

University of Mosul
College of Science



**Role of Lipopolysaccharide and Lipid A of
Escherichia coli on number of Immunological and
Histological variables**

Dhuha Jasim Mohammed Al-Soufi

Ph.D. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Hiyam Adel Al-Taii

1442 A.H.

2020 A.D.

Summary

The current study examined the role of Lipopolysaccharide (LPS) and Lipid A (LPA) of *Escherichia coli* which isolated from urine sample of patients had Urinary Tract Infection (UTI) arriving to Ibn-Al-Atheer teaching hospital in Mosul, in period from 1/9/2018 to 1/10/2018 in an activity of some immune variables such as estimation the total and differential number of white blood cells (W.B.C.) and determination the levels of cytokines Interleukin-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and the toxic on Hepatocytes. The purity of *E. coli* isolation predicted by development it on selective medium MacConkey Agar where appeared as pink colonies after incubation period 24 hours in 37 °C, a thin smear of bacteria prepared and stained by gram stain, the bacteria appeared as gram negative short bacilli then prepared pure culture and diagnosis by using biochemical tests and Vitek 2. The pure Bacteria cultivated in the Brain Heart Infusion (BHI) medium, as well as the LPS production medium, which included bacterial cultivation in the primary medium and then transferred to the LPS production medium, where it found that (BHI) gave more dense growth than the LPS production of LPS medium, so it used as a good medium in mass production of LPS. LPS isolation using a modified method, the chloroform-methanol method and the EDTA method. Where the two methods combined to obtain the best results in isolation of the LPS, which was later used to isolate the LPA.

The purity of LPS and LPA were confirmed using the Gas Chromatography/mass spectrophotometer GC/MS technique, the result for the LPS was contained several compounds in different proportions such as 2-Butoxyethylacetate (32.22%), 5-Isopropenyl-2-Methyl-2-Cyclohexa (4.42%), Hexadecanoic acid Methyl ester (4.19%), Triacontane-7-bromo- pentadecane (3.45%), Heneicosane (3.8%), n-Hexadecanoic acid (42.48%). The LPA included several compounds such as 2-Butoxyethylacetate (67.02%),

II

Nanodecane (4.21%), n-Hexadecanoicacid (11.95%), Henericosane (10.82%), 11-Octadecenoicacid methylester (6.00%). The amount of total protein was estimated using the Lowry method, and the amount of nucleic acids was estimated using the Nanobiodrope apparatus.

In this study ,a comparison made between LPS and LPA in terms of the effect on the total and differential number of white blood cells, as well as ability to stimulate the production of IL-6 and TNF- α cytokines and the toxic effect on liver cells, where 24 Swiss Albino Rats used and a dose calculated for LPS and LPA, depending on the weight of the animal, where the rats divided in to two groups, each group containing three groups included the concentrations were 625,1250,2500 $\mu\text{g}/100$ g of body weight, while the fourth group was control. the intraperitoneal injection carried out in three doses between each dose 48 hours with the last booster dose.

The experiments lasted for two weeks, blood collected and dissected to obtain the liver, which was put in 10% formalin for fixation, preparation of tissue sections and stained with hematoxylin and eosin dye and examined. According to the differential number of white blood cells, the levels of cytokines under study IL-6 and TNF- α determined by the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) technique (ELISA-Sandwich-Ag-Ab). Our results for LPS and LPA were statistically analyzed using A nova SPSS The results of the current study showed a significant increase at a significant level $P>0.05$ in relation to the total number of white blood cells for concentrations between 100 and 2500 $\mu\text{g} / 100$ g of body weight for the injected LPS where it was (8.416×10^3 and 7.683×10^3) ML respectively compared to the control That was (5.35×10^3) ML while we observe there was no significant difference in the total number of white blood cells in the case of LPA injection compared to the control. The study also showed there was a significant increase at the level of significant $P<0.05$ in the numbers of monocytes and Lymphocytes for all concentrations of LPS compared to control, the significant difference recorded between the same concentrations as Lymphocyte was estimated at (5.782×10^3 ,

