تأثير السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Escherichia coli* في الاستجابة المناعية للفئران البيض ضد الإصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي.III. معامل البلعمة وفرط الحساسية المتأخر♦

أسماء عبد العزيز علي صدام سالم ياسين

قسم علوم الحياة/ كلية التربية/جامعة الموصل

ABSTRACT

This study investigated the immune system response to infection with secondary hydatid cysts in BALB/c mice activated with lipopolysaccharide (LPS) , extracted from *Escherichia coli*, and infected with protoscoleces of *Echinococcus granulosus* of sheep origin .

Pathological changes occurred in mice activated with LPS were followed, in comparison with the control group (mice infected with protoscoleces but not activated by LPS) along the five months peroid of experiments , depending on certain criteria including changes in the means of non-specific and specific immune response represented by changes in the phagocytic index and foot pad thickness, respectively. Results of the study revealed an increase in the non–specific (innate) and specific (cellular) immunity expressed by increase in the rate of phagocytic index and foot pad thickness, respectively, in activated mice when compared with the control group.The general conclusion which could be drawn from the present results is that, lipopolysaccharide extracted from *E. coli* acts as an active immunomodulator and is able to evoke the innate and cell mediated immunity (CMI) in mice infected with secondary hydatid disease .

الخلاصة

تناولت هذه الدراسة استجابة الجهاز المناعي للاصابة بالاكياس العدرية الثانوية في الفئران البيض BALB/c المفعلة بالسكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Escherichia coli* والمخمجة بالرؤيسات الاولية لدودة المشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* من أصل أغنام.تم متابعة التغيرات المرضية الحاصلة في الفئران البيض المفعلة بالسكر المتعدد الدهني بالمقارنة مع فئران السيطرة (الفئران المخمجة بالرؤيسات الاولية وغير المفعلة بمادة السكر المتعدد الدهني)، طوال فترة التجارب التي

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

استمرت مدة خمسة اشهر، بالاعتماد على معايير معينة تضمنت التغيرات الحاصلة في الاستجابة المناعية غير النوعية، والنوعية المتمثلة بالتغيرات الحاصلة في معامل البلعمة وسمك وسادة القدم، على التوالي. أظهرت نتائج الدراسة زيادة الاستجابة المناعية غير المتخصصة (الطبيعية) والمتخصصة (الخلوية) ممثلة بالزيادة في معدلات معامل البلعمة وسمك وسادة القدم،على التوالي، في الفئران المفعلة مقارنة بفئران السيطرة.

وهكذا يمكن ان نستنتج من الدراسة الحالية ان السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *E.coli* يمكن أن يعمل كمعدل مناعي فعال وهو قادر على حث الاستجابة المناعية الطبيعية والخلوية (CMI) في الفئران المصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي .

المقدمة

إن وظيفة الجهاز المناعي هي حماية الجسم ضد الخمج، واهم وسائل دفاع الجسم ضد الخمج بالأحياء المجهرية الممرضة هي عملية تمثل شكلا من أشكال الدخول الخلوي Endocytosis [1] وقد وضعت تحت اسم الجهاز المناعي غير النوعي Non-specific immune system أي ما تعرف بالمناعة الطبيعية Innate immunity [2] .تنتج تفاعلات فرط الحساسية المتاخر نتيجة للاستجابات المناعية المفيدة طبيعيا والتي قد تعمل بشكل غير مناسب،مسببة تفاعلات الالتهاب وتحطيم النسج،وربما يختلف سبب تفاعل فرط الحساسية من شخص لاخر،وقد وصفت اربعة انواع من تفاعلات فرط الحساسية IV,III,II,I ،ان النوع الرابع او ما يعرف بفرط الحساسية المتاخر هو الاكثر شيوعا ويتم عندما يصطاد المستضد في الخلية البلعمية كما تعد عملية رفض الرقع احدى مظاهر تفاعلات فرط الحساسية[3].

