع القلب والدماغ من الاوساط الاغنائية للبكتريا، كما ان الحاضنة الهزازة توفر افضل تهوية لنمو الخلايا ومن ثم الحصول على افضل نمو (٢٠ غراماً وزن جاف). تم استخلاص عديد السكريد الشحمي بطريقة الفينول الساخن وباستخدام الانزيمات الحالة (24)؛وقد تم اختيار هذه الطريقة لسهولتها و الناتج الكبير الذي تعطيه مقارنة مع الطريقة الاعتيادية المعتمدة على معاملة الخلايا مباشرة بالفينول الساخن لوحده او باستعمال الطرق الميكانيكية (15) اذ لوحظ خلال عملية الاستخلاص ان اضافة الفينول الساخن مع النبذ المركزي المبرد يؤدي الى انفصال ثلاثة اطوار مرتبة من الاعلى الى الاسفل وهي :الطور المائي الحاوي على عديد السكريد الشحمي والاحماض النووية، ومن ثم الطور البيني الحاوي على مواد خلوية، واخيرا الطور الفينولي الحاوي على البروتينات (26,25) لقد اشار(27) الى احتواء الطور المائي على اكبر كمية من عديد السكريد الشحمي، في حين ذكر (28) الى امكانية وجوده في الطور الفينولي؛ وهذه الاختلافات تعود الى مدى الفه عديد السكريد الشحمي للطورين والمعتمدة على السلسلة الجانبية، اذ لوحظ ان عديد السكريد الشحمي المعزول من بكتريا ممتلكة للسلسلة الجانبية يكون له الفه للماء (Hydrophilic)؛ لذلك يقتصر وجوده على الطور المائي. اما عديد السكريد الشحمي المعزول من بكتريا فاقدة للسلسلة الجانبية فيكون له الفه للشحم (Lipophilic) فيختلف توزيعه بين الطورين المائي والفينولي (30,29). وتعد طريقة الفينول الساخن من افضل الطرائق ليس فقط لبساطتها وسهولة تطبيقها ولكنها تعد من الطرائق القليلة التي يمكن بوساطتها استخلاص عديد السكريد الشحمي من البكتريا الملساء والخشنة فضلا عن انها تعمل على ازالة الملوثات من البروتينات والاحماض النووية (15) ، كما لوحظ ان استخدام انزيم اللايزوزايم مع مادةال EDTA يزيد من كفاءة طريقة الاستخلاص اذ اشار (31)الى قابلية مادة الـEDTA لسحب الايونات الثنائية التكافؤ ++Ca ، ++Mg والتي لها دور في تثبيت عديد السكريد الشحمي بالغشاء ومن ثم زيادة كفاءة عملية الاستخلاص، فضلا عن ان الناتج يكون اكثر نقاوة مقارنة باستخدام الفينول لوحده في عملية الاستخلاص.

تمت التنقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي الخام باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح بهلام Sepharose-6B و المستخدمة من قبل العديد من الباحثين(35;34;15).

استرد عديد السكريد الشحمي وتم تتبع الاجزاء المفصولة و التحري عنه وعن المواد الملوثة له في كل جزء من الاجزاء النافذة بوساطة قياس كمية الكاربوهيدرات على وفق طريقة (16) عند الطول الموجي ٤٩٠ نانوميتر كما تم التحري عن كمية البروتين المرتبطة بعديد السكريد الشحمي وعند الطول الموجي ٢٨٠ نانوميتر ،ثم رسمت العلاقة بين الامتصاصية و الاجزاء النافذة (الشكل ٣).بينت النتائج انفصال قمتين رئيسيتين للكاربوهيدرات واحدة صغيرة واخرى كبيرة محتوية على مكونات بروتينية ،وهذا يتفق مع كثير من الدراسات التي اشارت الى وجود بروتين مرتبط مع عديد السكريد الشحمي و الذي لايمكن فصله بسهولة (15;28;36).

وبعد تجفيد الاجزاء النافذة كانت بشكل مسحوق ابيض اللون قابل للذوبان في الماء ودارىء الفوسفات الفيسيولوجي واعتبر المستخلص منقى جزئيا.

