# دراسة أمكانية استخدام مستخلص نبــات الشاي الأخضر للوقاية من التأثيرات المرضية لعديد السكريد الشحمي من الزوائف الزنجارية المعزولة محلياً

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل


**منار سعد حسين الخفاجي**

بكالوريوس علوم حياة – جامعة بغداد

2008


بأشراف


الأستاذ الدكتور

عبد عون هاشم الغانمي

الأستاذ المساعد الدكتورة

ذكرى عدنان جواد المسلماوي


ذي القعدة 1432هـ

تشرين الثاني 2011 م

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرأ باسم ربك الذي خلق (1) خلق الإنسان من
علق (2) اقرأ وربك الأكرم (3) الذي علم
بالقلم (4) علم الإنسان ما لم يعلم (5)

صدق الله العلي العظيم

وزارة التعليم

# الإهداء

إلى حبيبة أحتفظ لها في كل قلبي زاوية

إلى من تحملت معي عبء السنين الماضية

إلى من أمضت حياتها تضحية بعد تضحية

إلى من تفرح لفرحي وتحزن وحيي باكية

إلى أمي الغالية

إلى من كلله الله بالهيبة والوقار ...إلى من علمني العطاء بدون انتظار ...إلى من

أحمل أسمه بكل افتخار

إلى أبي

إلى سندي وقوتي وملاذي بعد الله

إلى من آثروني على أنفسهم

إلى أخوتي وأخواتي

أهدي هذا الجهد

منار

# شكر وتقدير

الحمد الله الذي تجلى للقلوب بالعظمة ، واحتجب عن الأبصار بالعزة ، واقتدر على الاشياء بالقدرة. اللهم يا من خص محمداً وآله بالكرامة ، وحباهم بالرسالة وخصصهم بالوسيلة ، وجعلهم ورثة الأنبياء ، وختم بهم الأوصياء والأئمة ، وعلمهم علم ما كان وما بقى ، وجعل افئدةً من الناس تهوي اليهم ، فصل على محمد وآله الطاهرين وافعل بنا ما أنت أهله في الدين والدنيا والآخرة إنك على كل شيء قدير . أتقدم بشكري الجزيل الى عمادة كلية العلوم وقسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي ، كما أتقدم بالشكر الجزيل الأستاذ الدكتور عبد عون هاشم الغانمي والأستاذ المساعد الدكتورة ذكرى عدنان جواد اللذين تفضلا بأشرافهما وتوجيهاتهما طوال فترة إعداد البحث .

وأتقدم بخالص الشكر والتقدير الى جميع العاملين في قسم علوم الحياة و أخص بالذكر منهم الدكتور المدرس حسن جميل من خلال مساعدته في توفير بعض المواد المهمة كما أشكر الدكتورة وفاق جبوري البازي في كلية التربية / قسم علوم الحياة لمساعدتها في قراءة المقاطع النسيجية .

كما أجد من الوفاء أن أتقدم بالشكر و التقدير الى الأستاذ الدكتور علي عبد الكاظم الغانمي لأبداءه النصح والمساعدة خلال مدة البحث .

كما أوجه شكري و اعتزازي الى زملائي من طلبة الدراسات العليا لدعمهم و مساعدتهم لي طيلة مدة الدراسة و أوجه امتناني لكل من ساعدني ممن نسيت ذكرهم .

وأتقدم بخالص شكري وامتناني وحبي الى من ساندوني في الضراء قبل السراء عائلتي و خصوصاً من أعطت دون مقابل شمس دربي ، الحبيبة الغالية امي.

**منار**

# إقرار الأستاذ المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء/كلية العلوم وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع :

الاســـم : د.عبد عون هاشم

المرتبة العلمية : أستـاذ

التوقيع :

التأريخ :

الاســـم : د. ذكرى عدنان المسلماوي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

التأريخ :

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاها المقدمة من قبل المشرف ، أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاســـم :

المرتبة العلمية :

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

التأريخ :

# إقرار المقوم العلمي

أقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (دراسة أمكانية استخدام مستخلص نبات الشاي الأخضر للوقاية من التأثيرات المرضية لعديد السكريد الشحمي من الزوائف الزنجارية المعزولة محلياً) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجــة الماجستير في علوم الحياة تقويماً علمياً.

التوقيع :

الاســم :

المرتبة العلمية :

التأريخ :

# إقرار المقوم اللغوي

أقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (دراسة أمكانية استخدام مستخلص نبات الشاي الأخضر للوقاية من التأثيرات المرضية لعديد السكريد الشحمي من الزوائف الزنجارية المعزولة محلياً) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة إذ تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب و صحة التعبير .

التوقيع :

الاســم :

المرتبة العلمية :

التأريخ :

# إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضـــاء لجنة المناقشة ، نشهد إننا أطـلعنا على هـــذه الرسالة ، وقـد ناقشنا الطالبـــة **(منار سعد حسين)** في محتوياتها وفيما له عـلاقة بها بتاريخ 18-12-2011 ونـــرى إنـــها جديرة لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة وقد نالت تـــقدير (جيد جداً).

**رئيـــس اللجـنة**

**التوقيع :**

**الاســم : د.قاسم نجم عبيد**

**المرتبة العلمية : أستاذ**

**التأريخ :**

**عضـــــواً**

**التوقيع :**

**الاســم : د.هيام عبد الرضا**

**المرتبة العلمية : أستاذ مساعد**

**التأريخ :**

**عضـــــواً**

**التوقيع :**

**الاســم : د.ناجح هاشم كاظم**

**المرتبة العلمية : أستاذ مساعد**

**التأريخ :**

**عضـــــواً و مشـرفـــاً**

**التوقيع :**

**الاســم : د.عبد عون هاشم علوان**

**المرتبة العلمية : أستاذ**

**التأريخ :**

**عضـــــواً و مشـرفـــاً**

**التوقيع :**

**الاســم : د. ذكرى عدنان جواد**

**المرتبة العلمية : أستاذ مساعد**

**التأريخ :**

**مصادقــة عمـــادة كـــليــة العـــلـوم**

**التوقيع :**

**الاســم : د. عامر عبد الأمير محمد علي**

**المرتبة العلمية : أستاذ مساعد**

**العنوان : كلية العلوم / جامعة كربلاء**

**الـتأريخ :**

## الخلاصة

تم في هذه الدراسة استخلاص عديد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide) الخام بطريقة الهضم الأنزيمي والفينول الساخن من عزلة محلية من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تم الحصول عليها من مريض يعاني من خمج السبيل البولي (Urinary tract infection).

تم تحديد الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ و النصفية $LD_{50}$ للفئران من المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي وكانتا 175 مايكروغرام/ 0.5 مليلتر و137.5 مايكروغرام/ 0.5 مليلتر لكل فأرة على التوالي ، كما تم فحص المقاطع النسيجية لعضوي الكبد و الطحال للفئران المصابة بالجرعة الممرضة او التحت مميتة و هي 125 مايكروغرام/ 0.5 مليلتر ، لوحظت التأثيرات المرضية المتمثلة بالاحتقان ، النزف الدموي و هجرة وارتشاح الخلايا الالتهابية في نسيج الكبد ، أما في الطحال فكان هنالك فرط التنسج في اللب الأبيض و هو ناتج عن الفعل التقسيمي لعديد السكريد الشحمي على خلايا B اللمفاوية . كما أتضح أن هنالك نقصان في العدد الكلي لخلايا الدم البيض WBC للفئران المريضة حيث بلغ العدد 5.1 X $10^3$ خلية/ ملم$^3$ بعد مرور ثلاثة أيام من الحقن بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي مقارنة بالسيطرة التي بلغت 6.55 X $10^3$ خلية/ ملم$^3$.

ولدراسة أمكانية التقليل من هذه التأثيرات المرضية باستخدام الشاي الأخضر *Camellia sinensis* تم تحضير مستخلص مائي حار ومستخلص كحولي باستخدام الكحول الأثيلي و تجفيفهما وتم تحديد الجرعة الوقائية المثلى للمستخلص المائي الحار لنبات الشاي الأخضر و بتجريع الفئران بتراكيز 5، 10، 15، 20 ملغم محضرة في 0.5 مليلتر/فأرة و بعدها حقنت الفئران بالجرع المهلكة الكلية $LD_{100}$ ، أما بالنسبة للمستخلص الكحولي فقد تم تحديد الجرعة الوقائية المثلى بعملية الحقن لنفس التراكيز أعلاه و بعدها الحقن بعديد السكريد الشحمي الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ ، من خلال ما تقدم وجد أن الجرع الوقائية المثلى من المستخلص المائي الحار كانت 15 ملغم/0.5 مليلتر/ فأرة و المستخلص الكحولي كانت 10 ملغم/مليلتر0.5 / فأرة و بنسبة نجاة 100%.

تم أيضاً اختبار تأثير الجرع الوقائية المثلى من مستخلصات الشاي الأخضر في التقليل من التأثيرات المرضية لعديد السكريد الشحمي في الفئران و وجد أن المستخلص الكحولي و بتركيز10 ملغم/0.5 مليلتر/ فأرة كان الأفضل و الأكثر كفاءة من المستخلص المائي الحار و بتركيز 15ملغم/ 0.5 مليلتر/ فأرة ، أتضح ذلك من خلال فحص المقاطع النسيجية لأعضاء الفئران و كذلك أعداد خلايا الدم البيض حيث كانت مشابهة للسيطرة تقريباً .