اتجهت البحوث في السنوات الاخيرة الى تنشيط المناعة الطبيعية في جسم المضيف من خلال تعديل قدرته المناعية باستخدام مواد تنظم هدف ونوع واستمرار وكفاءة الجهاز المناعي في الجسم، وقد استعملت لهذا الغرض مواد معزولة من مصادر مختلفة مثل الجراثيم والفطريات والنباتات، ولاحظ الباحثون حدوث تغيرات ايجابية في المضائف المستخدمة ضد الخمج بالأكياس العدرية وامراض طفيلية اخرى [11,10,9,8,7,6,5,4].وقد وجد ان السكر المتعدد الدهني المستخلص من البكتريا سالبة الكرام يعد مساعداً او مقوياً مناعياً يمتلك صفات عديدة تمنيعية وتشطيرية] [18,17,16,15,14,13,12]، ولهذا فقد اختبر في الدراسة الحالية تأثير السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *E.coli* في الاستجابة المناعية الطبيعية والاستجابة المناعية الخلوية للفئران البيض المصابة بداء الاكياس العدرية الثانوي باستخدام معامل البلعمة واختبار فرط الحساسية المتاخر في راحة القدم .

المواد وطرائق العمل

عينة البكتريا : تم الحصول على عزلة نقية من بكتريا *E.coli* المشخصة بتقنية api20E من مختبر بحوث البكتيريولوجي / قسم علوم الحياة / كلية التربية .

استخلاص السكر المتعدد الدهني : تم استخلاص السكر المتعدد الدهني من جدار بكتريا *E.coli* [19] وتم تقدير مكونات السكر المتعدد الدهني[20] .

الحيوانات المختبرية:استخدمت الفئران البيض السويسرية نوع *Mus musculus* في تجارب البحث وقد تم الحصول عليها من غرفة تربية الحيوانات في قسم علوم الحياة / كلية التربية .

الأكياس العدرية:تم الحصول على الأكياس العدرية التي عزلت من أكباد الأغنام المذبوحة، من الجزارين في مدينة الموصل. جمعت الرؤيسات الأولية وتم تقدير حيويتها [21] واستخدمت الرؤيسات الأولية التي بلغت حيوتها(96%) فأكثر وحقنت الفئران في التجويف البريتوني بـ(2000) رؤيس أولي تقريباً.

معامل البلعمة: تم حساب معامل البلعمة وفق المعادلة الاتية [22]:

$$\text{معامل البلعمة} = \frac{\text{عدد البلاعم المختزلة للصبغة}}{\text{عدد البلاعم الكلي}} \times 100$$

مستضد الرؤيسات الأولية :تم تحضير مستضد الرؤيسات الاولية حسب طريقة Dottorini *et al.* [23] واتبعت طريقة Ali-Khan [24] لقياس فرط الحساسية المتأخر .

عوملت مجاميع من الفئران بالسكر المتعدد الدهني (LPS) وقد درست تأثيرات هذه المادة بتراكيز مختلفة على التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض،إذ حقنت الفئران بالتراكيز 50،150،250،500 و1000 مايكروغرام/20غم من وزن الجسم وقد قسمت التجارب حسب المخطط التالي:

رقم التجربة	عدد التفعيلات	التشريح بعد الخمج بالاشهر
1	1 قبل 24 ساعة من الخمج	شهر واحد
2	1 قبل 3 أيام من الخمج	شهرين
3	2 (كل72 ساعة) قبل 6 أيام من الخمج	ثلاثة اشهر
4	3 (كل72 ساعة)قبل 9 أيام من الخمج	اربعة اشهر
5	4 (كل72 ساعة) قبل 12 يوم من الخمج	خمسة اشهر

