جامعة الموصل

كلية العلوم

التعديل المناعي لمتعدد السكريات الدهني المستخلص من *E.coli* ودوره في السيطرة على الاصابة التجريبية بالتهاب المجاري البولية

عزيز تمو كورو كجل الخالتي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة أديبة يونس شريف حمو النعمان

1443هـ 2021م

الخلاصة

اشتملت الدراسة الحالية على جمع 25 عينة إدرار من المرضى المراجعين للمستوصف النموذجي للرعاية الصحية الاولية في ناحية القوش و20 عينة خروج من الأشخاص الأصحاء من ناحية باعذرا التابعة لقضاء شيخان، أظهرت النتائج أن 80% من عينات إلادرار اظهرت نمواً بكتيرياً، وشكلت بكتيريا *Escherichia coli* النسبة الأعلى وبنسبة 70% منها فيما عزلت *Proteus mirabilis* بأقل نسبة 5%، أما الأنواع *Klebsiella pneumoniae* و *Enterobacter* فتراوحت بنسب بينهما، وعزلت *E.coli* بنسبة 100% من عينات الخروج.

تم اختيار عزلتان من *E.coli* إحداهما الأكثر ضراوة من الإدرار، والأقل ضراوة من عزلات الخروج واعتماداً على قدرتهما لتكوين الأغشية الحيوية Biofilm وأنتاج الإنزيم الحال للدم Hemolysin؛ إذ كانت عزلة واحدة من عزلات الإدرار مكونة للغشاء الحيوي ومنتجة للإنزيم الحال للدم، بينما كانت جميع عزلات الخروج سالبة لإنتاجه ولتكوين الغشاء الحيوي، واستخدمت هذه العزلات في تحضير مادة متعدد السكريات الدهني Lipopolysaccharide وبإستخدام طريقة الفينول الساخن Hot-Phenol.

دُرس تأثير متعدد السكريات الدهني LPS المحضر من خلال تأثيره في التعداد الكلي والتفاضلي لخلايا الدم البيض والفعالية البلعمية للخلايا العدلة وبثلاثة تراكيز (90، 120، 150) ميكروغرام/كيلوغرام من وزن الجسم للجرذان، وأظهرت النتائج أن LPS العزلة المرضية عند التركيز 90 مكغم/كغم سبب زيادة في التعداد الكلي للخلايا البيض؛ إذ كانت 0.72±24.93 ×$\mu l/10^3$ مقارنةً بـ 1.28±16.07 ×$\mu l/10^3$ عند حيوانات السيطرة، وأن التركيز 150 مكغم/كغم سبب زيادة في النسبة المئوية للخلايا العدلة؛ إذ بلغت 0.85±9.63 % فيما بلغت 1.2±5.8% عند حيوانات السيطرة. أما مستخلص العزلة الطبيعية فقد أدى الى زيادة معنوية في التعداد الكلي لخلايا الدم البيضاء عند التركيز 120مكغم/كغم فقط؛ إذ بلغت 0.5±20 ×$\mu l/10^3$ مقارنةً بعينة السيطرة، وتسبب نفس المستخلص في زيادة الفعالية البلعمية معنوياً عند التركيزين 120 و150 مكغم/كغم؛ إذ بلغت 0.88±92.67 % و0.67±90.67% على التوالي مقارنةً بمجموعة السيطرة التي بلغت 1.15±70%، كما تسببا بزيادة معنوية في النسبة المئوية للخلايا العدلة؛ إذ بلغت 0.8±14.5% و0.7±11.76 % مقارنة بمجموعة السيطرة 1.2±5.8%، وكانت الزيادة في الفعالية البلعمية أعلى معنوياً في المجموعة المعاملة بمستخلص العزلة المرضية عند التركيز 90 مكغم/كغم مقارنةً بالتراكيز الأخرى ولنفس المستخلص، وبلغت 1.86±92 % ، ولم يسبب مستخلص LPS للعزلة المرضية فروقاً معنوياً في النسبة المئوية للخلايا اللمفية Lymphocytes والخلايا وحيدة النواة Monocytes وسببت التراكيز 120 و150 مكغم/كغم لمستخلص LPS العزلة الطبيعية انخفاضاً معنوياً في النسبة المئوية للخلايا اللمفية؛ إذ بلغت 2.85±73.37% و0.47±75.47% مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت 3.55±84.43%. بينما لم يسبب مستخلص LPS للعزلتين أي فروق في النسب المئوية للخلايا الحمضة Eosinophils، وتباين ظهور القعدات