| الرقم | العنـــــوان | الصفحة |
|---|---|---|
| | الخلاصة | I |
| | قائمة المحتويات | III |
| | قائمة الأشكال | VII |
| | قائمة الجداول | IX |
| | قائمة المختصرات | X |
| -1 | الفصل الأول : المقدمة Introduction | 1 |
| الفصل الثاني : استعراض المراجع Literature Review | | |
| -2 | استعراض المراجع Literature Review | 3 |
| 1-2 | تأريخ *P.aeruginosa* وتسميتها | 3 |
| 2-2 | تصنيف بكتريا *P.aeruginosa* | 4 |
| 3-2 | الصفات العامة للنوع *P.aeruginosa* | 5 |
| 4-2 | بيئة النوع *P.aeruginosa* والعوامل المؤثرة في نموه | 6 |
| 5-2 | وبائية الجنس *Pseudomonas* وأمراضيته | 7 |
| 6-2 | عوامل الضراوة | 11 |
| 1-6-2 | الشعيرات Pili | 11 |
| 2-6-2 | الطبقة اللزجة The slime lager | 11 |
| 3-6-2 | Alginate | 12 |
| 4-6-2 | الانزيمات Enzymes | 12 |
| 1-4-6-2 | الانزيمات الحالة للدهون Lipase | 12 |
| 2-4-6-2 | انزيم إيلاستيز Elastase enzyme | 12 |
| 3-4-6-2 | انزيم البروتير Protease enzyme | 13 |
| 4-4-6-2 | انزيم الليسثينيز Lecithinase enzyme | 13 |
| 5-4-6-2 | انزيم الفوسفايز القاعدي Alkaline phosephatase | 13 |
| 6-4-6-2 | الانزيم الحال للحامض النووي المنقوص الأوكسجين (Deoxyribo Nuclease DNas ) | 13 |
| 7-4-6-2 | انزيم Gelatinase | 14 |
| 8-4-6-2 | الانزيم الحال للـليفين Fibrinolysin | 14 |
| 5-6-2 | السموم Toxins | 14 |
| 1-5-6-2 | السم الخارجي Exotoxin | 14 |
| 2-5-6-2 | السم الداخلي Endotoxin أو عديد السكريد الشحمي (LPS) Lipopolysaccharide | 15 |
| 2-3-5-6-2 | إستخلاص عديد السكريد الشحمي من الخلايا البكتيرية | 22 |

| | | |
|---|---|---|
| 3-3-5-6-2 | التأثيرات المرضبة والمناعية لـعديد السكريد الشحمي | 22 |
| 7-2 | النباتات الطبية | 25 |
| 8-2 | وصف النبات | 28 |
| 9-2 | التوزيع الجغرافي للشاي الأخضر | 29 |
| 10-2 | المواد الفعالة | 29 |
| 11-2 | الأهمية الطبية للشاي الأخضر | 30 |
| 12-2 | تأثيرات الشاي الأخضر على فعل وأمراضية عديد السكريد الشحمي | 32 |
| الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل Materials & Methods | | |
| -3 | المواد وطرائق العمل Materials & Methods | 34 |
| 1-3 | المواد | 34 |
| 1-1-3 | المواد الكيمياوية المستخدمة | 34 |
| 2-1-3 | الأجهزة المستخدمة | 36 |
| 3-1-3 | الأوساط الزراعية | 37 |
| 1-3-1-3 | وسط غراء الماكونكي | 37 |
| 2-3-1-3 | وسط غراء المغذي | 37 |
| 3-3-1-3 | Medium A-pyocyanin(King A) | 37 |
| 4-3-1-3 | وسط غراء ثلاثي السكر والحديد | 37 |
| 5-3-1-3 | وسط غراء اليوريا | 38 |
| 6-3-1-3 | وسط الحركة | 38 |
| 7-3-1-3 | وسط ماء الببتون | 38 |
| 8-3-1-3 | وسط أحمر المثيل – فوكس بروسكاور | 38 |
| 9-3-1-3 | وسط غراء سترات سيمون | 39 |
| 10-3-1-3 | وسط الجلاتين | 39 |
| 11-3-1-3 | وسط تخمر السكريات | 39 |
| 12-3-1-3 | مرق نقيع القلب والدماغ | 39 |
| 4-1-3 | الكواشف المحاليل | 40 |
| 1-4-1-3 | الكواشف | 40 |
| 1-1-4-1-3 | محاليل ملون غرام | 40 |
| 2-1-4-1-3 | كاشف كوفاكس | 40 |
| 3-1-4-1-3 | كاشف احمر المثيل | 41 |
| 4-1-4-1-3 | كاشف باريت | 41 |
| 5-1-4-1-3 | كاشف أنزيم السايتوكروم اوكسيديز | 41 |
| 6-1-4-1-3 | كاشف أنزيم الكاتاليز | 41 |
| 2-4-1-3 | المحاليل المستعملة في أستخلاص عديد السكريد الشحمي LPS الخام من الخلايا البكتيرية | 42 |
| 3-4-1-3 | المحاليل المستعملة في تقدير كمية الكاربوهيدرات في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي LPS | 43 |
| 4-4-1-3 | المحاليل المستعملة في تقدير كمية البروتين في المستخلص | 43 |

| | | |
|---|---|---|
| | الخام لعديد السكريد الشحمي LPS | |
| 5-4-1-3 | المحاليل والمواد المستعملة في العد الكلي لخلايا الدم البيض | 44 |
| 6-4-1-3 | المحاليل والمواد المستعملة في تحضير المقاطع النسيجية للأعضاء المنتخبة من الفئران | 45 |
| 5-1-3 | الحيوانات المختبرية | 45 |
| 2-3 | طرائق العمل | 46 |
| 1-2-3 | العينات | 46 |
| 1-1-2-3 | العينة النباتية | 46 |
| 2-1-2-3 | العزلة البكترية | 46 |
| 2-2-3 | الحيوانات المختبرية | 46 |
| 3-2-3 | تحضير مستخلصات الشاي الأخضر | 46 |
| 4-2-3 | الأختبارات التشخصية للعزلة البكتيرية | 47 |
| 1-4-2-3 | شكل نمو على وسط غراء الماكونكي | 47 |
| 2-4-2-3 | الفحص المجهري | 47 |
| 3-4-2-3 | أختبار النمو على وسط King(A) | 47 |
| 4-4-2-3 | أختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد | 48 |
| 5-4-2-3 | أختبار فعالية أنزيم السايتوكروم اوكسيديز | 48 |
| 6-4-2-3 | أختبار الكشف عن أنزيم الكاتاليز | 48 |
| 7-4-2-3 | أختبار الحركة | 48 |
| 8-4-2-3 | أختبار الكشف عن انزيم محلل اليوريا | 48 |
| 9-4-2-3 | أختبار استهلاك السترات | 49 |
| 10-4-2-3 | أختبار الأندول | 49 |
| 11-4-2-3 | أختبار المثيل الأحمر | 49 |
| 12-4-2-3 | أختبار فوكس بروسكاور | 49 |
| 13-4-2-3 | أختبار تميع الجلاتين | 49 |
| 14-4-2-3 | أختبار تخمر السكريات | 50 |
| 15-4-2-3 | أستعمال نظام API20E للعائلة المعوية | 50 |
| 5-2-3 | أستخلاص عديد السكريد الشحمي | 51 |
| 1-5-2-3 | جمع الخلايا البكتيرية وتجفيفها | 51 |
| 2-5-2-3 | الهضم الأنزيمي للخلايا البكتيرية | 51 |
| 3-5-2-3 | عملية الأستخلاص | 52 |
| 6-2-3 | التحليل الكيميائي لعديد السكريد الشحمي الخام | 53 |
| 1-6-2-3 | تقدير كمية الكاربوهيدرات الكلية | 53 |
| 2-6-2-3 | تقدير كمية كمية البروتينات في عديد السكريد الشحمي الخام | 55 |
| 7-2-3 | تحديد الجرعة المهلكة الكلية ($LD_{100}$) لعديد السكريد الشحمي الخام المستخلص من بكتريا *P.aeruginosa* | 58 |
| 8-2-3 | دراسة التأثيرات المرضية في الفئران المحقونة بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام | 58 |
| 1-8-2-3 | التغيرات الظاهرية الملحوظة على الفئران المصابة وأعضائها | 58 |
| 2-8-2-3 | دراسة التغيرات المرضية النسيجية لأعضاء الفئران | 59 |

| | | |
|---|---|---|
| 9-2-3 | تحديد الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص النباتي ضد الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ عديد السكريد الشحمي الخام | 60 |
| 10-2-3 | دراسة تأثير الجرعة الوقائية المثلى من نبات الشاي الأخضر في أمراضية عديد السكريد الشحمي الخام للفئران | 61 |
| 11-2-3 | العد الكلي لخلايا الدم البيض | 62 |
| 12-2-3 | التصميم والتحليل الأحصائي | 63 |
| | الفصل الرابع :النتائج والمناقشة | |
| 4- | النتائج والمناقشة | 64 |
| 1-4 | عزل وتشخيص النوع *P.aeruginosa* | 64 |
| 1-1-4 | العزل | 64 |
| 2-1-4 | الفحص المجهري | 64 |
| 3-1-4 | الحقائق المظهرية للمستعمرات | 64 |
| 4-1-4 | الفحوصات الكيميوحيوية | 64 |
| 2-4 | استخلاص عديد السكريد الشحمي | 66 |
| 3-4 | التحليل الكميائي عديد السكريد الشحمي | 67 |
| 4-4 | تحديد الجرعة المهلكة النصفية $LD_{50}$ والكلية $LD_{100}$ للفئران المختبرية من مستخلص عديد السكريد الشحمي الخام | 68 |
| 5-4 | التغيرات المرضية الناتجة عن أصابة الفئران بعديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* | 71 |
| 1-5-4 | التغيرات الظاهرية | 71 |
| 2-5-4 | تأثير عديد السكريد الشحمي في عدد خلايا الدم البيض للفئران | 72 |
| 3-5-4 | التغيرات النسيجية المرضية | 73 |
| 6-4 | تحديد الجرعة الوقائية المثالية من المستخاص النباتي | 77 |
| 7-4 | دراسة تأثير المستخاص النباتي داخل اجسام الفئران المختبرية والمعاملة بمستخلص عديد السكريد الشحمي | 78 |
| | الأستنتاجات والتوصيات Conclusions & Recommendations | |
| | الأستنتاجات | 85 |
| | التوصيات | 85 |
| | المصادر References | |
| | المصادر العربية | 86 |
| | المصادر الأجنبية | 87 |

