دراسة بعض الصفات الكيميائية والحيوية لعديد السكريد الشحمي الخام المستخلص من جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*

أ.م.د. ذكرى عدنان جواد المسلماوي / كلية العلوم / جامعة كربلاء.
منـــار سعـــد حســين الخفـــاجي / كلية العلوم / جامعة كربلاء.
** البحث مستل من رسالة ماجستير اشرف عليها الباحث الاول .

الخلاصة:

تم في هذا البحث أستخلاص عديد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide) الخام بطريقة الهضم الأنزيـــمي والفينول الســاخن من عزلــة محليـــة من بكتـــريا *Pseudomonas aeruginosa* تم الحصـــول عليها مـن مريض يعاني من خمج السبيل البولي (Urinary tract infection). وقدرت كمية الكربوهيدرات الكلية وكمية البروتين له وكانت نسبتاهما71 % و28 % على التوالي.

ودرست بعض الصفات الحيوية من حيث التاثيرات السمية والمرضية لعديد السكريد الشحمي الخام حيث تم تحديد الجرعة المهلكة الكلية LD_{100} و النصفية LD_{50} للفئران من المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي و كانتا 175مايكروغرام⁄0.5 ملليتر و 137.5مايكروغرام⁄0.5 ملليتر لكل فأرة على التوالي ومن خلال ذلك لوحظ ان له تاثير واضح في زيادة نسبة وزن الكبد والطحال نسبة الى وزن الجسم في الفئران المريضة المحقونة بالجرعة الممرضة منه مقارنة بالسيطرة المحقونة بالدارئالفسلجي.

كما أتضح أن هنالك نقصان في العدد الكلي لخلايا الدم البيض WBC للفئران المريضة حيث بلغ العدد $5.1X10^3$ خلية⁄ ملم^3 بعد مرور ثلاثة أيام من الحقن بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي مقارنة بالسيطرة التي بلغت $6.55X10^3$خلية / ملم^3.

Summary:

Crude lipopolysaccharide was extracted using enzymatic digestion and hot phenol from local isolate of *Pseudomonas aeruginosa*which was obtained from a patient suffering from Urinary tract infection.

Total carbohydrates and proteins of the crude extract were estimated, they were of percentages about 71% and 28% respectively. On the other hand the biological properties of LPS such as the toxic and pathological effects in mice were studied, total lethal dose LD_{100} and half lethal dose LD_{50} for mice were determined which were 175 and 137.5 μg / 0.5ml respectively. The result showed that the crude extract of LPS had distinct effect in the percentage of liver and spleen weights to the total mouse body weight, also there was a reduction in the total number of WBC in infected mice was decreased reaching $5.1X10^3$ cell/cm^{3}after 3days from injection with the sublethal or infective dose of lipopolysaccharide as compared with the control treatment which gave $6.55X10^3$ cell/cm^3 .

المقدمـــة:

يـوجد عـديد السكريـد الشحمـــي بصورة خاصـــة في الصفيحة الخارجية للغشاء الخـارجي(Outer membrane) لجــدران الخـلايا البكتيرية مكونا" مـا يقـارب (50%) منه (1).

إن عديد السكريدالشحمي يكون ثابتا" عند تعرضه للحرارة العالية (Heat stable) وهذه الصفة تميزه عن غــالبية السموم الخارجية, وأن تعرضـه للغليان لمـدة نصف ساعة لايؤثر في فعاليته , غير أنه غير ثابت تجاه المواد المؤكسدة القوية (Powerful oxidizing agent) مثل Hypochlorite, Superoxide وPeroxide يعد عديد السكريد الشحمي جزيئة كبيرة (Macromolecule) ذات وزن جـــزيئـــي يقـــارب (10- 1000)كيلـــودالتـــون (1,2).

تتكون جزيئة عديد السكريدالشحمي من ثلاث مناطق هي :

1. الدهن A (Lipid A)
2. منطقة اللب (Core oligosaccharide)
3. السلسة الجانبية (O-side chain) وتعرف ايضاً بالمستضد – O (O- Antigen) او المستضد الجسمي Somatic (antigen) (1,3).

إن منطقة الدهنA (Lipid A) هي المكـــــون الفعـــــال بايولوجيـــــاً، حيث أن تحفيز أستجابة الجهـاز المناعي تعتمد على شـدة الأصابـــة والتركيـــب الخـــــــاص لمنطقـــة الدهـن Lipid A) A). غيــر أن شدة الأمراضية والضراوة لا تعتمد علــى هذه المنطقة فقــط بل ايضـــا″ بأرتباطها بالسلسـلة الجانبية – O(4,5).

ترتبط منطقة الدهن A بمنطقة اللب (Core region) أو (Core oligosaccharide) المكونــة مـن 8-12 وحــدة مــن السكــريــات الأحـاديـة (Monosaccharide)(3) و يتكـون اللـب مــن منطقتين الأولــى تعــرف بمنطقــة اللـب الــداخـلـي (Inner core oligosaccharide) و التـي تتكـون من جـزيئتين مـن (2-Keto-3- deoxyoctonic KDO)، وجـزيئتين مـن الـ Heptose الحامـلـة لمجاميع مفسفـرة (Phosphoryl groups), وترتبط هـذه المنطقة بمنطقة الدهن A بروابط كلايكوسيدية (2), أما المنطقة الثانيـة فهـي منطقـــة اللـــب الخـــارجـــي (Outer core oligosaccharide) ذات تنــوع بالتركيب الكيميائي لها وتحــتوي على سكريات خماسيـــة وسداسية مثل الكلوكوز و الكــالكتوز(1,4,6) .

أما السلسلـــة الجـانبيـــة (O-side chain) وتعــرف ايضا″ بالمــستضــد – O (O- Antigen) او المستضـــد النوعـــي (O-specific amtigen)O- اوالمستضـــد الجسمـــي (Somatic antigen) ، تكون هذه المنطقة مع منطقة اللب (Core region) منطقـة محبة للماء (Hydrophilic), تتكون هذه المنطقة من وحدات متكررة من السكريات الأحادية (Monosaccharide) مابين 5-8 وحدات مكونة السلسلة الجانبية, أذ يمكن أن يصل طـول السلسلة الى 40 وحدة فرعية متكــررة.