النتائج

التغيرات الحاصلة في معدلات معامل البلعمة

يتبين من الجدول (1) حدوث ارتفاع في معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة بجرعة واحدة من السكر المتعدد الدهني قبل 24 ساعة من الخمج لمدة شهر واحد بلغ اقصاها في التركيز 1000 مكغم (74.28%) ، وسجلت مجموعة السيطرة (50.44%) وكانت الفروق معنوية باستثناء التركيز 50 مكغم.كما ارتفعت معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة بجرعة واحدة من السكر المتعدد الدهني قبل 72 ساعة من الخمج لمدة شهرين بلغت اقصاها في التركيز 250 مكغم (72.36%) ، وسجلت مجموعة السيطرة (41.06%) وكانت الفروق معنوية في التراكيز 50، 150، 250 مكغم.وكذلك اتضح حدوث ارتفاع في معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة بجرعتين من السكر المتعدد الدهني(كل72 ساعة) قبل ستة ايام من الخمج لمدة ثلاثة اشهر حيث سجل التركيز 1000 مكغم اعلى قيمة لها (64.54%) ،بينما سجلت مجموعة السيطرة (40.76%). وكانت الفروق معنوية في التراكيز 250، 500، 1000 مكغم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.وارتفعت معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة بثلاث جرع من السكر المتعدد الدهني(كل 72 ساعة) قبل 9 ايام من الخمج لمدة اربعة اشهر حيث سجل التركيز 1000 مكغم اعلى قيمة بلغت (71.87%) ، بينما سجلت مجموعة السيطرة (54.00%) وكانت الفروق غير معنوية باستثناء التركيز 1000 مكغم.

كذلك اتضح حدوث ارتفاع في معدلات معامل البلعمة في الفئران المفعلة باربع جرع من السكر المتعدد الدهني(كل 72 ساعة) قبل 12 يوما من الخمج لمدة خمسة اشهر حيث سجل

التركيز 50 مكغم اعلى قيمة بلغت (65.10%) ، وسجلت مجموعة السيطرة (57.98%) وكانت الفروق جميعها غير معنوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

الجدول(1) : تأثير السكر المتعدد الدهني في معامل البلعمة في الفئران المفعلة بجرعة واحدة من السكر المتعدد الدهني قبل 24و72 ساعة من الخمج (التجربة 1 و 2 على التوالي) وبجرعتين وثلاث وأربع جرع (كل 72 ساعة) قبل الخمج (التجربة3و4و5،على التوالي).

التراكيز (مكغم)	معامل البلعمة % للاشهر				
	1	2	3	4	5
C^+	50.44 b ± 14.158	41.06 c ± 12.635	40.76 c ± 9.786	54.00 b ± 9.617	57.98 a ± 8.080
50	52.03 b ± 15.995	68.00 ab ± 5.454	50.32 bc ± 9.757	56.51 ab ± 11.384	65.10a ± 7.606
150	67.56 a ± 6.639	65.15 ab ± 15.757	46.10 bc ± 11.120	61.36 ab ± 5.612	60.55 a ± 5.014
250	68.66 a ± 8.954	72.36 a ± 1.915	54.69 ab ± 8.506	61.22 ab ± 11.277	62.55 a ± 11.862
500	66.20 a ± 5.810	53.66 bc ± 16.835	62.60 a ± 1.244	63.86 ab ± 12.233	63.97 a ± 6.546
1000	74.28 a ± 8.305	45.50 c ± 6.383	64.54 a ± 13.201	71.87 a ± 15.068	61.83 a ± 7.764

- كل رقم يمثل المعدل لخمس مكررات ± الانحراف القياسي، الأحرف المختلفة دلالة على وجود فرق معنوي في المقارنات العمودية فقط
- C^+ : السيطرة .

التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم

يتبين من الجدول (2) ان اعلى معدل سمك في وسادة القدم كان بعد 24 ساعة من حقن المستضد في التركيز 250 مكغم (2.06) ملم ، وسجلت مجموعة السيطرة (0.82) ملم وكانت الفروق جميعها معنوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

الجدول (2) : التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني، وبجرعة واحدة قبل 24 ساعة من الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة لمدة شهر واحد .

التراكيز (مكغم)	معدل سمك وسادة القدم خلال الفترات المختلفة من حقن المستضد		
	3 ساعات	24 ساعة	48 ساعة
C^+	0.14 c	0.82 c	0.10 d
50	0.24 c	1.42 b	0.14 cd
150	0.84 a	1.56 b	0.24 bc
250	0.32 c	2.06 a	0.12 cd
500	0.54 b	1.56 b	0.34 b
1000	0.58 b	1.48 b	0.80 a

يتبين من الجدول (3) ارتفاع معدلات سمك وسادة القدم بعد 24 ساعة من حقن المستضد في التركيز 1000 مكغم (1.92) ملم ، بينما سجلت مجموعة السيطرة (1.08) ملم وكانت الفروق معنوية في المقارنات اعلاه.