## قائمـــــــة الأشكال


| رقم الشكل | عنـــوان الشكل | الصفحة |
|---|---|---|
| 1-2 | مكونات غشاء البكتريا السالبة لملون غرام | 17 |
| 2-2 | عديد السكريد الشحمي LPS للبكتريا السالبة لملون غرام | 19 |
| 3-2 | يوضح زهرة و أوراق الشاي الأخضر | 28 |
| 1-3 | المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز | 54 |
| 2-3 | المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري | 57 |
| 1-4 | الأختبارات التشخيصية لبكتريا *P.aeruginosa* باستعمال نظام systemApi 20E | 64 |
| 2-4 | تحديد الجرعة المهلكة للنصف(LD50) عند حقن الفئران بمستخلص عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* | 70 |
| 3-4 | **نسبة وزن الكبد الى وزن الجسم للفئران المحقونة بـ 125مايكروغرام من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aevuginosa*** | 71 |
| 4-4 | **نسبة وزن الطحال الى وزن الجسم للفئران المحقونة بـ 125مايكروغرام من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aevuginosa*** | 72 |
| 5-4 | **تأثيرمستخلص LPS الخام في عدد خلايا الدم البيض للفئران** | 73 |
| 6-4 | **مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS) ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X** | 75 |
| 7-4 | **مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 ملليتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا*P.aeruginosa*، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X** | 75 |
| 8-4 | **مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 ملليتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا*P.aeruginosa*، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X** | 76 |
| 9-4 | **مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS) ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X** | 76 |
| 10-4 | **مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 ملليتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا*P.aeruginosa*، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X، يوضح تضخم اللب الأبيض و إندماجه** | 77 |
| 11-4 | **تأثير المعاملة المسبقة بالشاي الأخضر على عديد السكريد الشحمي** | 79 |
| 12-4 | **تأثير مستخلص الشاي الأخضر الخام في عدد خلايا الدم البيض** | 80 |
| 13-4 | **مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 ملليتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا*P.aeruginosa* ومعاملة مسبقة بالمستخلص المائي الحار بتركيز 15ملغم/0.5 ملليتر، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X** | 83 |

| | | |
|---|---|---|
| 14-4 | مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 ملليتر من عـديد السكـريد الشحمـي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* و معاملة مسبقة بالمستخلص المائي الحار للشاي الأخضر بتركيز 15 ملغم/0.5 ملليتر، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X | 83 |
| 15-4 | مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 ملليتر من عـديد السكـريد الشحمـي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* ومعاملة مسبقة بالمستخلص الكحولي بتركيز10ملغم/0.5 ملليتر، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X | 84 |
| 16-4 | مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 ملليتر من عـديد السكـريد الشحمـي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* ومعاملة مسبقة بالمستخلص الكحولي بتركيز10ملغم/0.5 ملليتر، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين | 84 |


## قائمة الجداول

| رقم الجدول | عنـــوان الجدول | الصفحة |
|---|---|---|
| **1-3** | تراكيز سكر الكلوكوز المستخدمة فـــي تحضير المنحـــنى القيـــاسي للكلوكوز | 53 |
| **2-3** | تراكـــيز البـــومين المصل البقري المستخدمة فـــي تحضير المنحـــنى القيـــاسي | 56 |
| **3-3** | **معاملـــــــة الفئران بالجرعة الوقائية المثلى من نبات الشـــاي الأخضرو الجرعة الممرضة من عديدالسكريدالشحـمي الخـــام** | 62 |
| **1-4** | نتائج الأختبارات التشخيصية للنوع *P.aeruginosa* | 65 |
| **2-4** | نتائج الجرعـــة المهلكة النصفية $LD_{50}$ والكـلية $LD_{100}$ لمستخلص عـديد السكـــريـد الشحمـــي الخـــام لعـــزلة *P.aeruginosa* | 69 |


## قائمة المختصرات

| المختصر | الوصف |
|---|---|
| ADH | Arginine dehydrolase |
| Api | Analytical profile index |
| BPI | Bactericidal/permeability jncreasing protein |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CD14 | Cluster of differentiation |
| CIT | Citrate utilization |
| CSF | Crerbrospinal fluid |
| DIC | Disseminate intravascular clot |
| GEL | Gelatinase |
| IK-B | Inhibitor of kappa B |
| IKK | Inhibitor of nuclear factor kappa- B kinase |
| IL | Interleukin |
| IND | Indole production |
| KDO | 2 – Keto – 2- deoxyctonate |
| LBP | LPS- binding protein |
| $LD_{100}$ | Leathal dose 100 |
| $LD_{50}$ | Leathal dose 50 |
| LDC | Lysine decarboxylase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MD2 | Myeloid differentiation-2-protein |
| NF-KB | Nuclear factor – Kappa Beta |
| NO | Nitric oxid |
| ODC | Ornithine decarboxylase |
| PAF | Patelelet activating factor |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PMNs | Polymorpho nuclear leukocytes |
| TDA | Treptophane deaminase |
| TLR4 | toll- like receptor |
| TNF-$\alpha$ | Tumor necrosis factor alpha |
| URE | Urease |
| VP | Sodium pyruvate(Acetoin production) |
| $VP_1$ | Potassium hydroxid(KOH) |
| $VP_2$ | $\alpha$-naphthol |
| WBCs | White blood cells |

# الفصل الأول

# المقدمة

# الفصل الأول

## 1- المقدمة Introduction

يعد الجنس *Pseudomona* أحد أجناس العائلة Pseudomonadaceae إذ تكون أنواع هذا الجنس واسعة الانتشار في الطبيعة ، حيث توجد في التربة و المياه السطحية متضمنة المحيطات و البرك والحمامات المعدنية وتوجد بأعداد قليلة في أمعاء الإنسان والحيوان وعلى أسطح النباتات (Anon, 2000) و قد تم عزل هذا الجنس من عينات الإدرار و خراجات الجروح والتقيحات والقشع حيث يعد هذا الجنس ممرضاً انتهازياً (Opportunistic pathogen) و خصوصاً في مرضى ضعيفي المناعة (Immunocompromised patients) Kayser *et al* ., ) (2008 ، وحيد ; Vives-Flórez *et al*., 2006 ; 2005)

يمتلك النوع *Pseudomonas aeruginosa* عوامل أمراضية متعددة ويعد عديد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide) أو السم الداخلي (Endotoxin) من عوامل الأمراضية المهمة وهو من المكونات الأساسية لجدران الخلايا السالبة لملون غرام وبحكم موقعه من الجدار الخلوي فهو يتوسط عملية التداخل بين الخلية البكتيرية ومحيطها الخارجي ، و يعمل على حماية الخلية البكتيرية من الجزيئات المؤذية والسامة ، كما يساعد الخلية البكتيرية على الالتصاق و الاستيطان داخل الأنسجة . يتألف عديد السكريد الشحمي من ثلاث مناطق هي الدهن A (Lipid A) واللب والسلسلة الجانبية O- (O-side chain) ، وتعد منطقة الدهن A (Lipid A) فعالة بايولوجياً غير إن شدة الأمراضية و الضراوة تتطلب وجود السلسلة الجانبية (O-side chain) ، يسبب عديد السكريد الشحمي (LPS) تأثيرات مرضية مختلفة في الإنسان والحيوان مثل التخثر وانخفاض عدد خلايا الدم البيض و انخفاض ضغط الدم و فشل الوظيفي المتعدد الأعضاء ( Multiple organ dysfunction) و الموت . (Todar , 2002)

يسبب النوع *Pseudomonas aeruginosa* خمج السبيل البولي و التنفسي (Urinary & Respiratory tract infection) وخمج الحروق والجروح و التهاب السحايا (Meningitis).(Mousa , 1997 ; Garbe *et al*., 2010) .

لقــد أوضـــحت العـــديد من الدراسات والمصادر تأثير المستخلصات النباتيـــة للشاي الأخضر *Camellia sinensis* والــذي لهُ وظائف بـــــايولوجية مهمة ، كمضاد للأكسدة (Antioxidants) ومضاد للالتهابات (Anti-inflammatory ) وله تأثير مضاد للسرطان (Anticancer) كما يستخدم لعلاج الإسهال و اضطرابات المعدة وعسر البول والصداع وغيرها (Sarma *et al*., 2008) .

هدفت الدراسة ما يلي :-

تهدف الدراسة الى التحري عن أمكانية استخدام مستخلصات (المائي و الكحولي) الشاي الأخضر في الوقاية من التأثيرات المرضية لعديد السكريد الشحمي المستخلص من الزوائف الزنجارية . و لتحقيق هذا الهدف اجريت الخطوات التالية :

1 . استخلاص عديد السكريد الشحمي الخام للزوائف الزنجارية بطريقة الهضم الأنـــزيمـــي و الفينول الساخن .

2. دراسة الضرر النسيجي للأعضـــاء الحيـــوان التجريبي .

3. الاستخلاص المائي و الكحولي للشاي الأخضر .

4. دراسة التغيرات النسيجية لـراشح عديد السكريد الشحمي بعد المعاملة بالمستخلص المائي الحار و الكحولي للشاي الأخضر .

# الفصل الثاني
# استعراض المراجع

# الفصل الثاني

## 2- استعراض المراجع Review of Literatures

### 2-1 تأريخ بكتريا *Psedumonas aeruginosa* وتسميتها

عزلت هذه البكتريا لأول مرة عام 1872 من قبل العالم Schroeter من جروح متقيحة واطلق عليها انذاك *Bacterium aeruginosa* ،تم عزل هذه البكتريا لأول مرة في مزارع نقية (Pure culture) من جروح جلدية ذات لون أخضر مزرق من قبل العالم Gessard عام 1882 ، وميزها بكونها خلايا بكترية عصوية أطلق عليها أسم *Bacillaus pyocyaneas* ثم سميت *Pseudomonas pyocyaneas* والـ *Pseudomonas* كلمة أغريقة المقطع الأول pseudo يعني زائف (False)أما الثاني monas يعني وحدة (Unite) ، وجرى تبديل التسمية مرات عدة حتى أطلق عليها *Pseudomonanas aeruginosa* من قبل العالم Migula عام (1900)على أساس إنتاجها لصبغة Pyocyanin الخضراء المزرقة ، إذ إن كلمة aeruginosa هي كلمة اغريقية تعني زنجار (Verdigris) أو صدأ نحاسي (Copperrust)، أن (Schrorter) و (Gessard) كانا أول من لاحظ ان هذه البكتريا تنتج نوعين من الصبغات هي (Pyocyanin) الزرقاء المخضرة(Bluish green) و (Floureescein) الصفراء المخضرة (Greenish yellow).تنتمي هذه البكتريا الى عائلة Pseudomonadaceae والتي تضم أكثر من 140نوعاً وهي ذات أهمية طبية و تسبب الإصابات المختلفة في الأنسان. (Forkner, 1960; Moore and; Chopra ,1985 Forman,1966).

في العام 1950 قام الباحث Burkhdder بعزل *P.cepacia* بوصفها كائنا ممرضاً للنبات ثم سميت *Burkholderia cepacia* ومنذ ذلك الوقت جرى أضافة أنواع جديدة الى جنس Pseudomonanas( Wilson *et al*., 1983 ; Wilson and Dowling , 1998) ، تشمل مجموعة *Pseudomonana*s أنواعاً عديدة أكثرها رمية المعيشة ذات انتشار واسع في التربة ، المياه ،النباتات والحيوانات، كما توجد كنبيت طبيعي في أمعاء و جلد الإنسان (Jawetz *et al* ., 2001 ; Atlas, 1995) . الا أن أنواعاً قليلة منها

ممرضة للنبات و الحيوان ، ويعد النوع *P.aeruginosa* مـــن أكثر الأنـــواع شيوعاً فـــي أمراضيتها للأنســان ( Schlegel ,1993 ) .