III

5.830×10^3 , 6.083×10^3) ML for concentrations (625,1250,,2500) $\mu\text{g}/100\text{g}$ of body weight respectively, compared to the control that is 3.502×10^3 ML, and monocyte was estimated ($0.361 \pm 0.044 \times 10^3$, $0.356 \pm 0.053 \times 10^3$, $0.399 \pm 0.090 \times 10^3$) ML for concentrations (625,1250,2500) $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ body weight, respectively, compared to control. while we noticed a significant decrease at the level of $P < 0.05$ in the number of Lymphocytes cells and also Monocytes in the case of LPA injection where they were (3.050×10^3 , 3.175×10^3 , 4.154×10^3) ML and the Monocytes were (0.070×10^3 , 0.184×10^3 , 0.135×10^3) ML for concentrations (625,1250,2500) $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ of body weight, respectively, compared to the control. As for neutrophils, there was no significant differences in their numbers compared to control with respect to LPS, while in LPA recorded a significant increase at a significant level $P < 0.05$ were equal to (5.225×10^3 , 5.061×10^3 , 6.401×10^3) ML for concentrations (625,1250,2500) $\mu\text{g} / 100\text{g}$ of body weight, respectively, compared to the control equivalent to 3.599×10^3 ML. The present study showed a significant increase in concentrations of IL-6 and TNF- α cytokines compared to control at the level of significant $P < 0.05$ concentration increased with increasing LPS concentration. While LPA showed a significant decreased in concentrations of IL-6 at a decreased concentrations. In the same time, LPA had a significant effect on production of TNF- α in a high concentrations 625, 1250 and 2500 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ of body weight, as well as histological changes in sections of Liver that prepared in an injected animals for both LPS and LPA, where it showed clear destruction of hepatic cells with infiltration of immune cells within the liver tissue.

الخلاصة:

تحررت الدراسة الحالية عن دور متعدد السكريات الدهني (LPS) Lipopolysaccharide و مركب الـ Lipid A (LPA) لبكتريا الاشريكية القولونية *Escherichia coli* المعزولة من عينة ادرار لمريض مصاب بالتهاب المجاري البولية (UTI) Urinary Tract Infection في مستشفى ابن الاثير التعليمي في الموصل للفترة من 2018/9/1 الى 2019/12/1 ، في فعالية بعض العوامل المناعية قيد الدراسة مثل تقدير العدد الكلي والعدد التفريقي لخلايا الدم البيضاء وتحديد مستويات بعض الساييتوكينات المناعية مثل الانترلوكين-6 (IL-6) والعامل التخري الورمي-الفا Tumornecrosis factor والتاثير السمي لخلايا الكبد (TNF- α) .

تم التأكد من نقاوة عزلة بكتريا الاشريكية القولونية بزراعتها على وسط انتقائي وهو وسط الماكونكي اكار حيث ظهرت المستعمرات بعد تحضينها بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة وردية اللون تم تحضير مسحة وصبغت بصبغة كرام حيث ظهرت البكتريا بشكل عصيات حمراء اللون سالبة لصبغة كرام بعد ذلك زرعت على الاكار المائل للحصول على مزرعة نقية شخصت باستخدام جهاز Vitek 2 وكانت النتيجة نقاوة العزلة بتقدير 98% . زرعت البكتريا في وسط نقيع المخ والقلب Brain Heart Infusion (BHI) وكذلك وسط انتاج الـ LPS الذي شمل زراعة البكتريا في الوسط الاولي ثم نقلت الى الوسط الانتاجي للـ LPS حيث تبين ان (BHI) اعطى نمو كثيف بصورة اكبر من وسط انتاج الـ LPS ولذلك تم استخدام كوسط جيد في انتاج الـ LPS بكميات كبيرة . عزل الـ LPS بطريقة محورة لطريقة الكوروفورم-الميثانول وطريقة الـ EDTA حيث مزجت الطريقتين للحصول على افضل النتائج في عزل الـ LPS والذي استخدم فيما بعد في عزل الـ LPA

تم اختبار نقاوة LPS و LPA باستخدام تقنية (GC/MS) Gas chromatography/ mass spectro phcrtomter وكانت نتيجة الاختبار للـ LPS احتواءه على مركبات عديدة وبنسب مختلفة مثل 2-Butoxyethylacetate (32.22%), 5-Isopropenyl-2-Methyi-2-Cyclohexa (4.42%), Hexadecanoic acid Methylester (4.19%), Triacontane-7-bromo-pentadecane (3.45%), Heneicosane (3.8%), n-Hexadecanoic acid (42.48%) LPA فشملة عدة مركبات مثل n- (4.21%), Nanodecane (67.02%), 2-Butoxyethylacetate (11.95%), Hexadecanoicacid (10.82%), Henericosane (6.00 %) methylester كما قدرت كمية البروتين الكلي بطريقة Lowry وقدرت نسبة الاحماض النووية باستخدام جهاز الـ Nanobiodrope .