الجدول (3) : التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني، وبجرعة واحدة قبل 72 ساعة من الخمج مقارنة بفئران السيطرة المخمجة لمدة شهرين .

التراكيز (مكغم)	معدل سمك وسادة القدم خلال الفترات المختلفة من حقن المستضد		
	3 ساعات	24 ساعة	48 ساعة
C^+	0.18 b	1.08 b	0.08 b
50	0.82 a	1.70 a	0.50 a
150	0.52 a	1.72 a	0.44 a
250	0.82 a	1.34 b	0.42 a
500	0.54 a	1.76 a	0.22 ab
1000	0.80 a	1.92 a	0.26 ab

ويتبين من الجدول (4) حدوث ارتفاع في معدلات سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة إذ سجل التركيز 150 مكغم اعلى معدل بلغ (1.48) ملم بعد 24 ساعة من حقن المستضد. وسجلت مجموعة السيطرة (0.68) ملم وكانت الفروق جميعها معنوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

الجدول (4) : التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني، وبجرعتين (كل 72 ساعة) قبل ستة أيام من الخمج . مقارنة بفئران السيطرة المخمجة لمدة ثلاثة اشهر.

التراكيز (مكغم)	معدل سمك وسادة القدم خلال الفترات المختلفة من حقن المستضد		
	3 ساعات	24 ساعة	48 ساعة
C^+	0.32 b	0.68 c	0.08 b
50	0.36 ab	1.30 ab	0.22 ab
150	0.40 ab	1.48 a	0.30 a
250	0.48 ab	1.14 b	0.28 a
500	0.54 ab	1.00 b	0.40 a
1000	0.60 a	1.12 b	0.32 a

ويتبين من الجدول (5) ارتفاع في معدل سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة اذ سجل التركيز 150 مكغم اعلى معدل بلغ (1.86) ملم بعد 24 ساعة من حقن المستضد ، وسجلت مجموعة السيطرة (0.98) ملم وكانت الفروق جميعها معنوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

الجدول (5) : التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني، وبثلاث جرع (كل 72ساعة) قبل تسعة أيام من الخمج. مقارنة بفئران السيطرة المخمجة لمدة اربعة اشهر .

التراكيز (مكغم)	معدل سمك وسادة القدم خلال الفترات المختلفة من حقن المستضد		
	3 ساعات	24 ساعة	48 ساعة
C^+	0.40 a	0.98 d	0.10 c
50	0.50 a	1.54 b	0.52 a
150	0.56 a	1.86 a	0.40 abc
250	0.70 a	1.42 bc	0.42 ab
500	0.70 a	1.22 cd	0.14 bc
1000	0.60 a	1.54 b	0.40 abc

كما يتبين من الجدول (6) حدوث ارتفاع في معدلات سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة وبلغت اقصاها في التركيز 50 مكغم (1.54) ملم بعد 24 ساعة من حقن ، بينما سجلت مجموعة السيطرة (0.54) ملم وكانت الفروق جميعها معنوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

الجدول (6) : التغيرات الحاصلة في معدل سمك وسادة القدم في الفئران المفعلة بتراكيز مختلفة من السكر المتعدد الدهني، وبأربع جرع (كل 72 ساعة) قبل اثني عشر يوما من الخمج . مقارنة بفئران السيطرة المخمجة لمدة خمسة اشهر.

التراكيز (مكغم)	معدل سمك وسادة القدم خلال الفترات المختلفة من حقن المستضد		
	3 ساعات	24 ساعة	48 ساعة
C^+	0.16 d	0.54 c	0.10 b
50	0.64 bc	1.54 a	0.30 a
150	0.82 ab	1.32 ab	0.22 ab
250	0.20 d	1.52 a	0.16 ab
500	0.54 c	1.14 b	0.30 a
1000	0.96 a	1.40 ab	0.22 ab