## 2-2 تصنيف بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

## Classification of *Pseudomonas aeruginos*

صنفت بكتريا *P.aeruginosa* استنـاداً الى موسوعة بيرجـي لعلـم البكتريا Bergey's Manual of Determinative Bacteriology لعام (1994)ضمن مجموعة البكتريا السالبة لملون غرام الحقيقية التي تمتلك جداراً خلوياً(Holt *et al*., 1994). ويعـود الجنس *Pseudomonanas* الى عائلة Pseudomonadaceae ، ويـوجد نـظامان لتصنيف الأحـياء المجهرية التـي تـعود لهذه العـائـلـة :

النظام الأول : أفترض من قبل Gilard ، والذي يعتمد على الصفات المظهرية . النظام الثاني : ويعتمد على دراسة التشابة بين DNA وrRNA .(Braude *etal*., 1981 ; Japoni *et al.,* 2009 ; Jawetz *et al* ., 2001 ).

أما من حيث التصنيف العلمي الكامل لبكتريا*P.aeruginosa* فهو كالآتـــي:-

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *aeruginosa*

(George *et al* ., 2004)

## 3-2 الصفات العامة للنوع *P.aeruginosa*

يعود جنس *Pseudomonas* الى العائلة Pseudomonadaceae ، التي تضم الاجناس منها *Azomonas*، *Azotolocter* ، *Cellvilorio* ، *Mesophilobacter* ، *Rhizobaeter* ، *Rugamonas* ،. و تنضوي الأنواع التابعة لجنس *Pseudomonas* في خمس مجاميع ويعود الجنس *P.aeruginosa* الى المجموعة الاولى من النظام الثاني للتصنيف و التي تضم السلالة (Flurescent strain) ، إذ يعد النوع *P. aeruginosa* هو النوع المثالي لمجموعته و التي تضم اثنا عشر نوعاً اخر (Japoni ; Krieg and Holt , 2001)

*P. aeruginosa* توصف بكتريا *et al.,*2009 بأنها عصيات سالبة لملون غرام ( Gram stain) ،متحركة بواسطة سوط قطبي وحيد (Unipolar flagellum) ، أبعادها تتراوح بين (0.5 – 0.8 ) و (1.5 – 3 ) مايكروميتر، غيرمكونة للسبورات، درجة الحرارة المثلى لنموها هي 37 °م ،وأن نمو البكتريا *P.aeruginosa* عند درجة حرارة 42 °م هو ما يميزها عن أنواع اخرى للجنس *Pseudomonas* وهي غير قادرة على النمو عند درجة حرارة 5م° ، كما يمكن تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بصورة أولية من خلال رائحة مستعمراتها النامية على الوسط الزرعي إذ انها ذات رائحة تشبه رائحة العنب (Grap-like odor) ولها بريق معدني (Metalic sheen) ( Japoni *et al* ., 2009 ; Brooks *et al*., 1998 ) ، أن بكتريا *P.aeruginosa* هي بكتريا اجبارية هوائية (Obligate aerobic)، (Krieg and Holt, 2001) ، الا أنها يمكن أن تعتبر من قبل البعض اختيارية لاهوائية ( Facultative anaerobs ) اذ انها تستطيع النمو عند حدوث انخفاض جزيئي او كلي للاوكسجين ، كما انها قادرة على النمو في ظروف لاهوائية في حالة توفر النترات $NO_3$ كمستقبل نهائي للاكترون في السلسلة التنفسية بدلاً من الأوكسجين . ( Anon ,2008)

تحصل بكتريا *P.aeruginosa* على الطاقة متن خلال عملية الأكسدة للكاربوهيدرات وليس التخمر حيث تعد لا تخمرية (Nonfermentative) لها القابلية على النمو على أبسط الاوساط الزرعية الحاوية على (Acetate) كمصدر كاربوني و (Ammonium sulphate) كمصدر نيتروجيني ، (Krieg and Holt , 2001 ; Jawetaz, ,2001 ; Hassett,1996) .

لبكتريا *P.aeruginosa* القابلية على النمو على مختلف الأوساط الزراعية فعند نموها على وسط (Nutrient agar) فأن مستعمراتها واسعة ،قليلة التحدب ، ملساء ، ذات حافات غير منتظمة ملونة للوسط بلون ازرق مخضر(Greenish blue) وهذا المظهر تكون مسؤولة عنه صبغة(Pyocyanin) وأن أنتاج تلك الحبيبات يعطي مظهراً مميزاً للقيح الناتج عن الاصابة بتلك البكتريا والتي تعرف أيضاً(Pyoverdin) فضلاً عن أنتاجها صبغة(Pyorubin) البنية الحمراء ، (Kayser *et al.,* 2005 ; وحيد ، 2008 ) .

يعد النوع *P.aeruginosa* ممرضاً انتهازياً(Opportunstic pathogen) مسبباً لأخماج المستشفيات (Nosocomial infection) و بصورة خاصة في المرضى ضعيفي المناعة ( Immunocompromised patient ) (Vives-Flórez *et al* ., (2006، حيث توجد هذه البكتريا بنسبة 10% في براز الأشخاص الطبيعيين و المرضى خارج المستشفيات و تزداد الى 30 % عند بقاء المريض لفترة طويلة في المشفى ذكرها الطريا ، (2002 ) نقلاً عن العباجي و الجماس، (1999). كما وعزلت من الإدرار و خراجات الجروح والتقيحات والقشع الناتج عن خمج السبيل التنفسي العلوي (Upper Respiratory tract infections) وعزلت من اللعاب كحالات التلف الكيسي وتوسع القصبات ، ومن حالات تجرثم الدم (Bacteremia) والتي مصدرها الإصابات الجلدية والحروق و عزلت من السائل النخاعي الشوكي (Cerebrospinal fluid CSF ) للمرضى المصابين بالتهاب السحايا (Meningitis) ، وأيضاً عزلت من الأشخاص المصابين بالتهابات الأذن الخارجية (Otitis externa) (Reid and Porter,1981; وحيد ، 2008) .

## 4-2 بيئة النوع *P.aeruginosa* والعوامل المؤثرة في نموه

إن كـل أنـواع الجنس *Pseudomonas* تكـون واسـعة الانتشار في الطبيعة وأغلب أنواعه رمـــية المـــعيشة (Saprophytes) (Atlas , 1995) ، إذ تتواجد بأعـداد قليلة بشكل نبيت طبيعي في أمعاء الإنسان ( Normal intestinal flora) وعلى الجلد (Jawet *et al*., 2001 ; Bradshaw , 1973 ) وتـزداد نسبتها في المرضى الراقدين في المستشفيات كونها أهـــم عامـــل تلوث لأجواء المستشفيات ، حيث تمكـن Whipy عـــام 1972 من عزلها من مناطق مختلفة مثل المرافق الصحية و أرضيات المستشفيات ومياه الحنفيات والملابس والأسرة وحافضات الصابون، فضلاً عن انتقالها بواسطة أيـادي العامـلين ، كما عزلت من الأطعمة المحضرة في المستشفيات كاللحوم والخضر و الفواكه مع أجناس أخرى مثل *Klebsilla* و*E.coli* (Japoni *et al*.,2009 ; Shooter , 1971 ) ، كما توجد على أسطح النباتات و أسطح الحيوانات، حيث تتواجد بأعداد قليلة في أمعاء الحيوان حيث أنها كائنات ممرضة للنبات أكثر منها للحيوانات ، كما تكون واسعة الأنتشار في التربة والميـــاه السطحية بضمنها المحيطات ، كما تتواجد فـــي ميـــاه البـــرك والحمامات المعدنية والبيئـات الرطبة و تم عزلها من هواء و أرضيات المستشفيـات (Kayser ; Anon , 2000;Highsmith *et al*.,1985;Iglewski,1980 *et al*.,2005). إن النـــوع *P.aeruginosa* لها القـــابلية على النمو في الديزل و الوقود النفاذ حيث تعرف بـ (HUM)(Hydrocarbon Utilizing Microorganism) مكونة حصيرة جلاتنية غـــامقة تشبـــه الطحالب (Anon,2008) . تتحمل مدى واسعاً من الظروف الفيزيائية ومنها درجة الحرارة ما بين (4–45)°م ، (Krieg and Holt, 2001)وأمـــا الـــرقم الهيـــدروجـــيني الأمـــثـل لنمـــوهـا فيتـــراوح بيـــن (7.4–7.6) ، (Forbes *et al*., 1998 ; King and Phillips 1978 ) ، كما تمتاز بمقاومتها العالية للمواد الكميائيـة و العوامل الفيزيائيـة كالحـــرارة والجفـــاف والـــرطوبة والمضـــادات الحيـــويـــة و المطهـــرات ( Antiseptics & Disinfectant) وأحياناً تستطيـع النمـــو فـــي التراكيز الخفيفـــة لهـذه المحـــاليل ولاسيما المستعملة و القـديمة (Nakogawa and Shiraish, 1993) .

## 5-2 وبائية النوع *P.aeruginosa* وأمراضيته

يعد الجنس *Pseudomonas* و الأنواع التابعة له ممرضات انتهازية (Opportunistic pathogens) وبصورة رئيسة في خمج السبيلين التنفسي والبولي (Resrpiratory and Urinary tract infections) و جروح الحروق (Garbe *et al* ., 2010) ، وكذلك مسببات لخمج المستشفيات الحاد والمزمن (Chronic of acute nosocomial infections) و خاصة في المرضى ضعيفي المناعة (Immun compromiseal patients) ، اذ تمتاز بكتريا *P.aeruginosa* بالقابلية على البقاء حية في ظروف بيئية مختلفة فضلاً عن مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية مما يتيح لها المجال للاستيطان والتكاثر داخل النسيج المتضرر بكفاءة وهذا بدروه يقود الى حالات الانتنان الجهازي (Systemic sepsis) مؤدية الى حالات الوفيات (Hashimoto *et al* . , 2009) . إن بكتريا *P.aeruginosa* هي مسبب مهم لتجرثم الدم (Bacteremia) الناتج عن خمج الحروق إذ انها الأكثر شيوعاً (Japoni *et al* ., 2009; Hashimoto *et al* ., 2009 ; Schaechter *et al* ., 1999).