أمكن استخلاص عديد السكريد الشحمي من البكتريا السالبة لملون غرام بطرق عدة منها الاستخلاص بحامض الخليك ثلاثي الكلور (Trichloroacetic acid) وكذلك بالبيوتانول الـــمائي (Aqueous butanol) وترايتــون ($Triton/Mg^{+2}$) والإيثــر الــمائـــي (Aqueous ether) بـدرجـة حـرارة بين 6-12 °م وأيضاً الأستخلاص بالماء الساخن بدرجه 180°م,وكذلكبأستخدام الفينول المائي (Aqueous phenol) , حيث تعد طريقة الاستخلاص بالفينول الساخن من أكثر الطرق أستعمالألأمكانيةأستخدامها لمدى واسع مـن الخلايا البكتيرية , وأن المعاملة المسبقة للخلايا البكتيرية بأنـزيم اللايســوزايـمLysozyme بوجود Ethytenediaminetetraacetic acid) (EDTA) تعد الطريقة الأكثر فعالية لتحضير وأستخلاص عديد السكريد الشحمي ، وهناك طرق أستخلاص أخرى مثل طريقة أستخدام الكلوروفورم (Chloroform) , و طريقة بيتروليوم- إثير(Petroleum –ether) وطـريقـة الميثانول (Methanol) (7,8) .

يعـد عـديـــد السكــريد الشحمـــي (LPS) المكــون الأســاس للـغشــاء الخـــارجـــي (Outer membrane) لجدار الخلية البكترية و يلعب دوراً هاماً في الأمراضية , والأخماج الناتجة عن الخلية البكترية , ومحفزاً أساسياً لأستجابة المضيف للخلايا البكترية السالبة لملون غرام .

بعد تحـــلل الخـــلايا البكتــريـــة عنـد يتحـــرر عديد السكريد الشحمي الى الدورة الدموية (Circulation) و يتم تميزه من قبل نظام المناعة غير المتخصص (Innate immune system) , و أن LPS يعمل على تحفيز الخلايا المتجمعة في مناطق الألتهـابات والأنسجة المحطمة ,وتنتج هذه الخلايا الوسائط الألتهابية بكميات كبيرة مثل الحركيات الخلوية Cytokines كعــامل النــخر الــورمي – الفا Tumore necrosis factor-a (TNF a), الأنترلوكينات مثل (IL-6,IL-1B,IL-8) وكذلك (-IL IL-12 , 18) , الـى جانب السايتوكاينات هناك عوامل تنتج أيضا″ من قبــل البلاعم الكبيرةMacrophages مثـل عـــامــل تنشيــط الصفـــائح الدمــويـــة (Patelelet activating factor) (PAF) ، بروستاكلاندينات(Prostaglandin) , ثرومبــــــوكسان (Thromboxane) , لوكوترينات (Leukotriene) هذه العوامل مسؤولة عن تنشيط البطانة الوعــائيــة (Vascular endothelium) للأوعيــة أو تنظـــيم النغمة الــوعائية (Vascular tone) , و المســـــــتويــات العــاليـــة منـــــها تــؤدي الــــى حـــدوث تحطــم الأوعيـة (Vascular damage) ، وبصورة عـــامة أن وجود كميات كبيرة من LPSتـؤدي الى تنشــط هـــذه الــوســائط (Mediators) والـــذي ينتج عنـــه الصدمة السمية (Septic shock) أو تـؤدي الـــى (Multiorgan dysfunction) والـــذي يـؤدي الـــى الـوفـــاة (9,10,11,12,13) . كـــذلـك الـتـســـبب بالــ Endotoxemia والـــذي يكــون شائعا″ في الأشخاص ذوي أمـــراض الكبـــد وخصوصا″ (Alcoholic liver disease) أمراض الكبــــد الكحولية و الفشـــــل الكبـــدي(Liver failure) (14) .

المواد وطرائق العمل:

العزلة الجرثومية:

استخدمت عزلة محلية من جرثومة *P. aeruginosa*قد عزلت من مريض مصاب بخمج السبيل البولي وقد تم تأكيد تشخيصها باستخدام الاختبارات المظهرية والبايوكيمياوية وكذلك نظام API 20 E system .

استخلاص عديد السكريد الشحمي الخام

على وفق طريقة (7) تم تكسير الخلايا البكتيرية بعملية الهضم الانزيمي حيث تم تعليق 5 غم من الخلايا البكتيرية المجففة بالاستون في 50 ملليتر من محلول فوسفات الصوديوم 0.5مولاري مضافاً له ازايد الصوديوم 0.05 % و EDTA0.05مولاري، تم وضع الدورق الزجاجي على جهاز المحرك المغناطيسي ، ثم أضيف 0.1 غم من انزيم اللايسوزايم (Lysozyme) ثم أعيد الدورق الحاوي على المعلق البكتيري مرة اخرى الى المحرك المغناطيسي، وتحت ظـروف درجة حرارية 4م ولمدة 16 ساعة ، بعدها أخذ العالق و وضع بدرجة حرارة 37م لمدة 20 دقيقة ، و تم اعادته مرة اخرى الى جهاز المحرك المغناطيسي بعدها تمت اضافة محلول كلوريد المغنيسيوم 0.02 $MgCl_2$مولاريوحضن العالق بدرجة حرارة 37 م لمدة 10دقائق أخرى بعدها سخن الى

درجة حرارة 70م° وأضيف له حجم مساوٍ من محلول الفينول 95 % الساخن بدرجة حرارة 70 م° ، وبعد هذه المرحلة تم تبريده مباشرة الى 5 °م. بعدها تم النبذ المركزي وذلك باستخدام المنبذة المبردة العالية السرعة وبسرعة دوران مقدارها 10000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة وبأنتهاء هذه المرحلة تم الحصول على الاطوار الآتية وبترتيب من الاعلى الى الاسفـــل . الطور المائي (Aqeous Phase)، الطـــور البينـــي (Inter Phase) ،الطـــور الفيـــنولي (Phenolic Phase) والراسب (Sediment) . تمت ديلزة وتجفيف الطور المائي لاستخدامه في الخطوات اللاحقة.