في هذه الدراسة تمت المقارنة بين LPS و LPA من حيث التأثير على العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيضاء وكذلك القدرة على تحفيز انتاج السايٲوكينات IL-6 و TNF- α واثاير السمي على خلايا الكبد، حيث اسٲخدم 24 جرد ابيض سويسري Swiss albino rats و حسب جرع LPS و LPA بالاعتماد على وزن الحيوان حيث تم تقسيم الجرذان الى مجموعتين كل مجموعة تحوي على ثلاث مجاميع بواقع ثلاث حيوانات لكل مجموعة تضمنت التراكيز 625، 1250، 2500 مايكروغرام/100 غرام من وزن الجسم، اما المجموعة الرابعة فكانت السيطرة. تم الحقن داخل البريتون بثلاث جرع بين كل جرعة واخرى 48 ساعة مع جرعة اخيرة منشطة، استغرقت التجارب اسبوعين بعدها تم سحب الدم والتشريح للحصول على الكبد حيث تم وضعه في 10% فورمالين للتثبيت وتحضير المقاطع النسيجية وصبغها بصبغة الهيماتوكسيلين و الايوسين وفحصها، تم حساب العدد الكلي والعدد التفريقي لخلايا الدم البيضاء باستخدام شريحة ال Heamocytometer وحضرت مسحات خفيفة Blood smear وصبغة بصبغة جمزا وحسب العدد التفريقي لخلايا الدم البيضاء. تم تحديد مستويات السايٲوكينات قيد الدراسة IL-6 و TNF- α بوساطة تقنية EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay (ELISA) بطريقة (ELISA-Sandwich-Ag-Ab). تم تحليل النتائج التي توصلنا اليها لكل من LPS و LPA احصائيا باستخدام برنامج Anova Spss.

اوضحت نتائج الدراسة الحالية زيادة معنوية عند مستوى معنوي $P < 0.05$ بالنسبة للعدد الكلي لخلايا الدم البيضاء للتراكيز بين 1250 و 2500 مايكروغرام/100 غرام من وزن الجسم بالنسبة لـ LPS المحقون حيث كانت (8.416×10^3 و 7.683×10^3 ML) على التوالي مقارنة بالسيطرة التي كانت (5.35×10^3 ML) بينما لاحظنا عدم وجود فرق معنوي في العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء في حالة الحقن بـ LPA مقارنة بالسيطرة. كما بينت الدراسة ان هناك زيادة معنوية عند مستوى معنوي $P \leq 0.05$ في اعداد خلايا الوحيدة النواة Monocytes و Lymphocytes بالنسبة لـ LPS المحقون بجميع التراكيز مقارنة بالسيطرة ولم يسجل فرق معنوي واضح بين التراكيز نفسها حيث قدرت Lymphocyte بـ (5.782×10^3 ، 5.830×10^3 ، 6.08310×10^3 ML) للتراكيز 625، 1250، 2500 مايكروغرام/100 غرام من وزن الجسم على التوالي مقارنة بالسيطرة التي كانت 3.502×10^3 ML بينما لاحظنا انخفاض معنوي واضح عند مستوى معنوي $P \leq 0.05$ في اعداد خلايا Lymphocytes وايضا Monocytes في حالة الحقن بـ LPA حيث كانت (3.050 ، 3.175 ، 4.154) $\times 10^3$ ML بالنسبة للتراكيز 625، 1250، 2500 مايكروغرام/100 غرام من وزن الجسم على التوالي مقارنة بالسيطرة. أما الـ Monocytes كانت (0.070 ، 0.184 ، 0.135) $\times 10^3$ ML للتراكيز (625، 1250، 2500) مايكروغرام/100 غرام من وزن الجسم على التوالي مقارنة بالسيطرة.

أما خلايا الدم العدلة Neutrophiles فلم تسجل فروقات معنوية واضحة في اعدادها مقارنة بالسيطرة بالنسبة لـ LPS أما LPA فقد سجلت زيادة معنوية لعدد خلايا العدلة عند مستوى معنوي $P < 0.05$ حيث كانت تساوي (5.225، 5.061، 6.401) $\times 10^3$ ML للتراكيز (625، 1250، 2500) مايكروغرام/100 غرام من وزن الجسم على التوالي مقارنة بالسيطرة المساوية لـ 3.599×10^3 ML. بينت الدراسة الحالية زيادة معنوية في تراكيز الساييتوكينات TL-6 و TNF- α مقارنة بالسيطرة عند مستوى معنوي $P < 0.05$ حيث ازداد تركيزها بزيادة تراكيز LPS و LPA من 625 و 1250 و 2500 مايكروغرام/100 غرام من وزن الجسم، كما شخّصت التغيرات النسجية في مقاطع الكبد المحضرة في الحيوانات المحقونة لكل من LPS و LPA حيث اظهرت تدمير واضح للخلايا الكبدية مع ارتشاح للخلايا المناعية داخل نسيج الكبد.



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

**دور متعدد السكريات الدهني والدهن A المستخلص من
بكتريا الاشريكية القولونية على بعض المتغيرات المناعية
والنسيجية**

ضحى جاسم محمد الصوفي

**أطروحة دكتوراه
علوم الحياة / الاحياء المجهرية**

بإشراف

**الاستاذ المساعد
الدكتورة هيام عادل الطائي**