جامعة الموصل

كلية العلوم

دراسة تجريبية في التعديل المناعي للسيطرة على الاصابة ببكتريا *Acinetobacter baumannii* المقاومة للمضادات الحيوية باستخدام العكبر وسم النحل

رنا ابراهيم محمد عبد الله

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتور
أديبة يونس شريف النعمان

الاستاذ المساعد الدكتور
محمود عبد الجبار حسين الطوبجي

1443هـ

2022م

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى تحديد دور العكبر وسم النحل في زيادة السيطرة على الإصابة بالبكتريا *Acinetobacter baumannii* المقاومة للمضادات الحيوية.

تم اختيار عزلة لهذه البكتريا الأعلى مقاومة للمضادات الحيوية وبنسبة 93.75٪ والتي أظهرت امتلاكها لعدد من عوامل الضراوة منها تكوين الأغشية الحيوية والقدرة على النمو بشكل قشور وامتلاكها للجين *OMPA* المسؤول عن تكوين الأغشية الحيوية ومقاومة المضادات الحيوية، وأظهرت قدرتها لتحليل الدم ولإنتاج الإنزيم الحال للبروتين والإنزيمات الحالة للدهون.

استخدمت هذه العزلة لأحداث خمج الجروح التجريبية في مجموعة من الفئران المختبرية، وتم دراسة تأثير التمنيع بمادتي العكبر وسم النحل في السيطرة على هذه الإصابة من خلال تنشيط عدد من المعايير المناعية.

أظهرت النتائج حدوث زيادة في الفعالية البلعمية لمجاميع الفئران الممنعة بتراكيز العكبر (50.40,30) ملغم/كغم، إذ بلغت نسبتها 0.39±92٪ للعكبر والمعالجة بالمضاد Rifampin و0.57±90٪ لنظيرتها غير المعالجة بالمضاد، وإن هذه التراكيز أظهرت قدرة أعلى في التحفيز من التراكيز 200,150,100 ملغم/كغم، إذ بلغت في المجموعة الممنعة بهذه التراكيز 0.33±51٪ و0.39±56٪ لنظيرتها المعالجة وغير المعالجة فيما بلغت 0.39±53٪ في مجموعة السيطرة الموجبة المخمجة بالبكتريا والمعالجة بالمضاد الحيوي، كما ازدادت هذه الفعالية بعد التمنيع بسم النحل، إذ بلغت 0.70±80٪ و0.35±84٪ للمجموعتين الممنعة المعالجة وغير المعالجة بالمضاد على التوالي والتي استمرت بالارتفاع بعد الإصابة والعلاج، إذ وصلت 0.46±64٪ في المجموعة المخمجة الممنعة غير المعالجة بالمضاد والتي كانت أقل من المجاميع الممنعة بالعكبر.

وتفوقت التراكيز (50,40,30) ملغم/كغم في تحفيز إنتاج السايتوكين IL-17، إذ بلغ تركيزه (125.68±6.26) بيكو غرام/سم^3 في المجموعة الممنعة ذات الجروح المخمجة المعالجة فيما بلغ (24.20±1.07) في نظيرتها الممنعة بالتراكيز (200,150,100) ملغم/كغم مقارنة مع مجموعة فئران السيطرة الموجبة ذات الجروح المخمجة والمعالجة، إذ بلغ (32.28±8.00) بيكو غرام/سم^3 وكان (54.49±0.38) بيكو غرام /سم^3 عند فئران السيطرة السالبة فيما انخفض مستوى السايتوكين IL-37 عند مجاميع الفئران الممنعة بالتراكيز (50,40,30) للعكبر ذات الجروح المخمجة المعالجة بالمضاد، وبلغ (3.06± 0.06) بيكو غرام/سم^3 مقارنة بـ(2.44±0.02) بيكو غرام/سم^3 في نظيرتها الممنعة بالتراكيز (200,150,100) ملغم/كغم فيما بلغ (11.54±3.72 و15.66±7.76) بيكو غرام/سم^3 عند فئران السيطرة الموجبة المخمجة غير المعالجة والمعالجة على التوالي.