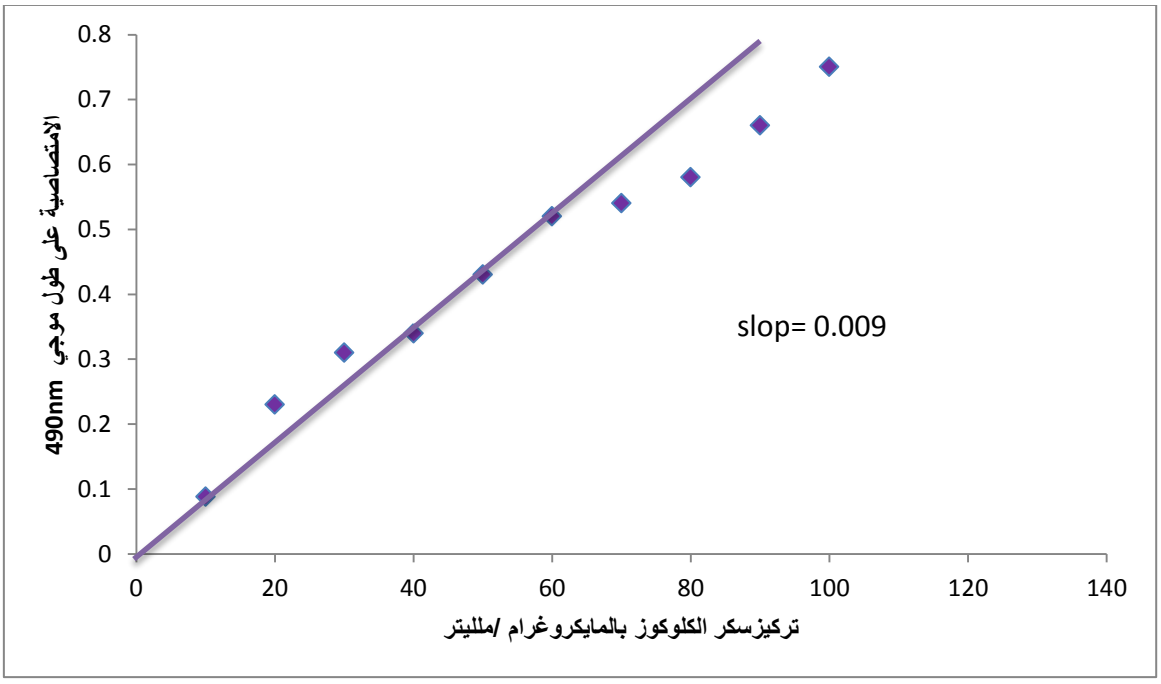
لتقـدير كمية الكـاربوهيدرات الكـلية فـي عـديد السكريد الشحمي الخـام تـم أعتمـاد طـريقة(15) وبالاستعانة بالمنحنى القياسي لسكر الكلوكوز والمبين في الشكل (1) ، اضيف 1 ملليتر من محلول الفينول 5 % و 5 ملليتر من حامض الكبريتيك المركز الى 1 ملليتر من نموذج عديد السكر الشحمي الخام وتم قراءة الأمتصاصية بالطول الموجي 490 نانوميتر، ثم تم حساب تركيز الكاربوهيدرات في النموذج و العلاقة الآتية :

التحليل الكيميائي لعديد السكريد الشحمي الخام

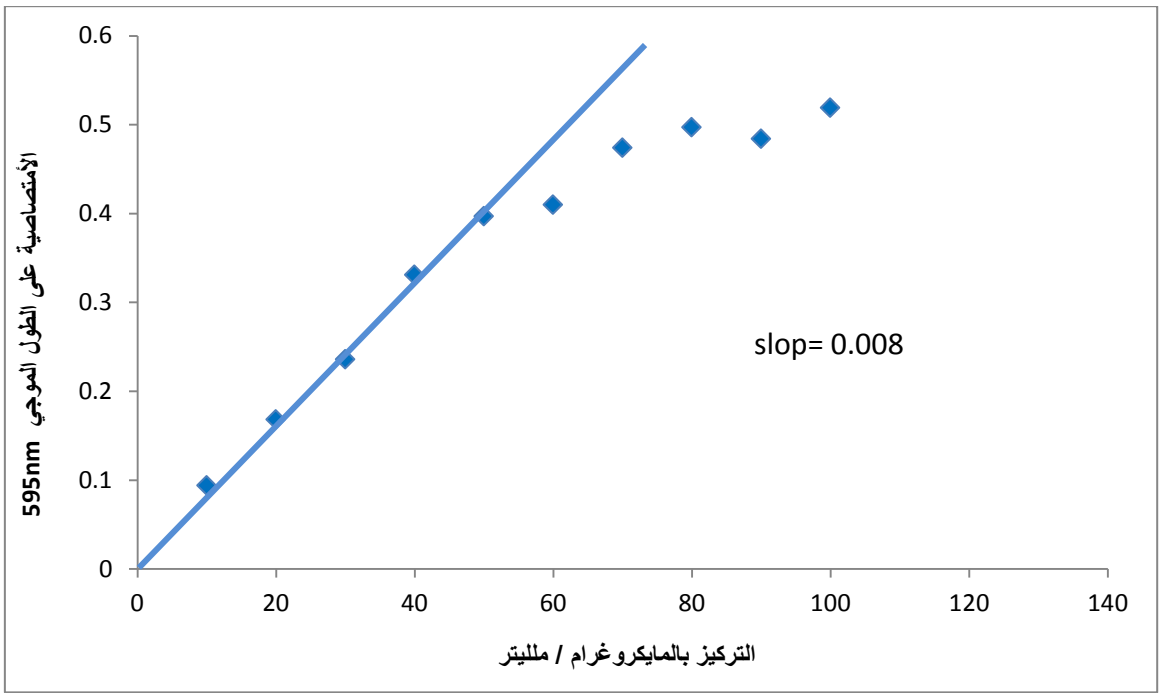
$$\text{تركيز الكاربوهيدرات في النموذج بالمايكروغرام / ملليتر} = \frac{\text{الامتصاصية للنموذج}}{\text{الميل}} \times \text{مقلوب التخفيف}$$