Basophils؛ إذ لم تظهر في جميع المجاميع المعاملة بمستخلص العزلة المرضية، واختلفت نسبته المئوية عند المعاملة بالتركيزين 90 و150مكغم/كغم للمجموعتين المعاملتين بمستخلص LPS للعزلة الطبيعية. وسبب مستخلص العزلتين زيادة معنوية في تعداد الصفيحات الدموية عند المعاملة بالتركيز 90مكغم/كغم57.5±714 ×10^3/µl و150 مكغم/كغم 20±726 ×10^3/µl لمستخلص العزلة الطبيعية و24.5±716.5 ×10^3/µl عند التركيز 150 مكغم/كغم لمستخلص العزلة المرضية.

وأظهرت النتائج حدوث زيادة معنوية في تركيز Interleukin-17 في المجاميع المعاملة بالتركيزين 90 مكغم/كغم 2.32±158.32 pg/ml و120 مكغم/كلغم 4.80±124.81 pg /ml لمستخلص العزلة الطبيعية، وأدى مستخلص العزلة المرضية الى حدوث زيادة معنوية في تركيزه عند التركيزين 90 و150مكغم/كغم وبلغت 1.99±152.02 pg /ml و3.6±178.61 pg /ml للتركيزين على التوالي.

وأظهرت النتائج فعالية لمستخلص LPS للعزلتين في السيطرة على إصابات المجاري البولية المستحدثة في الجرذان قبل استحداث الإصابة وبعدها، كان تأثير مستخلص العزلة الطبيعية أعلى بعد استحداث الإصابة (Post-Conditioning)؛ إذ وصلت جميع الجرذان حالة الشفاء التام عند اليوم الخامس مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة التي بلغت أفرادها حالة الشفاء عند اليوم الواحد والعشرون ومجموعة السيطرة الموجبة؛ إذ شفيت عند اليوم السابع عشر، وإن التركيزين 20 و40 مكغم/كغم كانا الأكثر تأثيراً عند المعاملة قبل استحداث الإصابة (Pre-Conditioning) وكذلك الحيوانات المعاملة بالتركيزين 20 و60 مكغم/كغم بمستخلص العزلة المرضية، وكان التركيز 100 مكغم/كغم للمستخلص نفسه الأعلى تأثيراً عند المعاملة بعد استحداث الإصابة؛ إذ بلغت افرادها حالة الشفاء عند اليوم الخامس.

وأظهر مستخلص LPS للعزلتين تأثيراً تثبيطياً على نمو 4 عزلات من البكتيريا المرضية، وهي *Pseudomonas aeruginosa* و*Proteus mirabilis* و*Klebsiella pneumoniae* و*Enterobacter aerogenes*، وإن مستخلص العزلة الطبيعية أظهر تأثيراً تثبيطياً على جميع العزلات عند التركيز 4 مليغرام /سم^3 والذي كان الأعلى على بكتيريا *pseudomonas aeruginosa* وبقطر تثبيط 20 mm، وأظهر مستخلص العزلة المرضية أيضاً أعلى تأثير في نفس البكتيريا وبقطر تثبيط بلغ 11 mm.

Summary

The current study included the collection of 25 urine samples from cases of Urinary Tract Infection referring to the primary health care clinic in Al-Qosh, and 20 stool samples from healthy subjects from Ba'dra sub-district of Sheikhan district, and the results showed that 70% showed positive results for the bacterial growth with *E.coli* forming the higher rate of isolation 70%, while *Proteus mirabilis* was isolated at lower rate forming 5%, the rate of isolation of the other species *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* ranged between them, while *E.coli* was isolated from all stool samples of healthy subjects.