❖ تم التأكد من كفاءة عملية التنقية عن طريق اجراء التحليل الكيميائي لعديد السكريد الشحمي؛ اذ قدرت كمية الكاربوهيدرات والبروتين و الاحماض النووية في مستخلص جزئيا تصل الى ٤٥% . بينما اشار (33) الى ان نسبة الكاربوهيدرات في دراستهما تتراوح بين١٦.٢%– ٢٤.٨%. في حين اشار (37) الى ان نسبة الكاربوهيدرات تصل الى ٢١.١%، وهذه الاختلافات في نسب الكاربوهيدرات يعود الى اختلاف الانواع البكتيرية وظروف التجربة وطرائق الاستخلاص والتنقية. اما كمية البروتين في المستخلص المنقى جزئيا فقد بلغت ١.٥% وهذه النتائج تتفق مع (26) والذين ذكروا في دراستهم ان نسبة البروتين المرتبط بعديد السكريد الشحمي في يتراوح بين(0.1–١.٤%)؛ وهذا يؤكد كفاءة عملية الفصل بالهلام. بينما ذكر (38) ان نسبة البروتين التي تبقى مرتبطة مع عديد السكريد الشحمي تصل الى ٦% اما(28) فقد ذكروا في دراستهم ان نسبة البروتين التي تبقى مرتبطة تكون بمقدار ٥.٨%.كما اظهرت نتيجة التحري عن الاحماض النووية في مستخلص عديد السكريد الشحمي المنقى جزئيا عدم وجود هذه الاحماض (٠%). وهذا مطابق لما توصل اليه عدد من الباحثين الذين اكدوا على دور انزيمات النيوكلياز (Nuclease) وكفائتها العالية في تكسير الاحماض النووية (15;36).



الشكل ٣ : كروماتوغرافيا الترشيح بالهلام لعديد السكريد الشحمي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*(Pa8) باستخدام هلام Sepharose-cl-6B-200 وبابعاد (2.6 ×30)سم وتم الاسترداد بدارىء الفوسفات الملحي0.025 مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 وبسرعة جريان ٣٠مليلتر/ساعة وبواقع ٣مليلتر /جزء.

عديد السكريد الشحمي المنقى جزئيا للاجزاء،اذ اظهرت النتائج ان نسبة الكاربوهيدرات بلغت٣٧.٥ % (الجدول٢) ، وهذه النتيجة مقاربةلنتيجة(32) والذين ذكروا فيها ان نسبة الكاربوهيدرات في مستخلص عديد السكريد الشحمي المنقى

المستخلص الخام والمنقى جزئيا.

عديد السكريد الشحمي	كاربوهيدرات %	بروتينات %	احماض نووية %
الخام	16.8	2.8	0

المنقى جزئيا	37.5	1.5	0

التغيرات النسيجية لجلد الفئران المعاملة بعديد السكريد الشحمي المنقى جزئيا

درس التأثير الوقائي و العلاجي لعديد السكريد الشحمي المنقى جزئيا وذلك بمعاملة مجموعة الفئران بثلاثة تراكيزهي (٥٠،٢٥،١٢.٥) مايكروغرام / ٠.١ مليلتر محلول فسيولوجي، فضلا عن مجموعة السيطرة المعاملة بالمحلول الفسيولوجي فقط (للمقارنة). عوملت الفئران بالتراكيز المذكورة من عديد السكريد الشحمي المنقى جزئيا ،وبعداربعة ايام تم جرح جلد الفئران المعاملة وتم تخميجها بالعزلة البكتيرية *P·aeruginosa*(Pa8) وبتركيز (٨ ١٠ خلية حية/مليلتر)، وبعد سبعة ايام قتلت الفئران وفصل طبقة الجلد في المنطقة المخمجة وتم تحضير الشرائح النسيجية. اظهرت النتائج ان التغيرات النسيجية لمقاطع جلد الفئران المعاملة بتركيزين ١٢.٥ و ٢٥ مايكروغرام/ ٠.١ مليلتر محلول فسيولوجي من عديد السكريد الشحمي المنقى جزئيا تمثلت بظهور حالة التهابية (Inflammation) أي ارتشاح اعداد كبيرة من الخلايا الالتهابية وتكون خراجات (Abscesses) فضلا عن تنخر الانسجة (Tissue necrosis) (الشكل ٤–أ و الشكل ٤–ب) ؛ وهذا يؤكد على ان التركيزين المستخدمين لم يحفزا الجهاز المناعي بصورة جيدة لمقاومة الخمج ومن ثم حصول الاستجابة الالتهابية التي يتوسطها افراز البادئات الالتهابية (Proinflammatory) مثل TNF من الخلايا الالتهابية والذي يكون له دور كبير في تدمير الانسجة (39). اما بالنسبة للتغيرات النسيجية لجلد الفئران المعاملة بتركيز ٥٠ مايكروغرام /٠.١ مليلتر محلول فسيولوجي من عديد السكريد الشحمي فتمثلت بالتئام الجرح؛ وذلك عن طريق انتاج كميات كبيرة من خلايا الارومة الليفية وتكون الالياف الكولاجينية (Collagen fiber) . فضلا عن ظهور اوعية دموية حديثة التكوين (New blood vessels) (الشكل ٤–ج)· كما وتتفق هذه النتائج مع الدراسات التي اشارت الى قدرة عديد السكريد الشحمي على تحفيز خلايا الارومة الليفية المهمة في عملية الشفاء للجروح (41;40) مقارنة بالتغيرات النسيجية لمجموعة السيطرة التي تمثلت بظهور حالة الالتهاب وتكون خراجات وتنخر الانسجة (الشكل ٤–د).