وأظهرت الدراسة حدوث زيادة في تركيز IL-17 في مجاميع الفئران الممنعة بسم النحل غير المخمجة والمخمجة غير المعالجة، إذ بلغت(156.6+0.40) بيكو غرام/سم^3 و(147.90±4.31)

بيكوغرام/سم^3 للمجموعتين على التوالي فيما أظهرت انخفاضاً في مستوى IL-37، إذ بلغ مستواه (0.90± 2.89 و 0.12±3.05) بيكو غرام/سم^3 للمجموعتين على التوالي.

وأظهرت النتائج حدوث زيادة معنوية في التعداد الكلي لخلايا الدم البيض في مجاميع الفئران الممنعة بالتراكيز (50,40,30) ملغم/كغم من العكبر، إذ بلغت (15.9±0.09) ×10^3 /مايكروليتر للمجموعة الممنعة غير المخمجة و(11.7±0.01)×10^3 مايكروليتر لنظيرتها المخمجة غير المعالجة فيما كانت (5.4±0.02)×10^3 / مايكروليتر عند فئران السيطرة السالبة وان مستواها ارتفع قليلاً عند الفئران الممنعة بالتراكيز (200,150,100) ملغم/كغم إذ بلغت (10.5±0.06)×10^3/مايكروليتر في الفئران الممنعة غير المخمجة و(8.2±0.05)×10^3 /مايكروليتر لنظيرتها غير المعالجة، كما سببت التراكيز الواطئة أيضاً زيادة معنوية في تعداد الخلايا اللمفاوية، إذ بلغت (8.1±0.02) و (5.7±0.04)×10^3 خلية لمفاوية/مايكروليتر للمجموعتين غير المعالجة والمعالجة مقارنة بمستواها في المجاميع الممنعة بالتراكيز (200,150,100) ملغم/كغم، إذ بلغت (4.2±0.03) و(10.4±0.04)×10^3 /مايكروليتر للمجموعتين غير المعالجة والمعالجة ومع مجموعة السيطرة السليمة، إذ بلغت (3±0.02)×10^3 / مايكروليتر، وتفوقت التراكيز (200,150,100) ملغم/كغم على التراكيز (50,40,30) ملغم/كغم فيما يخص أعداد الخلايا الحبيبية، إذ ازدادت اعدادها من (1.1±0.03)×10^3 خلية حبيبية/مايكروليتر عند فئران السيطرة السالبة إلى (5.7±0.04)×10^3 /مايكروليتر في المجموعة الممنعة بهذه التراكيز غير المخمجة و(3.7±0.04)×10^3 /مايكروليتر في المجموعة المعالجة فيما كانت (0.6+0.01) و(1.4±0.01)×10^3 /مايكروليتر لنظيراتها الممنعة بالتراكيز الواطئة.

وسبب التمنيع بسم النحل زيادة الأعداد الكلية لخلايا الدم البيضاء، إذ بلغت (11.9±0.03)×10^3 خلية/مايكروليتر والخلايا اللمفية والحبيبية، إذ بلغت(6.6±0.03 و0.01 ±5.5)×10^3 خلية لمفية/مايكروليتر في المجموعتين الممنعة غير المخمجة وغير المعالجة على التوالي وبلغت (4.1±0.01 و2.2±0.01 و3.1±0.05)×10^3 /مايكروليتر في المجاميع الممنعة غير المخمجة والممنعة غير المعالجة والمعالجة على التوالي.

وتفوقت التراكيز (50,40,30) ملغم/كغم على التراكيز (200,150,100) ملغم/كغم من العكبر في تحفيز فعالية المتمم القاتلة للبكتريا، إذ سببت زيادة في النسبة المئوية للقتل إلى 0.39±70٪ بعد ثلاث ساعات من التحضين في مجموعة الفئران الممنعة غير المخمجة وبلغت 100٪ بعد ساعة من التحضين في المجموعة الممنعة المخمجة المعالجة بالمضاد الحيوي ووصلت إلى 100٪ في نظيرتها غير المعالجة بعد ثلاث ساعات من التحضين مقارنة بمجموعة الفئران السليمة، إذ بلغت 0.45±50٪ فيما بلغت0.74+52٪ في مجموعة الفئران الممنعة بالتراكيز (200,150,100) غير المخمجة، ووصلت (0.77±92٪) و(0.75±96.4) بعد ثلاث ساعات من التحضين للمجامبع الممنعة بهذه التراكيز غير المعالجة والمعالجة على التوالي.