و تم اعتماد طريقة (16)في تقدير البروتينات في عديد السكريد الشحمي وبالاستعانة بالمنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري (Bovine serum albumin) والموضح في الشكل (2) حيث اضيف 0.25 ملليتر محلول صبغة كومازي الزرقاء الى 500ماكروليتر من نموذج عديد السكرد الشحمي الخام ، وتم قراءة الأمتصاصية على بالطول الموجي 595 نانوميتر، ثم تم حساب تركيز البروتين في النموذج وفق العلاقة التالية :

$$\text{تركيز البروتين في النموذج بالمايكروغرام / ملليتر} = \frac{\text{الامتصاصية للنموذج}}{\text{الميل}} \times \mathbf{2}$$



شكل (1) المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز



شكل (2) المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري

تحديد الجرعة المهلكة الكلية (LD_{100}) وانصفية (LD_{50}) لعديد السكريد الشحمي الخام المستخلص من بكتريا *P. aeruginosa*

بعد مرور 5أيام من حقن الفئران بالتراكيـز (50 , 75 , 100 , 125 , 150 , 175, 200) مايكروغرام / 0.5 ملليتر من عديد السكريد الشحمي الخام ، تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل مجموعة على حدة ومن خلال ذلك تم تحديد الجرعة المهلكة الكلية LD_{100}للنموذج الخام وفقاً لـ (17) كذلك تم حساب الجرعةالمهلكة للنصف LD_{50}و معرفة الجرعة الممرضة لعديد السكريد الشحمي الخام.

دراسة بعض التأثيرات المرضية في الفئران المحقونة بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام

لوحظت التغييرات المرضية للفئران المحقونة بعديد السكريد الشحمي ، وتم اخذ أوزانها ومقارنتها مع أوزان فئران السيطرة ، وكذلك الحال بالنسبة لأعضاء الفئران بعد التشريح وذلك بأخذ أوزانها أيضاً ومقارنتها مع أعضاء فئران السيطرة ، حيث تم وزن كل من الكبد والطحال وذلك لتحديد وزنها بالنسبة الى وزن الجسم مقارنة مع فئران السيطرة، هذا فضلاً عن ملاحظة العلامات غير الطبيعية للأعضاء المنتخبة بالعين المجردة و حسب العدد الكلي لخلايا الدم البيض للفئران المريضة.

التصميم والتحليل الاحصائي

أتبع في تصميم التجربة التصميم العشوائي التام(Completely Randomized Design) وبأربعة مكررات. و أستعمل أختبار L.S.D على مستوى أحتمال 0.05 لمقارنة المتوسطات بين المعاملات (18) كما أستعمل أيضاً اختبار T على مستوى أحتمال 0.001 لمقارنة المتوسطات بين المعاملات .

النتائج والمناقشة

أستخلاص عديد السكريد الشحمي

أستعملت الخلايا المجففة لجرثومة *P.aeruginosa* لغرض أستخلاص عديد السكريد الشحميولكي تتم زيادة حصيلة المستخلص عوملت الخلايا الجرثومية بانزيمLysozyme بوجودEDTAوهي منأكثر الطرق فعالية وسهولة في أستخلاص وتحضير عديد السكريد الشحميحيث يعمل أنزيم اللايسوزايم على قتل الخلية البكتيرية و ذلك بتحليل الـ Peptidoglycan(19).أما الـ EDTAفيعمل علىتحطيم سطح الخليةالبكتيرية نتيجة لزيادة نفاذية جدار الخلية للمذيبات الخارج خلوية (20) ،كما يعود الى التأثير السمي القاتل (Bactericidal effect) الذي يمتلكه مركبالـ EDTAتجاه الأحياء المجهرية السالبة لملون غرام والذي لوحظ تأثيره على بكتريا*Pseudomonas alcaigenes*والتي تكون أكثر حساسية من (*P. aeruginosa*21) .

تم أستخدام طريقة الفينول الساخن لأستخلاصعديد السكريد الشحميبعد مرحلة جمع وتكسير الخلايا ، حيث أن طريقة الفينول الساخنوالتي تعد من أكثر الطرق أستعمالأتساعد في الحصول على السموم الداخلية(Endotoxin) ذاتنقاوة عالية وبالنبذ المركزي العالي السرعة (High speed cooling centrifuge) لعالق الخلايا البكترية تم الحصول على أربعة أطوار متمثلة بالطور المائي الحاوي على مستخلصعديد السكريد الشحمي مع كمية قليلة من البروتينات، يليه الطور البيني والذي يحتوي على بقايا خلوية ,أما الطور الفينولي فيحتوي وبصورة أساسية على بروتينات، أما طبقة الراسب والتي هي عبارة عن حطام الخلايا البكترية في قعر أنبوبة الترسيب (7) وهذا ما أكدته ايضاً بحوث لاحقة من قبل (22).

بلغ الوزن الجاف للمستخلص الخام حوالي 10 مليغرام والذي كان يشكل%0.002من الوزن الجاف للخلايا المستخدمة في عملية الأستخلاص .

التحليل الكميائي لعديد السكريد الشحمي

للتأكد من كفاءة عملية الأستخلاص لعديد السكريد الشحمي تمت مقارنة النسب المئوية للكاربوهيدرات والبروتينات لهذا المستخلص الخام ووجد أن تركيز الكاربوهيدرات233 مايكروغرام /ملليتر وبنسبة مئوية 71%, أن هذه النتائج مقاربة لعددمن الدراسات التي أجريت على عديد السكريد الشحمي اذ وجدت السعدي (23) أن نسبة الكاربوهيدرات في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي لجرثومة*Aeromonashydrophila*كانت 17.5%أما جرثومة *Proteus mirabilis* فقد كان تركيز الكاربوهيدرات في المستخلص الخام 153مايكروغرام /ملليتر (24) وكذلك وجد أن النسبة المئوية للبروتينات في المستخلص الخام تبلغ 28%في حين وجد أن النسبةللبروتينات في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحميLPSلبكتريا*Citrobacterfreundii*كانت 22%.