كما تعد بكتريا *P.aeruginosa* مسبب مهم لخمج الجروح وجروح ما بعد العمليات الجراحية (Post-operative wound infections) , (Mousa ,1997) حيث وجد Masaadehعام (2009) أن حوالي 27.8% من حالات خمج الجروح مابعد العملية تسببها بكتريا *P.aeruginosa* تليه *Escherichia.coli* بنسبة 15.6% ، *Staphylococcus aureus* بنسبة14.7% ، *Acinctobacter calcoaceticus* بنسبة 13.0 % ، *Kclebsilla sp* بنسبة12.1% ، *Proteus sp* بنسبة 6.0%، *Citrobacter fruendii* بنسبة 3.4%، *Streptococcus pyogenes* بنسبة 2.6% و *Enterococces faecalis* بنسبة 2.61% .

تعد بكتريا *P.aeruginosa* المسبب العام لالتهابات الجلد(Dermatitis) وبصيلات الشعر (Follicutitis) و ينتشرمثل هذا النوع من الإصابات عن طريق المياه من خلال استخدام البرك (Pools) والحمامات المعدنية (Spa) (Corazza *et al* ., 2003)،وعن طريق ملامستها للبشرة يصبح بإمكانها الدخول الى بصيلات الشعر وبهذا ستبدأ بالتكاثر وإنتاج

السموم والتي تعتبر مسبباً للالتهابات ، وأن الاربية (Groin) والإبط (Armpits) و مناطق الجسم المغطاة بزي السباحة هي أغلب المناطق عرضة للإصابة بتلك الالتهابات الجلدية والتهابات بصيلات الشعر،حيث سجلت حالات تفشي الإصابة عن طريق المياه في الفترة ما بين (1995-1996) من قبل المركز الأمريكي للسيطرة على الأمراض(U.S centers for Disease control & Prevention) ، وإن حوالي 25% من تلك الحالات كانت التهابات جلدية متمثلة بالحكة والتقرحات الجلدية ،أغلبها كان سببه بكتريا *P.aeruginosa* فضلاً عن كون تلك الحالات ناتجة عن السباحة في الحمامات المعدنية (Anon, 2000) .

إن بكتريا *P.aeruginosa* مسبباً شائعاً للاخماج التنفسية الحادة (Acute respiratory infections) في كل من المرضى الذين يستخدمون البخاخات (Ventilated patient) و المرضى من ضعيفي المناعة (Immunocompromised patients) وذوي الأخماج التنفسية المزمنة والتليف الكيسي ( Cystic fibrosis) (Kipnis *et al* . , 2006) ، كذلك تسبب أيضاً توسع القصبات (Bronchiectasis) .(Yoon ,2010) ،حيث وجد أن الإصابة بهذا الممرض تحدث في أكثر من 80% من مرضى التليف الكيسي والتي تؤدي الى فقدان الرئة لوظائفها والموت المبكر ( Nazik *et al* ., 2007).

وتمتاز بكتريا *P.aeruginosa* بأنها المسبب الأكثر تكراراً وخطورة لذات الرئة المكتسبة من المستشفى (Hospital acquired Pneumonia) بنسبة تتراوح بين (15-20)% (Hauser *et al* ., 2002) أو تعرف أيضاً بـ (Community acquired Pneumonia) (Vives-Flórez *et al* ., 2006) ، ويعد هذا المرض واحداً من الامراض البكترية المرتبطة بحالات الوفاة ، و احبطت محاولات العلاج لهذا المرض لقابلية البكتريا المسببة في مقاومة العديد من العلاجات (Hauser *et al* ., 2002) فضلاً عن شدة الإصابة ومعدلاتها العالية (Kipnis *et al* ., 2006)، وربما يعود السبب الى إن استخدام المضادات الحيوية يغير في النبيت البكتيري الطبيعي ( Bacterial normal floar ) المتواجد في السبيل التنفسي العلوي (Upper Respiratory tract) و بهذا

يستطيع الممرض الـذي اكتسبـه المريض من المستشفى ان يحدث مرض ذات الرئة تدريجياً (Hauser *et al*. ,2002).

تعد البكتريا *P.aeruginosa* المسبب الأكـثر شيوعـاً لخمـج السبيل البولـي (Urinary tract infections) لـلانسان طيلة فترة حياته ، وكـذلك تسـبب خمـج السبيل البولـي المكتسب مـن الـمستشفـى (Hospital acquird urinary tract infections) و قـد ينتـج الأخـير مـن جـراء العمـليات الجـراحيـة والقسـطـرة طـويلـة الأمـد (Long term indwelling catherterization surgery) (Mittal *et al* ., 2009 ; Mittal *et al* ., 2008) ، حيث وجـد أن *P. aeruginosa*يكـون ما يـقارب 11% مـن أخمـاج السبيـل البولـي فـي المستشفيـات (Nosocomial Urinary Tract Infections) Sharma *et al.,*2004) ، كـما وجـد أن اخـماج السبيل البولـي تكون شـائـعة عند النساء منه في الرجـال بمعـدل أعمـار تتراوح بين (20-40) سنـة بنسبة (20-30) %، أما عند النساء الأكبر عمراً 50 عاماً وأكبر فتتراوح نسبـة الإصـابة بين (4-43) % ، (Mittal *et al* ., 2009) و أن هـذا النـوع مـن الإصـابة يـحـدث خـصـوصاً عنـد الـحمـل وأثنـاء الـولادة (Obiogbolu *et al.,* 2009) .

تتـسبب بكـتريـا *P.aeruginosa* بإلتهـاب الأذن الـوسطـى (Otitis media) وإلتهـاب الأذن الـخـارجـيـة (Otitis externa) ، (Mansoor *et al*., 2009 ; Hadi *et al*., 2007 ; Anon ,2000) ، كمـا وجـد (Grandis *et al* ., 2004) أن *P.aeruginosa* الـمـعزولـة مـن إصـابات الأذن تشكـل 90 % ، فـي حين وجـد (Rosenfeld *et al* ., 2006) أن نسبة عزل جرثومة *P.aeruginosa* تتراوح بين (20-60) % تليها *Staphyloccocus aureus* بنسبة (10-70) %،أما غيرها من الأحيـاء المجهـرية السـالبة لملون غرام فتكون بنسبة لا تتجاوز(2-3)% .

فيما يخص الجهاز العصبي المركزي تعد بكتريا *P.aeruginosa* مسبباً نادراً لما يعرف (Nosocomial *Pseudomonas* meningites) والذي يحـدث بعد أجـراء العمليات الجراحية العصبية (Neurosurgical procedures) إذ تـؤدي الى أمراضية شديدة وحـالات وفـاة (Huang *et al* ., 2007) ، إذ سجلت 121 حـالة (Post surgical

meninngites) لدراسة اجريت من قبل Juhi *et al* ., (2009) في مستشفى (GB Pant) في نيودلهي ، و وجد ان 9.9% اي ما يقارب 10% من الحالات ناتجة عن (Nosocomial *Pseudomonas* meningitis) .

تسبب بكتريا *P.aeruginosa* ما يعرف بإلتهاب القرنية (Keratitis) والذي يحدث بشكل خاص نتيجة ارتداء العدسات اللاصقة بصورة مفرطة ، وليس بالضرورة أن تحدث نتيجة إصابة مباشرة ( Panjwani *et al* ., 1996) .

كذلك تسبب الإسهال المرتبط باستخدام المضادات الحيوية (Antibiotic associated diarrhea) أو يسمى (Nosocomial diarrhea) إلا أنها لا تعد مسبباً عاماً لهكذا نوع من الإسهال مقارنة بالنوع *Clostridium difficile* و الذي يعد الأكثر تكراراً ، فضلاً عن الأنواع *Clostridium perfringens* و *Staphylococcus aureus* و *Salmonella* sp (Kim *et al.*,2001) .

## 6-2 عوامل الضراوة Virulence factors

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة والتي تمكنها من الاستيطان في جسم المضيف مسببة الحالة المرضية و المقاومة للوسائل الدفاعية الخلوية ومن أهم هذه العوامل :-

### 1-6-2 الشعيرات Pili

وهي تراكيب خيطية منتشرة على سطح الخلية البكتيريةحيث تمكن الخلية من الالتصاق و الاستيطان على سطح الأنسجة الطلائية للضيف (Brooks *et al.,* 1998 ; Koneman *et al.,* 1997) ، والتي تعد الخطوة الأولى في أمراضية *P.aeruginosa* ، تكون هذه الشعيرات بوليمر متجانس البناء (Homopolemer) من بروتين البلين (Pilin protein) مكونا تركيباً حلزونياً

لتكون أنبوباً مجوفاً وان النهاية الكاربوكسلية للبلين تحتوي على حقل ارتباط *P.aeruginosa*مع الخلايا الطلائية للمضيف (Campbell *et al*., 1997) .

## 2-6-2 الطبقة اللزجة The slime layer

تتكون من مادة كيميائية ذات طبيعة لزجة تتكون من (Glycoprotein) تحيط بالخلية البكتيرية حيث تعطي المظهر المخاطي اللزج لسطح المستعمرة فضلاً عن كونها مسؤولة عن المقاومة للمضاد الحيوي (Dimtracopoulos and Bartell ,1980) .

## 2-6-3 الألجينيت Alginate

وهي عبارة عن عديد سكريد مخاطي (Mucoid lipopolysaccharide) يكون طبقة المحفظة الخارجية ويعد من المكونات التي تفرزها السلالات المخاطية لهذه البكتريا في حالات الإصابة الرئوية وخاصة التليف الكيسي (Cystic fibrosis) ، حيث يعمل على إفرازات (Exopolysaccharide) لتكوين غشاء حيوي(Biofilm) و الذي بدوره يساعد الخلية البكتيرية على الالتصاق بسطح الخلايا الطلائية ، والذي يعمل كحاجز يوفر الحماية في مقاومة المضادات الحيوية ( Cotton , 2009 ; Forbes , 1998 ; Singleton , 1997 ) ، كما يلعب دوراً هاماً في حماية الخلية من الحرارة والجفاف ومقاومتها لعملية البلعمة (Todar , 2004).