التغيرات النسيجية للفئران المعاملة بالكلوكان

تم دراسة التأثير الوقائي والعلاجي للكلوكان بمعاملة مجموعة من الفئران بثلاثة تراكيز (١٠ ، ٥٠ ، ١٠٠) مايكروغرام/ ٠.١ مليلتر دكستروز، وبعد اربعة ساعات من المعاملة جرحت الفئران وتم تخميجها بالعزلة البكتيرية *P.eruginosa* (Pa8) بتركيز (١٠8 خليه حية/مليلتر)، وبعد سبعة ايام تم قتل الفئران وفصل طبقة الجلد من المنطقة المخمجة وتم تحضير الشرائح النسيجية . اظهرت النتائج ان التغيرات النسيجية لمقاطع جلد الفئران المعاملة بالتركيز ١٠٠ مايكروغرام/ ٠.١ مليلتر دكستروز تمثلت بظهور حالة التهاب مع تكون خراجات وتنخر الانسجة (الشكل ٥–ج).

اما (الشكل ٥– ب) فقد بين ان التغيرات النسيجية لجلد الفئران المعاملة بتركيز ٥٠ مايكروغرام/ ٠.١ مليلتر دكستروز تمثلت بظهور حالة الشفاء الجزئي؛ اذ لوحظ انتاج كميات من خلايا الارومة الليفية وتكون الالياف الكولاجينية فضلا عن وجود الخلايا الالتهابية. كما تمثلت التغيرات النسيجية لجلد الفئران المعاملة بتركيز ١٠ مايكروغرام/٠.١ مليلتر دكستروز بظهور حالة التئام الجرح؛ اذ لوحظ ارتشاح كميات كبيرة من خلايا الارومة الليفية، كذلك تكون الالياف الكولاجينية فضلا عن ظهور الاوعية الدموية حديثة التكوين (الشكل٥–ا) ، مقارنة بالتغيرات النسيجية لمجموعة السيطرة التي تمثلت بظهور حالة الالتهاب مع تكون الخراجات وتنخر الانسجة (الشكل٥ –د). وهذه النتائج تتفق مع النتائج التي سجلها الباحث (42) والذين لاحظوا ان اعلى نسبة هلاكات كانت في الفئران المعاملة بتركيز ١٠٠ مايكروغرام من الكلوكان، وهذا يتفق مع ما ذكره (43) والذين لاحظوا ان التراكيز العالية من الكلوكان تعمل على تثبيط عملية الانقسام والتكاثر للخلايا المساهمة بالمناعة؛ والذي يؤدي الى التقليل من قابلية المضيف على مقاومة الخمج . اما بالنسبة للفئران المعاملة بتركيز ١٠ مايكروغرامات من الكلوكان؛ فقد لوحظ عدم ظهور أية حالة هلاكات (٠ %) ، كما وتتفق هذه النتائج مع كثير من الدراسات التي اشارت الى قابلية الكلوكان على تحفيز خلايا الارومة الليفية لانتاج الكولاجين ومن ثم الوصول الى حالة الشفاء (46,45,44). واشارت الكثير من الدراسات الى قدرة الكلوكان لمنع حدوث الالتهاب فضلا عن الى قابليته على حماية الحيوانات المختبرية عند اعطائه قبل جرعة التحدي وهذا يعود الى قدرة الكلوكان العالية على تحفيز الخلايا المساهمة في المناعة نتيجة لامتلاكه مستقبلات خاصة على اسطح هذه الخلايا (47,42).

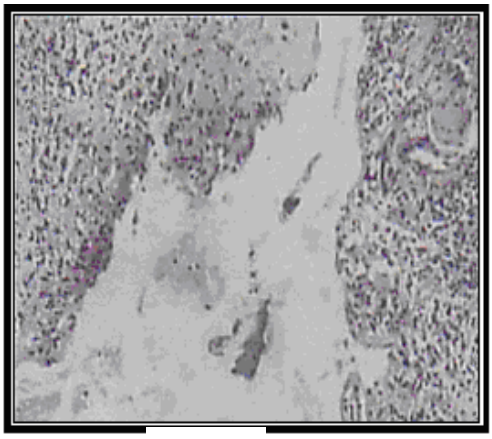
التغيرات النسيجية للفئران المعاملة بخليط عديد السكريد الشحمي والكلوكان