تحديد الجرعة المهلكة النصفيةLD50والكليةLD100 منعديد السكريد الشحمي الخام

وجد أن الجرعة المهلكة الكليةLD_{100} هي 175مايكروغرام / 0.5 مللتر ونسبة الهلاك 100% بعد مرور 5أيام (الجدول 1) و (الشكل3)، في حين وجد الجرعة المهلكة أنLD_{50} هي 137.5 مايكرو غرام / 0.5 مللتر لكل فأرة , وهي واقعة بين تركيزين (150و125) مايكرو غرام / 0.5 مللتر لكل فأرة وبنسبة هلاك (% 66.6و33.3 %) على التوالي بعد مرور 5أيام (الجدول1) و (الشكل 3).

تم من خلال عدد من الدراسات تحديد الجرعة المهلكة LD50لعديد السكريد الشحمي المستخلص من أنواع بكترية أخرى حيث وجدت الكرخي(25) أن جرعةLD50لعديد السكريد الشحميالمستخلص من بكتريا*Acinobacterbaummanii* هي 104 مايكرو غرام/فأرة وكما وجدت السعدي (23) أن جرعةLD50 لعديد السكريد الشحمي لبكتريا*Aeromonashydrophila*هي 216مايكروغرام/فأرة .

و قدأوضحت العديد من الدراسات أن مستخلص عديد السكريد الشحمي له النظام البايولوجي (Biological system) نفسه ولكن اختلاف الفعالية البايولوجية تعود الى نوع الكائن الجهري و طريقة الأستخلاص المتبعة إضافة الى وجود بروتينات الغشاء الخارجي(Outer membrane) كذلك وجود و تنوع السلسلة الجانبية -O لعديد السكريد الشحمي(26)،كما أوضح (8)إنمعاملة المستخلص بأنزيمي الـ DNaseو RNase ضرورية قبل عملية التنقية و ذلك لأزالة الأحماض النووية، أضافة الى عمليات التنقية لعديد السكريد الشحمي و التي من خلالها يتم الحصول على مستخلص نقي له .أن من جملة هذه الأسباب قد تؤدي الى أختلاف قيم الجرعة المهلكة للنصف LD50 كوننا أستعملنا مستخلص خام في الدراسة الحالية.

جدول (1) نتائج الجرعة المهلكة النصفية LD50 والكلية LD100لمستخلص عديد السكريد الشحمي الخام لجرثومة*P.aeruginosa*

الجرعة منLPS مايكروغرام / 0.5	عدد الفئران المعاملة	عدد الفئرانالميتة	عدد الفئرانالحية	العدد التراكمي للفئرانالميتة	العدد التراكمي للفئرانالحية	مجموع الاعداداتراكمية	النسبة المئوية للفئران الميتة %
200	4	4	0	12	0	12	100
175	4	4	0	8	0	8	100
150	4	2	2	4	2	6	66.6
125	4	2	2	2	4	6	33.3
100	4	0	4	0	8	8	0
75	4	0	4	0	12	12	0
50	4	0	4	0	16	12	0

تم حساب الجرعة المهلكة LD50 كالاتي:.

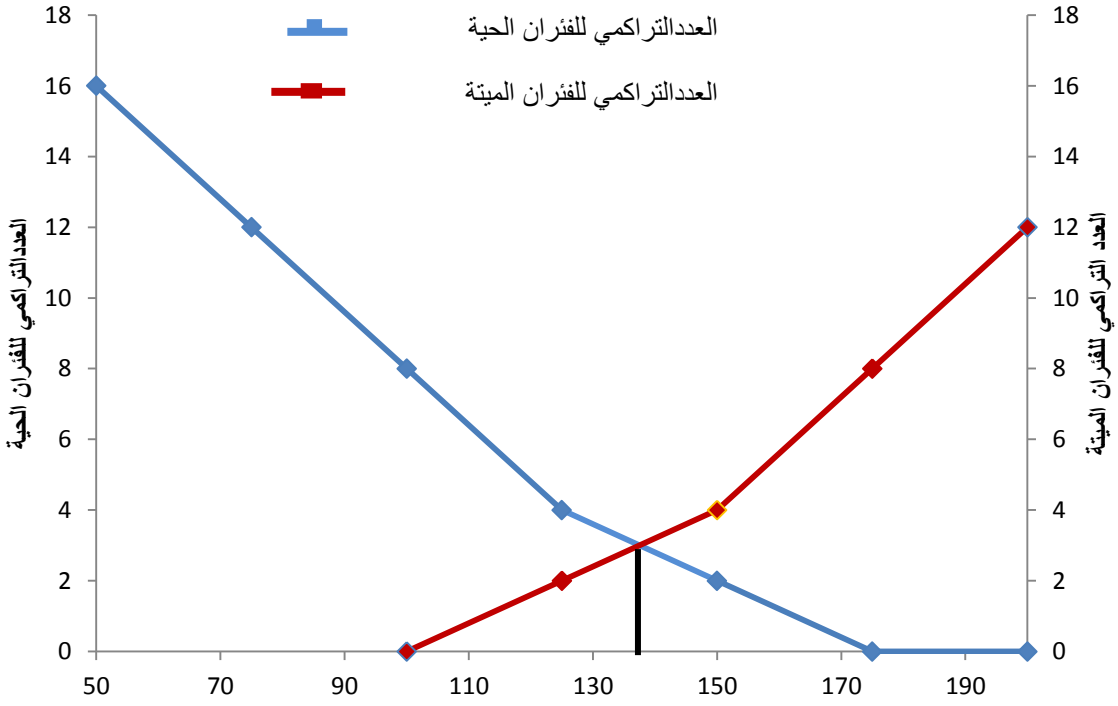
المسافةالنسبية= $\frac{33.3_50}{33.3-66.6}$=$\frac{16.7}{33.3}$ =0.5