## 2-6-4 الأنزيمات Enzymes

### 2-6-4-1 الأنزيمات الحالة للدهون Lipases

لبكتريا*P.aeruginosa* القدرة على إنتاج ثلاثة أنواع من الأنزيمات الحالة للدهون (Lipolytic enzymes) هي Esterase، Lipases و Phospholipase C . و هذا النوع من الأنزيمات يساعد الخلية البكترية على غزو الانسجة حيث يعمل على فصل الطبقة الشحمية بين الأدمة وتحت الأدمة ، وذلك من خلال إنتاج البكتريا

لإنـزيم Lipase و الـــذي يســـــاعدهـــا علـــى اخـــتراق الأنسجـــــة الـــدهنيـــة (Wilhelm *et al*.,1999 Todar , 2004;;Brooks *et al*.,1998) .

## 2-4-6-2 أنزيم إيلاستيز Elastase enzyme

جـــرت تنقيـة هذا الأنزيم لأول مرة عـــام 1964 من راشح مزرعة *P.aeruginosa*مـن قـبل Morihara ، ويمـتاز هـذا الأنزيم بـكونـه ثـابت حراريـاً (Heat stable) Tanaka *et al*.,1991)) ، حيث يعمل أنزيم (Elastase) على تحليل بروتين الكـولاجين (Collagen) وبـروتينات المضيف الأخـرى ( ., *et al* Japoni) 2009 ، فضلاً عن تحليل بروتين (Elastin) (المكون الرئيس لأنسجة الرئة والذي يكون مسؤولا عن تقلـص و انبساط الـــرئـة كـــذلك هـــو مكون مهم للأوعيـــة الـــدمـوية التي تعـــتمد مـــرونتها عليه) .(Galloway ,1991) .

## 2-4-6-3 أنزيم البروتيز Protease enzyme

يعمل هذا الأنزيم على تحطيم الانسجة وذلك بتحطيم المواد البروتينية فيها وفصل الالتحام الوثيق (Tight junction) للخلايا الطلائية ، فضلا عن كونه يحلل الأضداد جـاعـلاً إياها غير فعـالة وظيفيـاً (Blocking antibodies) (Wilson and Dowling , 1998) حيث يـعمـل علـــى فصل الـــروابط الببتيديـــة (Peptide bond) فـــي البـروتينـــات .(Liao and McCallu ,1998).

## 2-4-6-4 أنزيم الليسثينيز Lecithinase enzyme

يعمل على تحطيم الليسثين (Lecithine) وهو أحـــد مكـــونات الغـــشاء الخـــلـوي (Cell membrane) لكائنات حقيقية النـــواة ممـــا يساعد الخلايا البكتيرية علـى الانتشار . (Wilson and Dowling , 1998; Koneman *et al*., 1997)

## 2-4-6-5 أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosephatase

يعمـل هذا الأنزبم على تحليل (Phosphate ester)، وتزداد فعالية هذا الأنزيم في محيط قاعدي ولهذا السبب سمي بأنزيم الفوسفاتيز القاعدي وهو مقاوم للحرارة (Heat stable) في حين يحطم بعضها الأخر بدرجة حرارة 70 °م ولمدة 20 دقيقة . هذه الصفة تساعد في

تمييز بعض أنواع الجنس *Pseudomonas* ، إذ تكـــون صفـــة المقاومة للحرارة موجـــودة فـــي *P.aeruginosa* ، *P.pseudemollei* و*P.borcopolis* فقط أما بقية أنـــواع *Pseudomonas* فيكون الأنزيم فيها متغيراً حرارياً (Heat labile)(Macfaddin,1981).

## 6-4-6-2 الأنزيم الحال للحامض النووي المنقوص الأوكسجين Deoxyribo Nuclease(DNas)

إن لزوجة قشع مرضى التليف الكيسي (Cystic fibrosis) هي نتيجة لتراكـم DNA الخلية العدلة (Neutophils) والتي تزداد أعدادها نتيجة ميكانكية الدفـاع الالتهابيـــة و التـي تؤدي الـى الالتهاب المزمـن ، حيث يعمل أنزيم (DNase) المفـــرز من قبل *P.aeruginosa* على تحليـل DNA لخلايا المضيف و بالتالي خفض لزوجـة الإفرازات (Exudate) ممـا يـوفـر حرية حركة أكـثر للكائن الممرض (Prescott *et al*., 1993) .

## 7-4-6-2 أنزيم Gelatinase

هو من الأنزيمات الحالة للبروتينات ،حيث يعمل على تحليل الجلاتين الى أحماض أمينية تستخدم كمغذيات من قبل البكتريا وأحيانـــاً تكون له عـــلاقة مـــع قـــدرة البكتريا علـــى تحليل الكـــولاجين (Collagen) والانتشـــار فـــي جســـم المـضيف (Harley and Prescott , 1996 ; Macfaddin ,1981) .

## 8-4-6-2 الأنزيم الحال للـليفين Fibrinolysin

هذا الأنزيم يحلل الليفين (Fibrin) ولهذا يذيب الخثرة المتكونة بواسطة الجسم لعزل الأصابة ،مما يتيح الفرصة للكائن المجهري بالانتشار (Tortora *et al.*,1998).

## 5-6-2 السموم Toxins

تنتج بكتريا *P.aeruginosa* نوعين من السموم :-

### 1-5-6-2السموم الخارجية Exotoxins

**أ- السموم القاتلة لخلايا الدم البيض Leucocidin or Cytotoxin**

عبارة عن بروتينات ذائبة تنتج من قبل بعض سلالات *P.aeruginosa* متغيرةً حرارياً ،يشارك في عملية الغزو(Invasion) ، أطلق عليه Leucocidin لقابليته على تحليل خلايا الدم البيض (Leucoytes) فضلاً عن تحطيم الخلايا اللمفاوية (Lymphocytes) ( Baltch *et al*., 1996 ) .

**ب- السم الخارجي Exotoxin S**

يعمل هذا السم على تحطيم الأنسجة ويساعد على انتشار الإصابة،ويسبب تغيرات في وظيفة الخلية كتثبيط بناء DNA من ثم التسمم الخلوي و يساعد على الالتصاق في الخلايا الظهارية للمضيف (Fleiszing *et al*., 1997).

**جـ - السم الخارجي Exotoxin A**

عبارة عن عديد البتيد (Polypeptide)، يعمل على قتل الخلية بعد دخوله سايتوبلازمها ويثبط عملية تخليق البروتين فهو بذلك له فعل السم الخلوي (Cyotoxic)أن هذا السم يعد عامل ضراوة مهم في إصابات عدة ، منها الانتنان الدموي (Septicemia) ، اخماج القرنية (Corneal infections)،أخماج الرئة (Lung infections)وكذلك خمج السبيل البولي(Urinary Tract Infection).(Sharma *et al*., 2004;Moore,1997).

**د . السموم الحالة للدم Haemolysins toxins**

تعمل هذه السموم على تحليل كريات الدم الحمراء (Erythroytes) مسببةً فقر الدم (Anemia) ويجعل بذلك الحديد متوفراً للنمو البكتيري . (Prescott *et al*., 1993).

**هـ . السم المعوي Enterotoxin**

هو بروتين متغير حرارياً(Heat labile) يتكون من تحت وحدتين (2 Subunits) هما:

1. تحت وحدة B (B – subunit) : وظيفتها الارتباط مع المستقبلات الموجودة على غلاف الخلية المعوية (Ganglioside) .

2. تحت وحدة A (A – subunit) : مسؤولة عن الفعالية الأنزيمية السمية بعد دخول السم الى الخلية . يعمل هذا النوع من السموم على القناة المعوية مثل خلايا اللفائفي و الأعور والقولون مما يؤدي الى فقدان السوائل الى تجويف الأمعاء مسبباً الإسهال (Diarrhaea). (Levinson and Jawetz , 2000 ) .

## 2-5-6-2 السم الداخليEndotoxin أو

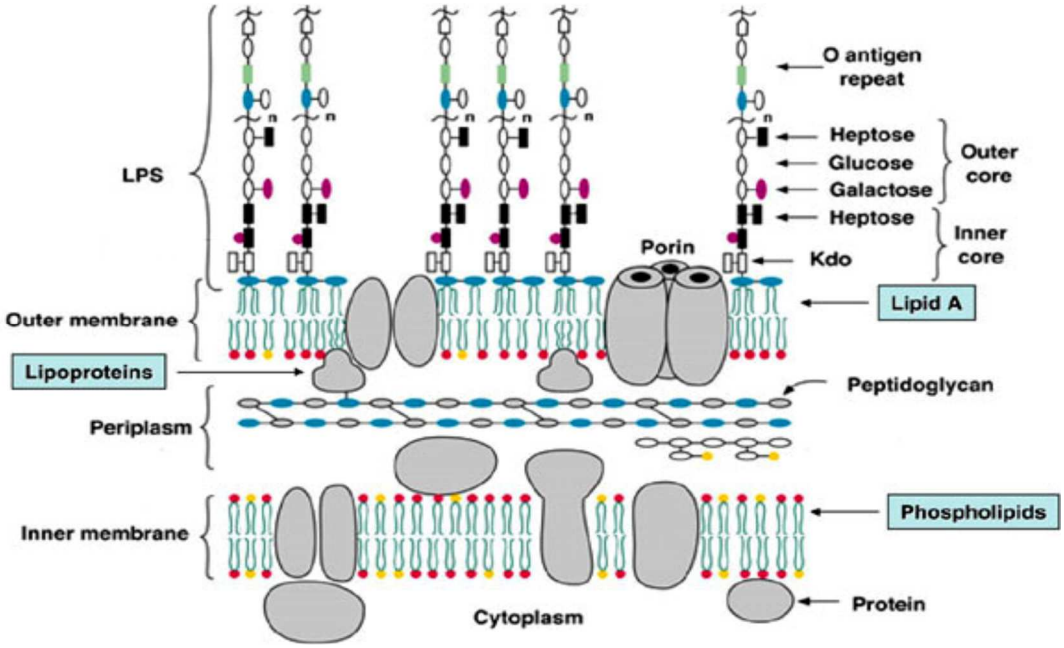
## عديد السكريد الشحمي ( LPS ) Lipopolysaccharide

إن عديد السكريد الشحمي هو من المكونات المميزة والأساسية لجدران الخلايا البكترية السالبة لملون غرام (Ciornei *et al* ., 2009 ;Soares *et al* ., 2008) إذ يشكل حوالي 50% منها (Abraham *et al* .,2008) ، في أواخر القرن التاسع عشر تم وضع اصطلاح السموم الداخلية (Endotoxin) لأول مرة من قبل Richard Pfeiffer حيث أوضح أن بكتريا *Vibrio cholera* تحتوي على سموم ذات صلة وثيقة بالخلية وعلى الأغلب تعد جزءاً داخلياً من جسم الخلية البكتيرية (Rietschel. and Westphal , 1999) ، معتمداً في ذلك على أساس أن الكوليرا المقتولة بالحرارة (Heat killed cholera bacteria) تكون سامة بذاتها وليس بكونها مفرزة للسموم خارج الخلية الحية (Wang and Quinn , 2010) . جرى إستخلاص السموم الداخلية لأول مرة كمستخلص خام عام 1932 من قبل Boivin & Mesrobeanu باستخدام (Trichloroaceticaid TCA) تبعتها محاولات بأستخدام المذيبات العضوية والماء ، ووجدوا جميعهم بأن هذه السموم الداخلية مكونة من دهون (Lipid) وعديد السكريد (Polysaccharide) مع قليل جداً من البروتين إن وجد (Rietschel and Westphal , 1999).