تم دراسة التأثيرات الوقائية والعلاجية لخليط عديد السكريد الشحمي والكلوكان وذلك بمعاملة مجموعة من الفئران بخليط يتكون من عديد السكريد الشحمي بتركيز ٥٠مايكروغرام/٠.١ مليلتر ملح فسيولوجي والكلوكان بتركيز ١٠ مايكروغرام/ ٠.١ مليلتر دكستروز (اختيرت التراكيز وبالاعتماد على الخطوتين السابقتين) ، وبعد اربع ساعات من المعاملة تم جرح الفئران وتخميجها بالعزلة *P.aeruginosa* (Pa8) بتركيز (١٠8 خليةحية/مليلتر)، وبعد مرور سبعة ايام قتلت الفئران وفصلت طبقة الجلد في منطقة الجرح وتم عمل المقاطع النسيجية. اظهرت النتائج ان التغيرات النسيجية لجلد الفئران المعاملة بالخليط تمثلت بظهور حالة الشفاء التام ؛ اذ لوحظ تكون طبقات الجلد كاملة فضلا عن ظهور خلايا الارومة الليفية والالياف الكولاجينية (الشكل٦-أ) مقارنة بمجموعة السيطرة التي تميزت تغيراتها النسيجية بظهور حالة الالتهاب مع تكون خراج وتنخر الانسجة (الشكل ٦-ب).

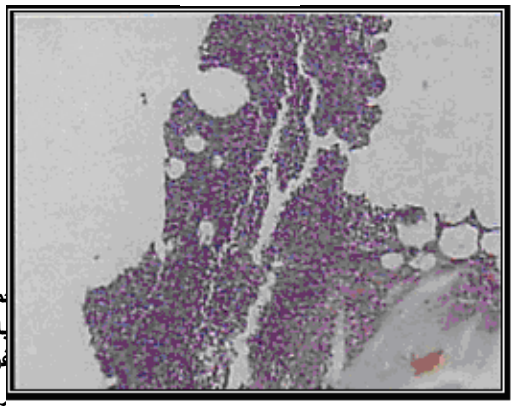
في تحفيز الخلايا التائية (T-Cell) والذي يؤدي الى زيادة انتاج الـIL-2 الذي يعد من افضل السايتوكينات في تحفيز الجهاز المناعي. كما اشارت الدراسات الى ان الخلايا المناعية للفئران المعاملة بعديد السكريد الشحمي والكلوكان تنتج مستويات عالية من ال IL-2 الذي يكون له دور في عملية شفاء الجروح عن طريق تحفيز الانقسام وهجرة خلايا الارومة الليفية الى منطقة الجروح ومن ثم زيادة انتاج الكولاجين المهم في اصلاح الجروح(15). كما بينت الدراسات ايضا دورالـ IL-6 في عملية شفاء واصلاح الجروح والذي ينتج ايضا وبمستويات عالية من خلايا البلعم الكبير و الارومة الليفية للفئران المعاملة بعديد السكريد الشحمي والكلوكان؛ اذ يمتلك الـ IL-6 دوراً غير مباشر في عملية الاصلاح عن طريق تنظيمه لتعبير الجينات المسؤولة عن انتاج عوامل النمو (Growth factors) ؛ اذ لوحظ ان الفئران التي خلاياها لا تستطيع انتاج الـ IL-6 يحدث لها خلل في خطوات اصلاح الجروح مثل: اعادة تكوين الانسجة الطلائية (Reepithelization)، وتكوين الانسجة المتحببة (Granulation tissueformation) (53,54,55).

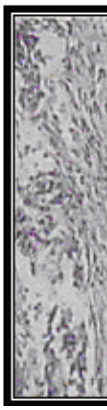
وهذه النتائج تتفق مع بعض الدراسات التي اكدت ان الفئران المعاملة بعديد السكريد الشحمي والكلوكان يكون لها قابلية عالية على الوصول الى حالة الشفاء عن طريق زيادة قدرتها على انتاج كثير من السايتوكينات التي يكون لهادور مهم في عملية اصلاح الجروح (48)·

اشارت الكثير من البحوث الى قابلية خليط عديد السكريد الشحمي والكلوكان على تحفيز الخلايا المساهمة في المناعة للحيوانات المعاملة لانتا ال IFN, IL-6, IL-2, IL-١٢ وبمستويات عالية، فضلا عن كبح قابلية الخلايا على انتاج ال TNF (50,49). كما اشارت البحوث الى الدور المهم لـ IL-1