المسافة النسبية من 50% =0.5X(125_150)

= 0.525X =12.5 وحدة

الجرعة المهلكة لـ 50% =125 + 12.5

= 137.5 مايكرو غرام / 0.5 ملليتر

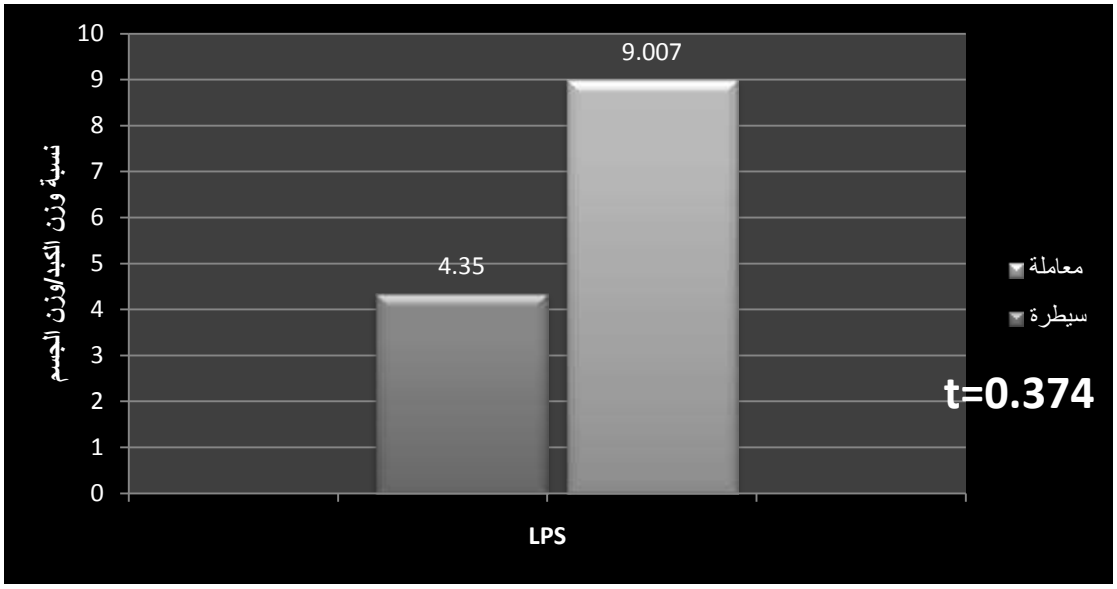


شكل(3) تحديد الجرعة المهلكة للنصف(LD50)عند حقن الفئران بمستخلص عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa*

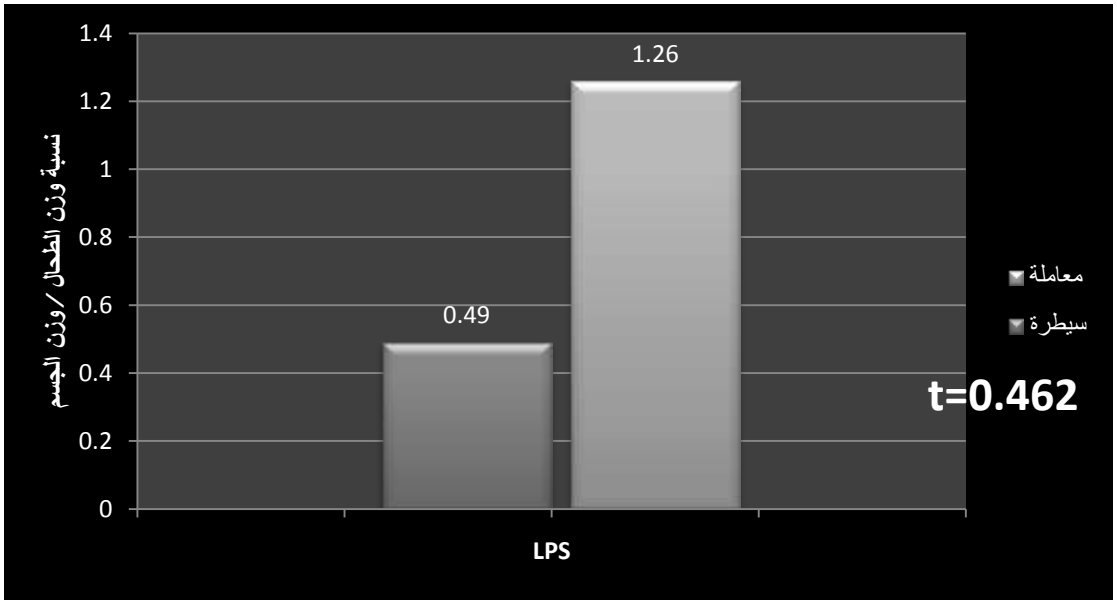
التغيرات المرضية الناتجة عن اصابة الفئران بعديدالسكريد الشحمي الخام لبكتريا*P.aeruginosa*

جرت متابعة الفئران بعد حقنها بمستخلص عديد السكريد الشحمي الخام بتركيز 125 مايكرو غرام / 0.5 ملليتر لكل فأرة ,وقد لوحظ وجود هذهالفئران بشكل مجاميع مع ملاحظة أعراض الأجهاد والخمول وعدم الأكل مقارنة بفئران السيطرة التي بدت بحالتها الطبيعية من خلال الفحص العياني للأعضاء المنتخبة من الفئران ، تمت ملاحظة تغيرات مظهرية لهذه الأعضاء تمثلت هذه بتغير لون الكبد والطحال الى اللون غير الطبيعي , وزيادة في الحجم عن الطبيعي الملحوظ في فئران السيطرة.أن هذه التغيرات تدل على وجود حالة مرضية تمدراستها من خلال الفحص المجهري الدقيق للمقاطع النسيجية .