Two isolates of *E.coli* were selected, being the more virulent urinary isolate and the less virulent stool isolate based on its ability for biofilm and hemolysin production, only one of the urine isolates showed the ability for biofilm and hemolysin production while all stool isolates were unable to form biofilm and produce hemolysin, these isolates were used for lipopolysaccharide extraction using the Hot-Phenol method.

The effect of Lipopolysaccharide of the Normal and Uropathogenic isolate of *E.coli* was tested through the study of its effect on total and differential White Blood Cells and phagocytic activity of the neutrophils at three concentrations of (90, 120, 150) µg/kg body weight. The results showed that the concentration 90 µg/kg of pathogenic LPS extract caused an increase in total WBC (24.93 ± 0.72) × 10^3/µl compared to the control group (16.07±1.28) × 10^3/µl, and the concentration of 150 µg/kg of the same extract caused an increase in the percentage of Neutrophils (9.63±0.85)% compared to 5.8±1.2% in control group. While LPS extract of Normal isolate caused a significant increase in total WBC only at the concentration of 120 µg/kg (20±0.5) × 10^3/µl compared to control group. The same extract also caused a significant increase in phagocytic activity at concentrations 120 and 150 µg/kg (92.67 ± 0.88%) and (90.67% ± 0.67), respectively, compared to the control group (70 ± 1.15)%, and they also caused a significant increase in the percentage of percentage of neutrophil (14.5

± 0.8% and 11.76 ± 0.7%) compared to the control group (5.8±1.2%), and the increase in phagocytic activity was significantly higher in the group treated with the Uropathogenic extract at a concentration of 90 µg/kg (92±1.86%)compared with other concentrations of the same extract. The Uropathogenic extract did not show any significant differences in the percentage of lymphocytes and monocytes. The concentrations of 120 and 150 µg/kg of Normal extract caused a significant decrease in the percentage of Lymphocytes (73.37±2.85)% and (75.47±0.47)% respectively for both concentrations compared to the control group(84.43±3.55)% , and both extracts didn't show any significant differences in the percentages of Eosinophils. Basophils differs as they don't appeared in all treatment with Uropathgenic extract and its percentages differs significantly after treatment with 90 mg/kg of Normal LPS extract, the extract of both isolates causes a significant increase in Platelets counts after treatment with 90µg/kg (714±57.5×10^3/ml) and 150 mg/kg (726±20×10^3/ml) of the Normal extract and 150mg/kg (716.5±24.5×10^3/µl) of the Uropathogenic extract compared to (433.5±3.5×10^3) of the control.

The results showed a significant increase in the concentration of IL-17 at 90µg/kg (158.32±2.32 pg/ml) and 120 µg/kg (124.81±4.80 pg/ml) of the Normal extract, Uropathogenic extract causes a significant increase in the concentration of IL-17 at 90 µg/kg (152.02±1.99 pg/ml) and 150 µg/kg (178.61±3.6 pg/ml) compared to (11.63±6.29 pg/ml) in control group.

The results also showed that both extracts were active in the control of experimentally induced urinary tract infection in rat when given before and after the infection, the effect of Normal LPS extract was higher when the rats were injected after the experimental infection and all the rats were completely cured 5 days after infection compared to the animals of the negative control group which was cured completely after 21 days and the control positive group which accomplish its healthy state at day 17. The concentrations 20 and 40 µg/kg for the Normal extract was superior in its effect when given before infection as the

animals relieve after 5 day, and the concentrations 20, 60 µg/kg for pathogenic LPS extract showed the same superior activity, while 100 µg/kg of the same extract showed the same effect when treated after infection(Post-conditioning).

LPS extract of both isolates showed antibacterial activity against 4 pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter aerogenes*, Normal extract showed its activity on all the isolates at 4 mg/ml, its higher effect was on *pseudomonas aeruginosa* with an inhibition zone(20mm), Pathogenic extract was also effective on the same bacteria with the zone of (11 mm).

University of Mosul

College of Science

Immune Modulation of Lipopolysaccharide of *E.coli* and its Role in the Control of Experimental Urinary Tract Infection

Aziz Tamo Koro Kajel Al-Khality

M.Sc. Thesis

In

Biology/Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Adeba Y. Sh. Al-Numman

1443 A.H. **2021 A.D.**