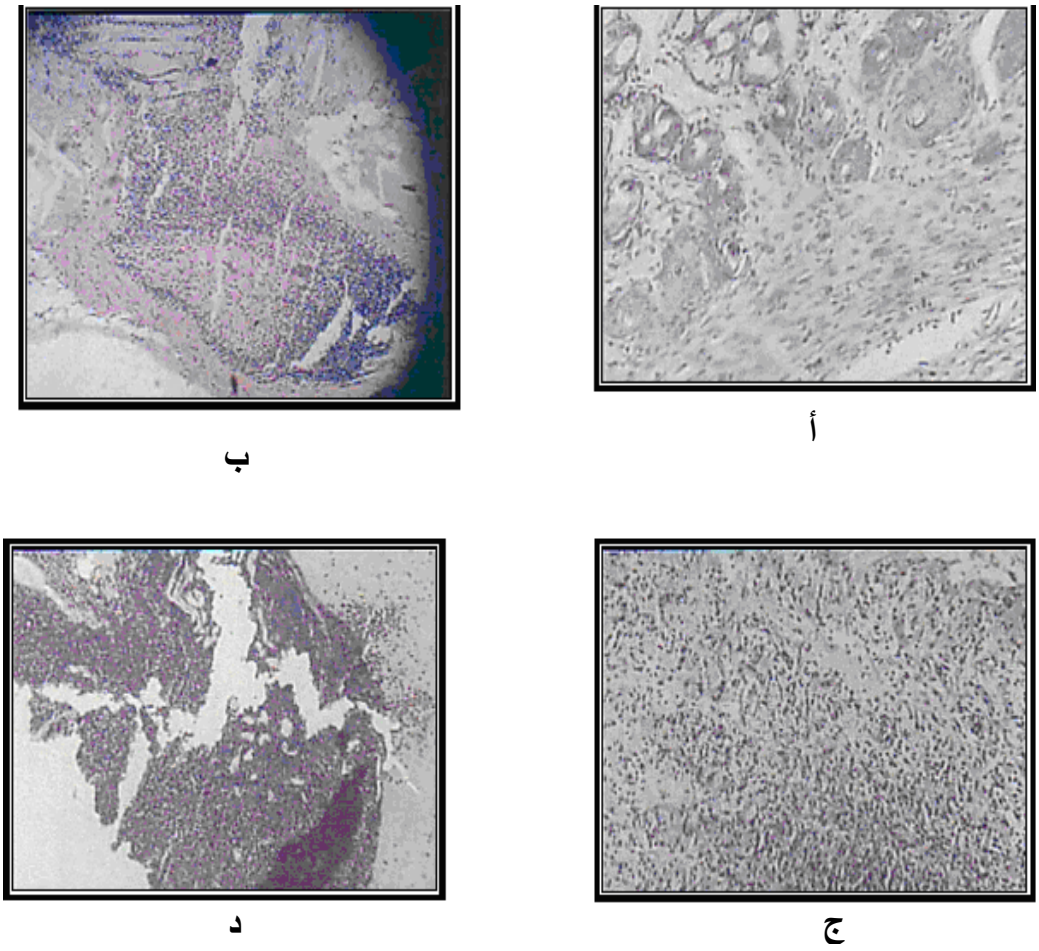
ب





ج

مجة ببكتريا (Pa8)*Pseudomonas aeruginosa* و المعاملة مسبقا بتراكيز
يا مقارنة بمجموعة السيطرة.
غرام من عديد السكريد الشحمي/0.1 مليلتر الملح الفسيولوجي
رام من عديد السكريد الشحمي/0.1 مليلتر الملح الفسيولوجي
ج - الفئران المعا ـز ٥٠ مايكروغرام من عديد السكريد الشحمي/0.1 مليلتر الملح الفسيولوجي
د- الفئران المعاملة بمد فيسلوجي (مجموع السيطرة).



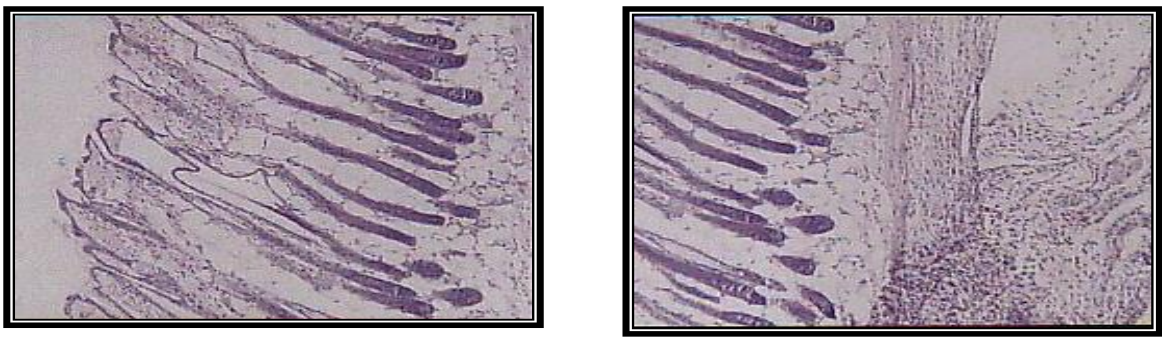
شكل ٥ : مقطع عرضي من جلد الفئران المخمجة ببكتريا (Pa8)*Pseudomonas aeruginosa* و المعاملة مسبقا بتراكيز مختلفة من الكلوكان مقارنة بمجموعة السيطرة.

أ-الفئران المعاملة بتركيز١٠ مايكروغرام كلوكان/0.1 مليلتر دكستروز.