كما تم أخذ أوزان أعضاء الفئران نسبة الى أوزان أجسامها فكانت هناك زيادة معنوية عالية $p<0.001$ مقارنة بفئران السيطرة , حيث ظهرت زيادة في نسبة وزن الأعضاء (الكبد والطحال) الى وزن الجسم,إذ لوحظ فرق معنوي واضح$p<0.001$ بين نسبة وزن الطحال الى وزن الجسم للفئران المحقونة بعديد السكريد الشحميLPSحيث بلغت 1.26% في حين كانت السيطرة 0.49%وذلك بسبب تضخم الطحال الناتج عن الفعل التقسمي(Mitogenic effect) لخلايا Bالتي تعد المكون الرئيس لعضو الطحال والمتسبب عن عديد السكريد الشحمي(27)، الأشكال(5,4) .



شكل (4) نسبة وزن الكبد الى وزن الجسم للفئران المحقونة بـ 125مايكروغرام من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa*و السيطرة.

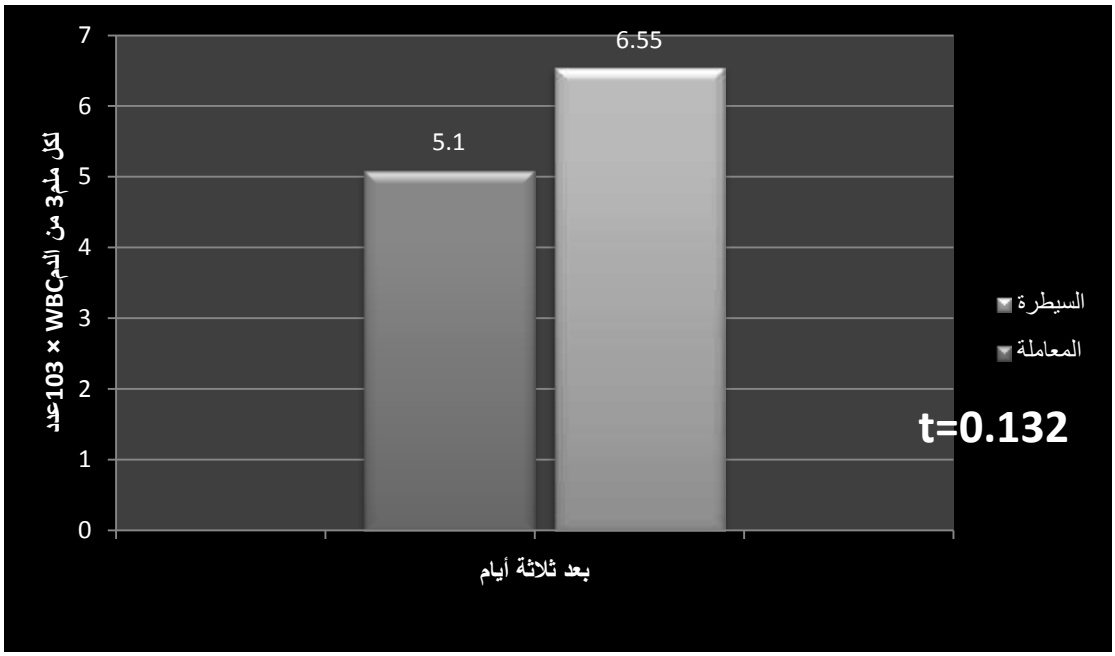


شكل (5) نسبة وزن الطحال الى وزن الجسم للفئران المحقونة بـ 125مايكروغرام من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa*والسيطرة.

تأثيرعديدالسكريد الشحمي في عدد خلايا الدم البيض للفئران

أظهرت العديد من الدراسات أن المعاملة بعـديد السكريد الشحمي تـؤدي الى حـدوث أختـزالوأنخفاض واضح في عدد خلايا الدم البيض (Leukocyte counts) في الـدم والذي يعرف بـ Leukopenia (29,28),حيث يسبب هـذا النوع من السموم تجمع مباشر وتنشيط خلايا الدم البيض (Leukocyte) فـــي الـدورة الـدمـويـة الصغرى (Microcircutation) وعلى وجـه الخصوص الشعيرات الـدموية الـرئـــوية (30)كجـــزء مـن آليات دفـــاع المضيف .

تم حقن الفئران بتركيز 125 مايكرو غرام / 0.5ملليترلكل فأرة من مستخلص عديد السكريد الشحمي, بعدها تم حساب عدد خلايا الدم البيض WBCs في دم الفئران بعد مرور ثلاثة أيام وبأجراء التحليل الأحصائي (اختبار T) لوحظ وجود فرق معنوي واضح ($p<0.001$) مقارنة مع فئران السيطرة ، اذ بلغ عدد خلايا الدم البيض $5.1X\ 10^3$ خلية /ملم^{3}في حين بلغت السيطرة $6.55X\ 10^3$خلية /ملم^{3}شكل (6) وربما يعزى هذا الانخفاض الى هجرة الخلايا الدفاعية الى الانسجة لتساهم في الاستجابة المناعية الحاصلة ضد عديد السكريد الشحمي.



شكل (6) تأثيرمستخلصLPS الخام في عدد خلايا الدم البيض للفئران.

المصادر:

1-Abraham, T. ; Schooling,S. R. ; Beveridge, T. J. and Katsaras , J. (2008). Monolayer Film Behavior of Lipopolysaccharide From *Pseudomonas aeruginosa*at the Air-Water Interface.*Biomacromolecules*.9:2799–2804.

2-Todar, K. (2002). Bacteriology Home Bage : Mechanismsof Bacterial Pathogenicity : Endotoxin. (Internet).

3-Kucˇerka, N. ; Papp-Szabo, E. ; Nieh, M. ; Harroun, T. A. ; Schooling, S. A. ; Pencer, J. ; Nicholson,E. A. ; Beveridge, T. J. and Katsaras, J. (2008). Effect of Cations On The Structure of Bilayers formed by Lipopolysaccharides Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.*J. Phys. Chem.* 112 (27) : 8057-8062.