أما سم النحل فكان تأثيره أقل، إذ بلغت الفعالية إلى (68±0.09 ٪) بعد ثلاث ساعات من التحضين في الفئران الممنعة غير المخمجة ووصلت إلى (100±0.07 ٪ و87.2±0.45 ٪) في المجاميع المخمجة الممنعة غير المعالجة والمعالجة على التوالي.

وبينت نتائج الدراسة النسجية حدوث الشفاء التام والتئام الجروح في مجاميع الفئران الممنعة بالتراكيز (50,40,30) ملغم/كغم والتراكيز(200,150,100) من العكبر المعالجة وغير المعالجة بالمضاد الحيوي بعد 21 يوم من الخمج التجريبي فيما لوحظ عدم اكتمال التئام الجروح وارتشاح الخلايا الالتهابية ووجود النسيج الضام وعدم إعادة الظهارة في الفئران الممنعة بسم النحل وفئران السيطرة في نفس الفترة.

وأظهرت الدراسة اختفاء النمو البكتيري في موقع الاصابة في اليوم 10 في المجاميع الممنعة بالعكبر بتراكيزه المختلفة بينما اختفى النمو البكتيري عند اليوم 15 في المجاميع الممنعة بسم النحل ووصلت إلى 21 يوم عند مجاميع السيطرة الموجبة.

Summary

The aim of this study is determined the role of propolis and bee venom in increasing the resistance against infection with *Acinetobacter baumannii* antibiotics resistant.

An isolate of this bacterium was selected which has a higher resistance to antibiotics (93.75%), which showed many virulence factors like biofilm formation with the ability of pellicle growth and the presence of OMPA gene which is responsible for biofilm formation and antibiotics resistance and show its ability to hemolyze blood and produce protease and lipase enzymes.

This Isolate was used for induction of experimental infection in a group of laboratory mice and the effect of immunization with propolis and bee venom in the control on this infection through the activation of many immune parameters was studied.

The results showed an increase of phagocytic activity in mice immunized with propolis at a concentration (30, 40, 50) mg/kg, as its percentage was (92±0.39%) for immunized propolis and rifampin treated and (90±0.57%) for immunized untreated mice, and this concentration showed a higher ability of activation more than the high concentration (100,150,200) mg/kg as the phagocytic activity in mice group immunized with this concentration was (51±0.33%) and (56±0.39%) for treated and untreated groups, while it was (53±0.39%) in mice infected with the bacteria treated with antibiotic and this activity increased after immunization with bee venom to (80±0.70%) and (84±0.35%) for the immunized treated and untreated groups respectively which continue in increase after infection and treatment to be (64±0.46%) in an immunized infected and untreated group which was lower than the propolis immunized groups.

The results showed a significant increase in total White Blood Cell count in mice groups immunized with (30,40,50) mg/kg of propolis (15.9±0.09) $x10^3/\mu L$ for immunized non-infected group and (11.7±0.01) $x10^3/\mu L$ for an infected untreated group while it was (5.4±0.02) $x10^3/\mu L$ in mice of the control negative group, it's level slightly increased in the mice immunized with the concentration of (100,150,200) mg/kg (10.5±0.06) $x10^3/\mu L$ in the immunized non-infected mice and (8.2±0.05) $x10^3/\mu L$ for the same immunized untreated mice the low concentrations causes a significant increase in lymphocyte count (8.1±0.02) and (5.7±0.04) $x10^3/\mu L$ for both untreated and treated groups compared to it is count within the groups immunized with the concentration (100,150,200) mg/kg which was (4.2±0.03) and (10.4±0.03) $x10^3/\mu L$ for untreated and treated groups and to the negative control group, which was (3±0.02) $x10^3/\mu L$.