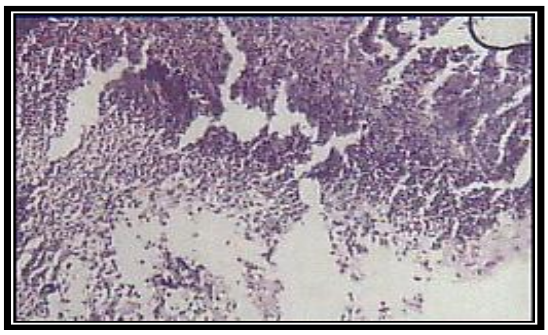
ب- الفئران المعا ملة بتركيز ٥٠ مايكروغرام كلوكان/0.1 مليلتر دكستروز.

ج-الفئران المعاملة بتركيز ١٠٠ مايكروغرام كلوكان/0.1 مليلتر دكستروز.

د-الفئران المعاملة بمحلول الدكستروز(مجموعة السيطرة).



أ



ب

شكل ٦: مقطع عرضي من جلد الفئران المخمجة ببكتريا *Pseudomonas aeruginosa*(Pa8) و المعاملة مسبقا بمزيج عديد السكريد الشحمي و الكلوكان.
أ - الفئران المعاملة بعديد السكريد الشحمي بتركيز ٥٠ مايكوغرام /0.1 مليلتر الملح الفسيولوجي والكلوكان بتركيز ١٠مايكروغرام /0.1 مليلتر دكستروز.
ب- الفئران المعاملة بمحلول الملح الفيسلوجي (مجموعة السيطرة).

المصادر

1. Giacometti, A.; Cirioni , O. ;Schimizzi, A.M. ;Delprete, M.S.; Barchiesi, F.; D' Errico, M. M.; Petrelli, E. A. and Scalise, G. **2000**.Epidimiology and microbiology of surgical wound infections. *J.Cli. Microbiol.*, **38**:918-922.
2. Bowler, P. G.; Duerden, B.I. and Armstrong, D.G. **2001**. Ound microbiology and associated approches to ound managment *Clin. micro. Rev.*,**14**(2):244-269.
3. Nandi, P. L. **1999**. Surgical wound infection. *H.K. M.J.*, **5**(1): 82-86.
4. Nichols, R.L. **2004**. Current strategies for Prevention of Surgical site infections. *curr. Infect. Dis. Rep.*, **6**(6): 426-434.
5. Kingsley, A. **2001**. Aproactive approach to wound infection. *Nursing standard*. **15**(30): 50-58.
6. Twum-Danos, K.; Grant, C.; Al-Suleimon, S. A.; Abdel-Khader, S.; Al-Awami, H.; Al-Breiki, H.; Taha, S.; Ashoor, A. A. and Wosorun, L. **1992**. Microbiology of postoperative wound infection, a prospective study of 1770 ounds .*J. Hosp. Infect.*,**21**:29-37.
7. Kaneko and Chihara, G. **1992**. Potentiation of host resistance against microbial infections by leutinan and its related polysaccharide. *Adu. Exp. Med. Boil,* **319**: 201-215.
8. Nemunaitis, J. **1997**. Acomparative review of colonystimulating factor Drugs. **54**: 709-729.