4-Wang A, X. and Quinn, P, J.(2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic Pathway and Structure Modification.Progress in Lipid Research . 49 ;97–107.

5-العزاوي ، رحاب رشيد طه.(2001).علم السموم البكتيرية، العراق.

6-Bode, C.E. ; Brabetz, W. And Brade, H.(1998). Cloning and Characterization of 3-Deoxy-D-Manno-Octalusonic Acid (Kdo).Transferase Genes (Kdta) FromAcinetobacterBaumanni and AcinetobacterHemolyticus . Eur.J. Biochem. 254: 404-12.

7-Johonson, K. G. and Perry, M.B.(1976). Improved Techniques For The Preparation of Bacterial Lipopolysaccharide Con. J. Microbial .22:29-34.

8-Perdomo,R. and Vivian, M.(2006). Purification of *E.coli* 055:b5 lipopolysaccharide by size exclusion chromatography.*BiotecnologíaAplicada* .23:124-129.

9-Quan,N. ; Avitsur,R. ;. Stark,J.L. ; He,L. ; Shah,M. ;Caligiuri,M. ; Padgett,D.A. ; Marucha,P.T. and Sheridan,J.F(2001). Social stress increases the susceptibility to

10-Cohen, J.(2002). The Immunopathogenesis of Sepsis.Insight Review Articles. Nature . 420(19/26) : 885-891.

11-Fuentes, J. M. ; Fulton, W. B. ; Nino, D. Talamini, M. A. and De Maio, A.(2008). Atropine treatment modifies LPS-induced inflammatory response and increases survival. Inflamm. Res. 57 ; 1–7.

12-Qureshi, A.A. ; Reis,J.C. ; Papasian, C.J. ; Morrison,D.C. and Qureshi,N.(2010). TocotrienolsInhibit Lipopolysaccharide-Induced Pro-Inflammatory Cytokines In Macrophages of Female Mice.Lipids in Health and Disease .9:143.15 pages.

13-Woltmann A, Hamann L, Ulmer AJ, Gerdes J, Bruch HP, Rietschel ET. (1998). Molecular mechanisms of sepsis. Langenbecks Arch Surg. 383:2-10.

14-Yuan,G. ; Gong,Z. ; Sun,X. ;Zheng, S.andLi,X.(2006).Tea Polyphenols Inhibit Expression of iNOS and TNF-α and Prevent Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in Rats.Hepatobiliary Pancrreat Dis. Int .5: 262-267.

15-Dubois,N.;Cilles, K.A. ;Hamilton, J.K. ;Rebers, P.A. And Smith, F.(1956). Colorimetricmethods For Detection Of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28(3): 350-6.

16-Bradford, M.M.(1976).ARapid and Senstive Method for Quntitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein- Dye Binding .Analytical Biochemistry.72 : 248-254.

17-Reed , J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points .Am. J. Hyg. 27:493-7.

18- الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله .(1980) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ، العراق .

19-Chan,K.C. ; Ho,S.; Law,J.; and Yuen,V.(2002). Microwave Treatment as a Substitute for EDTA in Lysozyme-Mediated Bacterial Cell Lysis and its Effects on Bacterial Protein Release and Beta-Galactosidase Activity. Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI). 2:144-156.

20-Robeiro, M.G. ;Siqueira, A.K. ;Langoni, H. ;Paes, A.C. ;Victória, C.; Da Silva, A.V. ;Listoni, F.J.P. and Souza, A.H.(2004). Modified E-test by the addition of EDTA-Tris and dimethyl sulfoxide on the potentiation of the effects of some antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa*strains isolated from bovine mastitis.*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*56 (5):676-678.

21-Key, B. A. ; Gray, G. W. and Wilkinson, S. G.(1970). The Effect ofEthylenediaminetetra-acetate on Pseudomonas alcaligenes and the Composition of the Bacterial Cell Wall.Biochem. J. 117: 721-732.

22-Wang, A.W. and Hill,A.(1977). Chemical Analysis Of The Phenol-Water-Extractable Materials From Anabaena Flos-Aquae.Journal Of Bacteriology.130(1):P. 558-560.

23- السعدي ,حلى يونس فاضل .(2002).دراسة التـأثيرات المرضية لمتعدد السكريـد الشحمـي المستخلص من بكتريا *Aeromonashydrophila*المعزولة من عينات سريرية محلية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد.

24-مالك ، سلمى نصر الله .(2006).دراسة فعالية عديد الكريد الشحمي لبكتريا *Proteus merabilis* في الوقاية من خمج المسالك البولية في الأنموذج الحيواني ، رسـالـة ماجستير، كليـة العلوم – جامعة بغداد .

25-الكرخي ، منال خالد محمد. (2001). دراسة امراضية بكتريا *Acinobacterbaumannii* المعزلة محليا"، رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد .

26-Luchi,M. And Morrison,D.C.(2000). Comparable Endotoxic Properties Of Lipopolysaccharides Are Manifest In Diverse Clinical Isolates Of Gram-Negative Bacteria.Infection And Immunity.68(4): p. 1899–1904.

27-Gao,C.;Kennedy,S.anPonder,K.P.(2001).lipopolysaccharide potentiates the effect of hepatocyte growth factor upon replication in lung, thyroid, spleen, and colon in rats *in vivo*.Molecular therapy . 3(4) :p. 462-475.

28-Noji,T.; Takayama,M.; Mizutani,M.; Okamura,Y.; Takai,H.; Karasawa,A. And Kusaka, H.(2001).KF24345, anadenosine uptake inhibitor, suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α production and leukopenia via endogenous adenosine in mice.the journal of pharmacology and experimental therapeutics . 300(1) :200 -205.

29-Abdella, E.(2008). Bacterial Lipopolysaccharides Pretreatment Protects Against Mutagenic and Immunosuppressor Effects of Cyclophosphamide in Mice. IJCP, 1(4):155-165.

30-Al-Dughaym, A. M. and Homeida , A. M.(2008). Some immuno-suppressive trends: Effects Of Endotoxin on Camels (*Camelusdromedarius*). Saudi Journal of Biological Sciences .15 (1): 87-90.