بعد ذلك قام كل من Westphal & Luderitz عام 1952 باستخلاص السموم الداخلية (Endotoxin) بطريقة الفينول الساخن و تنقيتها (Hot phenol-water extraction) ، حيث تمكنا من الحصول على سموم داخلية ذات نقاوه عالية من أنواع مختلفة من البكتريا السالبة لملون غرام ،

حيث كانا أول من أستخدم مصطلح عديد السكريد الشحمي (LPS) (Lipepoplysaccharide) لوصف السموم الداخلية (Endotoxins) (Rietschel *et al*., 1992 ;Westphal and Jann ,1965).

يوجد عديد السكريد الشحمي بصورة خاصة في الصفيحة الخارجية للغشاء الخارجي (Outer membrane) لجدران الخلايا البكتيرية مكوناً ما يقارب 50% منه، ( Abraham *et al*.,2008 ) .الشكل (2-1).




**الشكل (2–1) : مكونات غشاء البكتريا السالبة لملون غرام .(Rietschel *et al*., 1992)**

Kdo : 2 – Keto – 2- deoxyoctonate

LPS :Lipopolysaccharide

وبحكم موقع عديد السكريد الشحمي من الغشاء الخارجي لجدران الخلية البكترية فهو يتوسط عملية التداخل بين الخلية البكتيرية ومحيطها الخارجي حيث يشكل نقطة التواصل الأولى بين البكتريا و محيطها ( Abraham *et al*.,2008 ;Lau *et al*., 2009) ، و يلعب دوراً حاسماً في نفاذية الغشاء الخارجي (Kucˇerka *et al*., 2008; Abraham *et al*., 2007)، وبذلك يعمل على حماية الخلية البكتيرية من الجزيئات المؤذية المختلفة والسامة، كالمضادات الحياتية مثل البنسلين

(Penicillin) والأنـــزيمـات الهـــاضمة مثـل الـلايسوزايـم (Lysozyme) ، المنظفـات ( Detergent) ، المعـادن الثقـيلـــة (Heavy metals) ، أملاح الصفـراء ( Bile salts) وبعض الصبغات (Dyes) (Schneck *et al* ., Kucˇerka *et al* ., 2008 ; 2009 ، من جهة أخـرى فأنه يسمح بدخول الجزيئات المحبـــة للمـــاء ذات الأوزان الجـــزيئية الواطئة ، إن لـهذا الســـم القـابـلية علـــى تنشـيط المـــسار البـــديل المتمـــم( Alternative pathway of complement) والارتبـاط بالمستقبـلات الموجودة في الخلايا البلعمية الكبيرة (Macrophage) و الخلايا الوحـيدة (Monocyte) محـرراً عـامل النـخر الورمي الفا(Tumor necrosis factor–$\alpha$) والأنترليوكينـات(IL-1, IL-6, IL-8) والتي يـؤدي الى حدوث الصدمة السميـة Septic (shock)، ولهذا فأن عـديد السكريد الشحمي يعد عامل ضراوة مهم فضلاً عن كونه يساعد الخلية البكتيرية على الالتصاق والاستيطان داخل الأنسجة ( Schneck *et al*.,2009 ; Abraham *et al* 2008 ;Todar,2002).

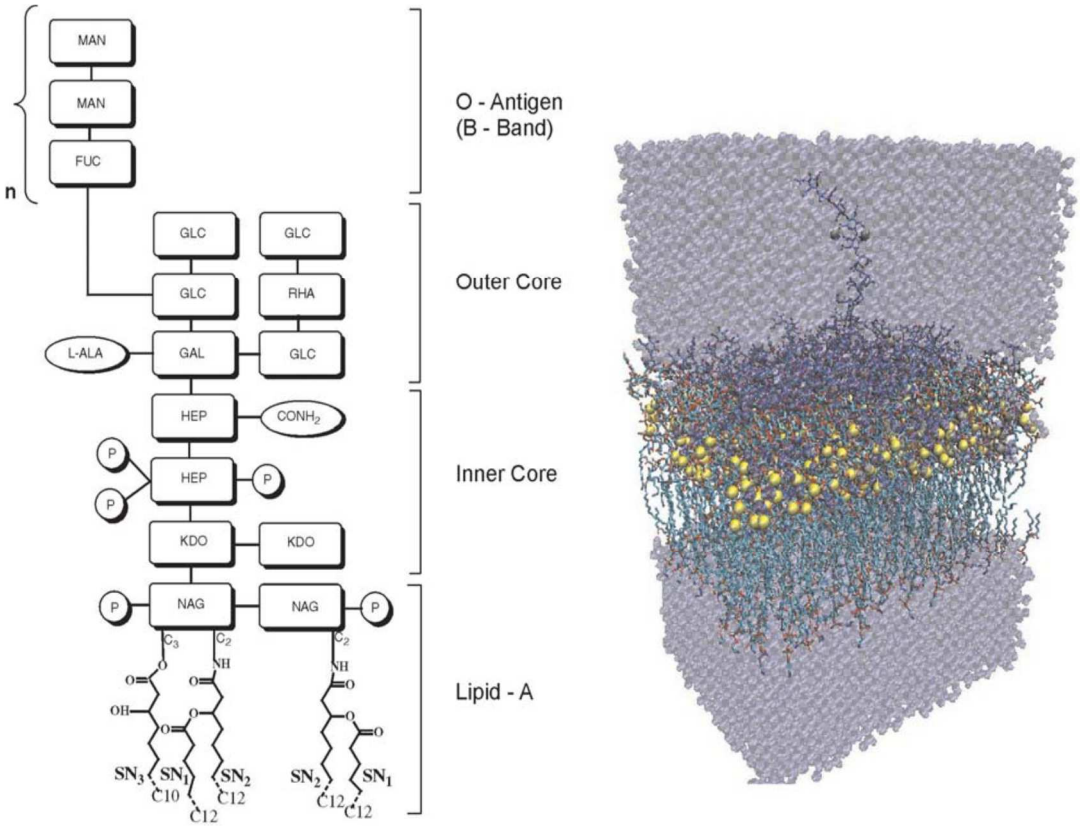
إن عديد السكريدالشحمي يكون ثابتاً عند تعرضه للحرارة العالية ( Heat stable) وهذه الصفة تميزه عن غـالبية السموم الخارجية، وأن تعرضه للغليان لمـدة نصف ساعة لا يؤثر في فعاليته ، غير أنه غير ثابت تجاه المواد المؤكسدة القوية (Powerful oxidizing agent) مثل (Superoxide، Hypochlorite وPeroxide) (Todar , 2002) .

يعـــد عـــديد السكـــريد الشحمـــي جـــزيئة كـــبيرة (Macromolecule) (Abraham *et al* .,2008 ; Abraham *et al* .,2007) ، ذات وزن جـــــزيئـــي يقـــارب (10- 1000) كيلـودالتـون (Todar , 2002).

تتكون جزيئة عديد السكريدالشحمي من ثلاث مناطق هي :

1. الدهن A (Lipid A)
2. منطقة اللب (Core oligosaccharide)
3. السلسلـــة الجـــانبيـة (O-side chain) وتعـــرف ايضـــاً بالمستضـــد O – (O- Antigen) أو المـــستـــضـــد الـــجـــســـمي (Somatic antigen)

، (Kucˇerka *et al*., 2008 ; Abraham *et al*.,2008 ;Abraham *et al*., 2007)
الشكل (2-2) .




**الشكل ( 2-2 ) عديد السكريد الشحمي LPS للبكتريا السالبة لملون غرام (Soares *et al*., 2008)**

يعـد Westphal and Luderitz أول من وضـع مصطـلـح الـدهن A (Lipid A) ، وهو ذلك الجزء السام الذي تعزى اليه سمية عديد السكريد الشحمي (LPS) ، والذي يكون عباره عن مركب دهني كارهاً للماء (Hydrophobic) ويمثل الدهن A الجزء المنغـرس فـي الغشاء الخـارجي ، ويتكون من جـزيئتين من كـلوكوز أمين مفسفرة (Phosphorylated glucosamine) مرتبطتين بواسطة الرابطة السكرية(6-1) وترتبط بجزيئة السكر الثنائي حوالـي (6-4) مـن الأحـماض الشحمـية بالـرابطة (N-acetyl) فـي حـين تـرتبط بـعـديـد السكـريد بالـرابـط (Ketosidic bond) و تـرتبط جـزيئة السكر أيضاً بمجموعتـي فـوسفات فـي المـوقع 1 و 4 ، تستبـدل مجموعـة الـفـوسفـات فـي بعـض الأحيـان بمجاميـع قطبيـة مثـل (4-amino-4 -deoxy-L-arabinose Ara4N) أو الإيثانـول أميـن (Ethanolamine)

Kucˇerka *et al* ., ; Rietschel and Westphal,1999; Sato *et al* .,1994) . ( Abraham *et al* .,2008 ;2008

تعد منطقة الدهن A (Lipid A) من أكثر مناطق عديد السكريد الشحمي محافظة من حيث المكونات والتركيب إذ وجد بأن هذه المنطقة في البكتريا السالبة لملون غرام وبصورة خاصة العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) تكون متشابهة كميائياً (Todar , 2002 ; Lawson *et al* ., 2002) .

إن منطقة الدهن A (Lipid A) هي المكون الفعال بايولوجياً ،حيث أن تحفيز استجابة الجهاز المناعي تعتمد على شدة الإصابة والتركيب الخاص لمنطقة الدهن A ( Lipid A) (Wang and Quinn , 2010 ) . غير أن شدة الأمراضية والضراوة لا تعتمد على هذه المنطقة فقط بل ايضاً بأرتباطها بالسلسلة الجانبية – O .( العزاوي , 2001).