9. Soltys, J. And Quinn, M.T. **1999**. Modulation of endotoxin and enterotoxin induced cytokines relase y invivo treatment ith beta. (1,3)- branched beta- (1,3)- glucan. *Infec. Immun*., **67**: 244-252.
10. Tzianabos, A.O. **2000**. Polysaccharide Immunmodulators as therapeutic agents, structural aspects and loiological function. *Clin. Microbiol. Rev*., **13**(4): 523-533.
11. Muller, A.; Raptis, J.; Rice , P.J.; kalbfleisch, J. H.; stout, R.D.; Ensley, H.E.; Bowder, W. And williams, D.L. **2000**. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1,3)-beta –D-glucan receptor in ahuman monocyte-like cell line . *Glycoiology*. **10**: 339-346.
12. Collee, J. G.; Miles, R. S. and Watt, B. **1996**. Test for the identification of bacteria. In: *Makie and Maccartney practical medical microbiology by collee*, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and simmous, A. 4th edition , Churchill livingstone. P: 131149.
13. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; staley, J.T. and Williams, S.T. **1994**. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th (ed.). Awaverly company.
14. Vandepitte, J.; Engbaek, K.; Piot, P.; Heuck, C.C. **1991**. *Basic Laboratory Procedures in clinical bacteriology*. World Health Organization . Geneva.
15. Johnson, K.G. and Perry, M.B. **1976**. Improved techeniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharide. *Can. J. Microbio*l., **22**: 29-34.
16. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and smith, F. **1956**. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*., **28**: 350-356.
17. Lowry , O.H.; roseb rough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. **1951**. Protien measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, **193**: 265-275.
18. Ashwell, G.**1957**. Colorimetric analysis of sugar. In: *Method in Enzymology* by colowick, S.P. and koplan, N.O., (ed.) . vol. III, Academic press Inc. publishers, New York. P: 73-105.
19. Blondeau, J.M.; Laskowski, R.; Borsos, S. and the Canadian Afermenter study Group. **1999**. In –vitro activity of cefepime and seven other antimicrobial agents against 1518 non-fermantative gram-negative bacilli collected from 48 Canadian health care facilities. *J. Antimicrob. Chemother*.,**44**: 545-548
20. Dechamps, C.; Chanal, C.; Sirot, D.; Bacaduc, R.; Romaszko, J. P.; Bonnet, R., Plaidy, A.; Boyer, M.; Carroy, E.; Gbadamassi, M.C.; Laluque, S.; Oules, O.; poupart, M.C.; Villemain, M.; Sirot, J. **2004**. Frequancy and diversity of class A extended – spectrum β-Lactamases in hospitals of the Anvergne, france: a 2 year propective study. *J. antimicrob. Chemother*., **54**:634-639.
21. Jacoby, G.A and Munoz- price , L.S. **2005**. The new beta-lactamase. *J. Med.*, **352**: 380-391.
22. Bush, K.; Jacoby, G.A.; and Medeiros , A.A. **1995**. A functional classification scheme for β- lactamases and it's correlation with molecular structure . Antimicrob. Agents. *Chemother*., **39**:1211-1233.
23. Bradford , P.; Urban , C. Mariano, N.; Progan, S.; Rahal, J. and Bush, K. **1997**. Impenem resistance in klebsiella pneumoniae associated with the combination of ACT-1, aplasmid mediated Amp C β- Lactamase and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob. Agents. *Chemother*., **44**(3): 622-632.
24. Westphal, O.; Luderitz, O.; Eichenberger, E. and keiderling, W. **1952**. Bacterial Lipopolysaccharide, Extraction with phenol-Water and further application of the procedure. *Methods, carbohydrate , chemo*., **5**: 83-91.
25. Carlson, R.W.; Kalembasa, S.; Tnrowski, D.; Pachori, P. and Dalenoel, K. **1987**. Characterization of lipoplysaccharide from a Rhazobium phaseoli mutant that is defective thread development. *J. Bacteriol*., **196**(11): 4923-4928.
26. Dooley, J. S.; Lallier, r.; show, D. H. and Trust, T. J. **1985**. Electrophoretic and Immunochemical analyses of the Lps form various strains of alhydroplide. *J. Bacteriol*., **164**: 263-269.
27. Hauser, P.J.; Agrawal, D. Hackney , J.; pledger, W.J. **1998**. Stat 3 activation accompanies keratinocyte differentiation. Cell. *Groth and Differ*, **9**: 847-855.
28. Pier, G.B. ; Sidberry, H.F.; Zolyomi, S. and Sadoff, J. C. **1978**. Isolation and characterization of high- molecular weight polysaccharide from the slime of pseudomonas aeruginosa immunity. *Infect . Immun*., **34**(2): 461-468.