المناقشة

بينت نتائج الاستجابة المناعية غير النوعية المتمثلة بفعالية البلعمة باستخدام صبغة (NBT) في الفئران المفعلة بالسكر المتعدد الدهني فعالية عالية للبلعمة بلغت اقصاها (74.28%) في التركيز 1000 مكغم بعد شهر من التفعيل.وقد يعزى السبب الى ان السكر المتعدد الدهني منشط قوي للبلاعم [12] مما يؤدي الى رفع قدرتها على ابادة الجراثيم والطفيليات والخلايا السرطانية [25]،كما وجد ان البلاعم المنشطة بالسكر المتعدد الدهني لسلالات معينة من بكتريا *E. coil* تكتسب القدرة على ابادة الابتدائيات الطفيلية *Leishmania donovani* والفطريات *Candida albicans* وبكتريا *Staphylococcus aeureus* بكفاءة عالية[26].وجاءت هذه النتائج موافقة لما توصل اليه Ali&Abdulla [28,27] اللذين لاحظا زيادة معنوية في معدلات معامل البلعمة في الفئران المعاملة بالسكر المتعدد الدهني والسكر المتعدد المستخلصين من بكتريا *Ps. aeruginosa* مقارنة بفئران السيطرة المخمجة، كما اتفقت مع نتائج Ali &Yousif [4]عند دراستهما للسكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *E.coli*.

اظهرت مجموعة السيطرة في الدراسة الحالية انخفاضا في معامل البلعمة، وقد يعزى ذلك الى دور الطفيل في تحفيز انتاج اللمفوكينات التي تثبط عملية قتل الرؤيسات الاولية [29]

وعند دراسة المناعة المتواسطة بالخلية Cell - Mediated Immunity (CMI) من خلال اختبار فرط الحساسية المتأخر (DTH) في وسادة قدم الفئران ، لوحظ في الدراسة الحالية حدوث ارتفاع واضح في معدل سمك وسادة القدم في مجاميع الفئران المفعلة بالسكر المتعدد الدهني بلغ اقصاه (2.06) ملم في التركيز 250 مكغم بعد شهر من التفعيل بالسكر

المتعدد الدهني، بعد 24 ساعة من حقن المستضد مقارنة بمجموعة السيطرة المخمجة وغير المفعلة. ويمكن أن تعزى هذه الزيادة إلى قدرة السكر المتعدد الدهني على حث المناعة الخلوية المتمثلة بالانتفاخ في وسادة القدم والذي استمر بعد 48 ساعة من حقن المستضد، وجاءت هذه النتائج موافقة لما ذكره Ryu&Kim [14] اللذين وجدا ان المستضد المكون من معقد البروتين – السكر المتعدد الدهني المستخلص من بكتريا *Pasteurella multocida* حث انتفاخا كان ملحوظا بعد 18 ساعة من الحقن ووصل الانتفاخ ذروته (اكثر من 2.5 ملم) بعد مرور 48 ساعة وانخفض بعد ذلك ببطء حتى 7–10 أيام مؤشرا حث فرط الحساسية المتأخر الذي يعد دليلا على المناعة الخلوية،اتفقت النتائج الحالية مع ما لاحظهAsherson&Ptak [30] من حدوث فرط الحساسية المتأخر الناتج عن حقن الفئران بالمستضد الممزوج مع مساعد فروند Freund's adjuvant إذ كان الانتفاخ بعد 24 ساعة من التحسيس أكثر منه بعد 4 ساعات، كما اظهرت فئران السيطرة المخمجة غير المفعلة استجابة خلوية منخفضة Depressed CMI وهذا يشابه ما لاحظه كل من [24] في الفئران المخمجة بالمشوكات متعددة الحجرات و[31,11] في الفئران المخمجة بالمشوكات الحبيبية.

تشير نتائج الدراسة الحالية أن لهذه المادة تأثيرا معدلا مناعيا مهما من خلال تحفيزها لكلا نوعي الاستجابة المناعية الطبيعية والمكتسبة، والمتمثلة بمعامل البلعمة وفرط الحساسية المتأخر، على التوالي ، في الفئران المصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي ، وربما تظهر الدراسات المستقبلية إمكانية استخدامها كمساعد مناعي فعال مع بعض العقاقير التي تستخدم ضد داء الأكياس العدرية .