The groups immunized with (100, 150, 200) mg/kg of propolis showed a higher effect on granulocyte count than in groups immunized with the concentration of (30, 40, 50) mg/kg, as the granulocyte count increased from (1.1±0.03) $x10^3/\mu L$ in negative control mice to (5.7±0.04) $x10^3/\mu L$ in the immunized infected group and (3.7±0.04) $x10^3/\mu L$ in a treated group while it was (0.6±0.01) and (1.4±0.01) $x10^3/\mu l$ in those immunized with the lower concentrations.

Immunization with bee venom caused an increase in the total WBC which reached (11.9±0.03) $x10^3/\mu L$ and the lymphocyte and granulocyte counts were reached (6.6±0.03) and (5.5±0.01) $x10^3$cell/μL respectively in both immunization uninfected and immunized untreated groups respectively, while granulocyte count was (4.1±0.01 and 2.2±0.01) and (3.1±0.05) $x10^3/\mu L$ in the immunized uninfected and immunized untreated and treated respectively.

The concentration of (30, 40, 50) mg/kg of propolis showed a higher effect in stimulating the Complement activity than the concentration of (100, 150, 200) mg/kg which caused an increase in the bactericidal effect as it reached (70±0.39%) after three hours of incubation in immunized uninfected mice, while the percentage was (100%) after one hour in the immunized infected and treated group and it reached (100%) in those untreated after three hours of incubation compared with negative control which reached (50±0.45%) while it reached (52±0.74%) in the uninfected immunized with (100, 150, 200) mg/kg, it reached (92±0.77%) and (96.4±0.75%) after three hours of incubation in the immunized untreated and treated groups respectively, while the immunization with bee venom showed a lower effect as this activity was reached (68±0.09%) after three hours of incubation in an immunized uninfected group, while it reached (100±0.07%) and (87.2±0.45%) in immunized groups infected untreated and treated respectively.

The concentration of (30, 40, 50) mg/kg of propolis showed a higher effect than the concentration of (100, 150, 200) mg/kg in stimulating the production of IL-7, as its concentration was (125.68±6.26) pg/cm^3 in the immunized infected and treated group, while it was reached (24.20±1.07) pg/cm^3 in the group of the same treatment but immunized with the concentration of (100, 150, 200) mg/kg compared with an infected positive control group which reached (32.28±8.00) pg/cm^3 and (54.69±0.38) pg/cm^3in the negative control group, the level of cytokine IL-37 was reduced in the group immunized with a concentration of (30, 40, 50) mg/kg of propolis with infected and treated wounds as it reached (3.06±0.06) pg/cm^3compared with (2.44±0.02) pg/cm^3in those immunized with concentration (100, 150, 200) mg/kg, while reached (11.54±3.72 and

15.66±7.76) pg/cm^3 in the infected control positive mice untreated and treated respectively.

The study showed an increase in the concentration of IL-17 in the mice of the uninfected group and infected untreated group immunized bee venom which was (156.6±0.40) pg/cm^3 and (147.90±4.31) pg/cm^3 for both groups respectively, while it showed a reduction in the level of IL-37 which reached (2.89±0.90) and (3.05±0,12) pg/cm^3 for both groups respectively.

The results of the histological study showed complete healing of the wounds in the mice groups immunized with both the concentrations of (30, 40, 50) mg/kg and (100, 150, 200) mg/kg of propolis treated and untreated after 21 days of experimental infection, while the healing was incomplete and the presence of infiltration and inflammatory cells with the presence of connective tissue and the absence of re-epithelialization in mice group immunized with bee venom and the control mice at the same period.

The results showed the absence of bacterial growth at the site of infection on the 10th day in immunization groups with different concentrations of propolis, while the bacterial growth was absent at 15 days in groups immunized with bee venom and it reached 21 days in control positive groups.

University of Mosul
College of Science

Experimental Study of Immune Modulation to Control Antibiotic Resistant of *Acinetobacter baumannii* Infection by Using Propolis and Bees Venom

Rana Ibrahim Mohammed Abdullah

Ph.D. Thesis
Biology/ Microbiology

Supervised by

Prof.
Dr. Adeba Younis Shareef Al-Nuaman

Assist. Prof.
Dr. Mahmood Abdul-Jabar Hussien Al-Tobajy

1443 A.H **2022 A.D**