29. Carrion, M.; Bhat, V.R.; Rushs, B. and Carlson, K.M. **1990**, Isolation and characterization of Bacteriol.,**172**(4):1725-1731.
30. Pier , G.B.; sidberry, H.F. and sadoff, J.C. **1981**. High-molecular weight polysaccharide antigen from psendomonas aeruginosa immuntype. *Infect. Immun*., **34**(2): 461-468.
31. Cox, S.T. and Egon, R.G. **1968**. Action of ethylene diamine tetraacetic acide , tris (hydroxymethyl) aminomethane, and lysozyme on cell walls of pseudomonas aeruginosa. *Can. J. Microbiol*., **14**: 913-922.
32. Michone, F.; shaw, D.H.D. and Banoub, J.H. **1984**. structure of the Lps core isolated from human strain of A. hydrophila. *Eur. J. Biochem.*, **145**: 107-114
33. Wilkinson, S.G. and Galiraith, L. **1975**. Studies of Lipopolysaccharide from pseudomnas aeruginosa. *Eur . J. Iochem.*, **52**: 331-343.
34. Skidmore, R.J.; Chiller, J.M.; Morri son, D.C. and weighe, w.O. **1975**. Immunogenic properties of bacterial lipopo lysaccharide, correlation between the migtogenic, adjuvant and immunogenic activitie *s. J. Immun*., **144**(2): 770-777.
35. Morrision , D.C. and Leive, L. **1975**. Fractions of extraction procedures. *J.Biol. Chem.* **250**(8): 2911-2919.
36. Darveau, R.P. and Hancock, R. E.W. **1983**. Proceduer for Isolation of bacterial lipopolysaccharide from both smooth and rough Pseudomonas aeruginosa and salmonella typhimurium strains. *J. Bacterial.*, **155**(2): 831-838.
37. Fenson, A.H. and Gray, g.W. **1969**. The chemical composition of the lipopolysaccharide of pseudomonas aeruginosa. *Biochem. J*., **144**: 185-198
38. Luchi, M. and Morrison, D.C. **2000**. Comparable endotoxin properties of lipopoly saccharide are manifest in diverse clinical isolates of gram-negative bacteria. *Infect. Immun*., **68**(4): 1899-1904.
39. Takala,A.;Jousela,I. and Jansson,S-E. **1999**. Markersof systemic inflammation predicting organ failure in commnity –acquired septic shock. *Clin.Sci*.,**97**:529-538.
40. Sugawara , S.; Arakaki, R.; Rikiishi, H. And Takada, H. **1999**. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibrolasts and monocytes in a CD_{14} – dependent manner. *Infect. Immun*. **67**:1623-1632.
41. Tabeta , K.; Yamazaki, K.; Akashi, S.; Miyake, K.; Kumada, H.; Umemoto, T. And yoshie, H. **2000**. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from porphyromonas gingivalis in human gingivals fibroblasts. Infect.**41**(22):115-122.
42. Onderdonk, A.B.; Cisnerose, R.L.; Hinkson, P.L. and Ostroff, G.R. **1992**. Anti-infective effect of polybeta- (1.6)- glucotriosyl- beta- (1.3)- glucopyranose glucan invivo. *Infect. Immun.*, **60**:1642-1647.
43. Ishibashi, K. I.; Miura, N. N.; Adachi, Y.; Ogura, N.; Tamura, H.; Tanaka, S. and Ohno, N. **2002**. Relationship between the physical properties of candida albicans cell wall beta-glucan and activation of leukocyte invitro. *Int. Immunopharmacol.*, **2**: 1109-1122.
44. Portera, CA.; Loue, E.J.; Memore, L.; zhang, L.; Muller, A.S Browder., W. and williams, D.L. **1997**. Effect of macrophage stimulation on collagen biocynthesis in the healing wound . *Am. Surg.*, **63**: 125-131.
45. Compton, R.; Williams , D. and Browder, W. **1996**. The beneficial effect of enhanced macrophage function on the healing of bowel anastomoses. *Am. Surg*.,**62**:14-18.
46. Browder , W.; Williams , D.; Lucore , P.; Pretus„ H.; Jones, E.and McNamee, R. **1988**. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing . *surgery*. **104**(2): 224-230.
47. Wakshull, E.; Brunke. Reese, D.; Lindermuth, J.; Fisette, L., Nathans, R.S.; Crowley, J.J.; Tufts, J.C.S; zimmerman, J.; Mackin, W.; Adams, D.S. **1999**. PGG-glucan, a soluble B-glucan enhance the oxidative burst response microbicidal activity and activates an NF-$_{\kappa}$B-like factor in human PMN. Evidence for aglycosphingolipid B-(1-3)-glucan receptor. mmunopharmacology.
48. Soltys, J. And Quinn, M.T. **1999**. Modulation of endotoxin and enterotoxin induced cytokines relase y invivo treatment ith beta. (1,3)- branched beta- (1,3)- glucan. *Infec. Immun.*, **67**:244-252.
49. Adams, D.V.; Revo, S.C.; Petro, J.B.; Nathans, R.; Mackin, W.M. and Wakshull, E. **1997**. PGG-Glucan activates NF-B-like and NF-IL-6-like transcription factor complexes in amurine monocytic cell line. *J. leuko. Biol*., **62**:865-873.

50. Bleicher, P. and Mackin, W. **1995**. Betafectin PGG- glucan. A novel coabohydrate immunomodulator with antiinfective properties. *Ann. Rev. pharmacol. Toxicol.*, **37**:143-166.
51. Decunzo, L.P.; Mackenzie, J.W.; Marafino, B.J. and Devereux, D.F. **1990**. The effect of interleukin-2 administration on wound healing in adriamycin treated rats. *J. Surg. Res.*, **49:** 419-427.
52. Gallucci, R.; simeonova, P.P.; Matheson, J.M.; kommineni, C.; Guriel, J.L; sugawara , T. and Luster, M. **2000**. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6- deficient and immunosuppressed mice. *The FASEB Journal.* **14**:2525-2531.
53. Maytin, J. F. **1999**. Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcriptionfactors C/EBP and AP-2. *Dev. Biol.*, **216**: 164-181.
54. Takela, K.; Kaisho, T.; Yoshida, N.; Takeda, J.; Kishimoto, T. and Akira, S. **1998**. State 3 activation responsible for IL-6 dependent T-cell proliferation through preventing a poptosis: generation and characterization of T-cell-specific state 3-deficient mice. *J. Immunol.*, **161**: 4652-4660
55. Hauser, P.J.; Agrawal, D. Hackney , J.; pledger, W.J. **1998**. Stat 3 activation accompanies keratinocyte differentiation. Cell. *Groth and Differ*, **9**: 847-855.