المصـــــــادر

1.Hyde R.M. Immunology. 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins USA (2000).

2.Roitt I.M. Essentials of immunology. 6th ed., Blackwell Scientific Publication, London (1988).

3.Roitt I., Brostoff J. and Male D. Immunology. 6th ed Harcourt Publishers Limitid. UK (2001).

4. Ali A.A. and Yousif S.Y. Accepted for publication in: Iraqi J. Vet. Sci. (2007).

5.Ali A.A. and Yasseen S.S. 4th scientific conference , Coll.of Veterinary Medicine,Univ.Mosul,P:211-228 (2006).

6.Ali, A.A. Riv. Parassitol., XVII (LX1)-2: 183-193 (2000).

7.Ali, A.A. and Salih, N.E. Riv. Parassitol., XVII (LX1)-2: 175-182(2000a).

8.Ali, A.A. and Salih, N.E. Riv. Parassitol., XVII (LX1)-2: 195-202 (2000b)

9.Ali, A.A. and Salih, N.E. Riv. Parassitol., XVII (LXI)-3:299-313 (2000c).
10.Ali, A.A. and Salih, N.E. Riv. Parassitol., XVII (LXI)-3:333-339 (2000d).
11.Ali, A.A. and Salih, N.E. Parassitol., XVIII (LX11)-2: 162-170 (2001).
12.Ulevitch R.J., Mathison J.C., Schumann R.and Tobias P.S. J. Trauma, 30 (12) : S 189 – S 1(1990).
13.Dreisbach V.C., Cowley S. and Elkins K.L. Infect Immun., 68 (4) : 1988 – 1996 (2000).
14.Ryu H. and Kim C. J. Vet. Sci., 1 (2) : 87 – 95 (2000).
15.Backhed F., Soderhall M., Ekman P., Normark S. and Ritcher-Dahlfors A. Cell Microbiol., 3 (3): 153-158 (2001) .
16.Pulendran B., Kumar P., Cutler C. W., Mohamadzadeh M., VanDyke T. and Banchereau J. J. Immunol.,167(9):5067-5076(2001).
17.Su L., Goyert S.M., Fan M., Aminlari A., Gong K.Q., Klein R.D., Myc A.,Alarcon W.H.,Steinstraesser L., Remick D.G. and Wang SC. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 283(3):640-645(2002).
18.Pedraza-Sanchez S., Gonzalez-Hernandez Y., Escobar –Gutierrez A. and Ramachandra L. Int. immunopharmacol., 6(4):635-664 (2006).
19.Learen D.B., Brestel E.P., and Seetharama S. Infect. Immun., 55: 1813-1818 (1987).
20.Dubois M., Gille A., Hamilten J.H., Roler B.A. and Smith F. Anal. Chem., 28: 350-356 (1956).
21.Smyth J.D. Proc 13th Int. Cong. Hydatid Madrid : 84-95 (1985).
22.Park P.H., Filkring S.M. and Smith Wick E.M. Lancet, 2: 532-534 (1968).
23.Dottorini S., Sparvoli M., Bellucci C. and Magnini M. Ann. Trop. Med. Parasitol., 74: 43-49 (1985).
24. Ali-Khan Z. Exp. Parasitol., 46 : 157-165 (1978).
25.Odean M.J., Frane C.M., Vander M., Tomai M.A. and Johnson A.G. Int. J. Immunopharmacol., 1 : 781 – 787 (1990).
26.Hockertz S. Arzneimittelforschung, 40 (9) : 1068 – 1072 (1990).
27.Ali A.A. and Abdulla I.T. Riv. Parassitol., XX (LXIV)- 1 : 17 – 24 (2003).
28.Ali A.A. and Abdulla I.T. Riv. Parassitol., XXI (LXV)- 1 : 17 – 24 (2004).
29.Jenkins P., Dixon J.B., Rakha N.K. and Carter S.D. Parasitology, 100: 309-315 (1990).
30.Asherson G.L. and Ptak W. Immunology, 15: 405-416 (1968).
31.Kivity S., Heno N., Greif Z., Fireman E. and Topilsky N. Ann. Aller., 71(3): 247-250 (1993).