ترتبط منطقة الدهن A بمنطقة اللب (Core region) أو (Core oligosaccharide) المكونة من (8-12) وحدة من السكريات الأحادية (Monosaccharide) (Kucˇerka *et al,* 2008) و يتكون اللب من منطقتين الأولى تعرف بمنطقة اللب الداخلي (Inner core oligosaccharide) و التي تتكون من جزيئتين من 2-Keto-3- deoxyoctonic (KDO) ، وجزيئتين من الـ Heptose الحاملة لمجاميع مفسفرة (Phosphoryl groups)، وترتبط هذه المنطقة بمنطقة الدهن A بروابط كلايكوسيدية (Todar ,2002) ، أما المنطقة الثانية فهي منطقة اللب الخارجي (Outer core oligosaccharide) ذات تنوع بالتركيب الكيميائي لها وتحتوي على سكريات خماسية وسداسية مثل الكلوكوز و الكالكتوز (N-acetyl glucosamine) (Wang and Quinn, ; Lau , 2009 ; Abraham *et al* ,2007; Bode *et al*.,1998 2010)

أما السلسلة الجانبية (O-side chain) وتعرف أيضاً بالمستضد O– (O- Antigen) أو المستضد النوعي O- (O-specific amtigen) أو المستضد الجسمي (Somatic antigen) ، تكون هذه المنطقة مع منطقة اللب (Core region) منطقة محبة للماء (Hydrophilic)، تتكون هذه المنطقة من وحدات متكررة من السكريات الأحادية (Monosaccharide) ما بين 5-8 وحدات مكونة السلسلة الجانبية، أذ يمكن أن يصل طول السلسلة الى 40 وحدة فرعية متكررة، او قد تحتوي منطقة المستضد O- على

اكثر من 60 وحدة كما في بكتريا *Salmonella enterica* و 164 وحدة كما في بكتريا *E.coil*. أن هذه المنطقة ممكن أن تكون (Heteropolymer)أو(Homopolymer) ذات وحدات يكون الارتباط فيما بينها خطي (Linear) أو فرعي (Branched) Todar ,2002 ; Knirel *et al*., 2002 ; Rietschel and Westphal , 1999 ) . (Wang and Quinn , 2010 ;

شخص نوعان من السلسلة الجانبية -O (O-side chain) لبكتريا *P.aeruginosa* تعرف بالحزمة – A و الحزمة – B عديدة السكريد (A-band &B-band Polysaccharide) تكون الحزمة-A (A-band) الأقصر و هي متجانسة (Homopolymer) مكونة من وحدات متكررة من سكر الرامينوز (D-rhamnos (D-Rha)) لذا تعرف بـ (Common polysaccharide antigen) ، تكون هذه المنطقة ذات تركيب محافظ لأنواع *Pseudomnoas species*، أما الحزمة -B (B-band ) فتكون الأطول وهي غير متجانسة (Heteropolymer) أذ تتكون من وحدات سكر ثلاثية الى خماسية (Tri-pentapolysaccharide subunits) والتي تتنوع ضمن 20 نوع مصلي (20 serotypes) من *P.aeruginosa* والتي تكون بصورة بوليمر خطي (linear polymer). ( Abraham *et al*.,2007 ; Kučerka *et al*., 2008 ;Soares *et al*., 2008 ; Lau , 2009) .

هناك اختلاف كبير في حجم جزيئات عديد السكريد الشحمي ، نتيجة للاختلافات الحاصلة في السلسلة الجانبية (O-side chain) اذ أن السلسلة الجانبية لبكتريا *P.aeruginosa* والتي يعبرعنها بالناعمة (Smooth) مكونة من 50 وحدة مكررة ، في حين تكون جزيئة عديد السكريد الشحمي والتي يعبر عنها بالخشنة (Rough) لعدم احتوائها على السلسلة الجانبية (O-side chain) أو (Semirough) وتحتوي على سلسلة جانبية ذات وحدة واحدة في الحزمة- B مرتبطة بمنطقة اللب (One chain repeat unit of B-band polysaccharide)،حتى الان وجد أكثر من 80% من عديد السكريد الشحمي المنتج من بكتريا *P.aeruginosa* يفتقد للسلسلة الجانبية (O -side chain) والذي يعرف بالخشنة (Rough) أما الناعمة (Smooth)

والحاوية على سلسلة جانبية تشكل من 8-9 % من وحدات عديد السكريد الشحمي (Kucˇerka *et al*., 2008 ; Soares *et al*., 2008).

إن هذا التنوع الكيميائي في السلسة الجانبية له الدور الأكبر تجاه الفعاليات المرتبطة لسطح الخلية مثل التداخلات مع المعادن ، كذلك الالتصاق والاستيطان والقابلية على إحداث الخمج وكذلك تكون ما يعرف بـ Biofilm ومنع عملية البلعمة بواسطة خلايا الدم البيض . ( Kucˇerka *et al*., 2008 ; Michel *et al*., 2000 ) .

## 2-3-5-6-2 استخلاص عديد السكريد الشحمي من الخلايا البكتيرية

أمكن استخلاص عديد السكريد الشحمي من البكتريا السالبة لملون غرام بطرق عدة منها الاستخلاص بحامض الخليك ثلاثي الكلور (Trichloroacetic acid) وكذلك بالبيوتانول المائي (Aqueous butanol) وترايتون ($Triton/Mg^{+2}$) والإيثر المائي (Aqueous ether) بدرجة حرارة بين (6-12) °م وأيضاً الأستخلاص بالماء الساخن بدرجه 180°م،وكذلك باستخدام الفينول المائي (Aqueous phenol) ، حيث تعد طريقة الاستخلاص بالفينول الساخن من أكثر الطرق أستعمالاً لأمكانية أستخدامها لمدى واسع من الخلايا البكتيرية ، وأن المعاملة المسبقة للخلايا البكتيرية بأنزيم اللايسوزايم (Lysozyme) بوجود (Ethylene diamine tetraacetic acid) (EDTA) تعد الطريقة الأكثر فعالية لتحضير واستخلاص عديد السكريد الشحمي ، وهناك طرق استخلاص أخرى مثل طريقة استخدام الكلوروفورم (Chloroform) ، و طريقة بيتروليوم- إثير( Petroleum –ether) وطريقة الميثانول (Methanol) . (Perdomo and Montero , 2006; Johonson and perry , 1976)

## 3-3-5-6-2 التأثيرات المرضية والمناعية لعديد السكريد الشحمي

### Pathological and immunological effects of LPS

يعد عديد السكريد الشحمي (LPS) المكون الأساس للغشاء الخارجي (Outer membrane) لجدار الخلية البكتيرية و يلعب دوراً هاماً في الأمراضية ، والأخماج الناتجة عن الخلية البكترية ، ومحفزاً أساسياً لاستجابة المضيف للخلايا البكترية السالبة لملون غرام (Abraham *et al*.,2008) .

إن الخلايا النخاعية (Myeloid cells) تستخدم بروتينات مهمة وأساسية عند الأستجابة الخلوية (Cellular response) لعديد السكريد الشحمي، ومن هذه البروتينات هي LPS-binding protein (LBP)، CD14 ، Toll-like receptor (TLR4 ) و Myloid differentiation- 2- protein (MD2) .( Węglarz *et al* .,2008;Garcia-Verdugo *et al* ., 2005)

أن أول ارتباط لعديد السكريد الشحمي يكون مع بروتين LBP الموجود في المصل مكوناً معقد (LPS-LBP complex) ( Kim *et al* ., 2007 ; Cohen , 2002 ) ، وأن هذا البروتين يكون ذا وزن جزيئي 60 كيلو دالتون وينتج بكميات عالية في الكبد و بصورة أساسية من قبل الخلايا الكبدية (Hepatocytes) وبكميات أقل من قبل الخلايا الطلائية الحوصلية (Alveolar epithelial type ll cells) ( Dentener *et al* ., 2000 ; (Yuan *et al* ., 2006b ; Garcia – Verdugo *et al* ., 2005 . ينشط بروتين (LBP) عملية انتقال LPS الى موقع الارتباط مع CD14 ( Sladek and Rysanek ,2008 ) ، و يوجد بروتين LBP بتراكيز واطئة في المصل ، تزداد تراكيزه في طور الاستجابة الحاد (Acute phase response) فمثلاً في الإنسان يوجد LBP ما بين (2-20) مايكروغرام / مليلتر وهذا المستوى يرتفع الى (10-200) مايكروغرام / مليلتر خلال طور الاستجابة الحاد والناتج عن حدوث الألتهابات (Inflammation)(Fenton and Golenbock,1998)،أما بروتينCD14 فهو ذو الوزن الجزيئي55 كيلو دالتون يرتبط به معقد (LPS - LBP complex) Garcia-Verdugo *et al* .,2005) ( Sladek and Rysanek , 2008 ;). أن بروتين CD14 يكون بشكلين الأول CD14 المرتبط بالغشاء (mCD14) (Membrane bound) المرتبط على سطوح الخلايا النخاعية (Myeloid cells) وخلايا وحيدة النواة (Garcia-Verdugo *et al* ., 2005) (Monocytes) ، وخلايا البلاعم الكبيرة (Macrophages) متضمنة خلايا (Kupffer cells) ، خلايا الدم البيض (Neutrophils) أو خلايا مشكلة النواة (Polymorphonuclear leukocytes)(PMN) . أما الأخر والذي يكون بشكل ذائب (Soluble CD14) (sCD14) في المصل ، يعمل على تحفيز الخلايا الشجرية (Dendritic cells) ، الخلايا الليفية (Fibroblast) ، الخلايا الطلائية

(Epithelial cells) ،الخلايا العضلية الملساء (Smooth muscles) للاستجابة لعديد السكريد الشحمي و بالتالي يعمل على ربط معقد LPS-LBP complex مع الـ CD14 و بالتالي يتكون معقد LPS-LBP-CD14 complex الذي يعمل على حمل LPS الى معقد TLR4- MD2 complexالموجود على سطح الخلية ، ( Feng ; Cohen , 2002 ;Kim *et al* .,2007; Sohn *et al*.,2007; Wang *et al* .,2010; *et al* ., 2003 .( Sladek and Rysanek , 2008 ; Månsson *et al*., 2007

فضلاً عن ذلك توجد مستقبلات بروتينية موجودة على سطح الخلايا اللمفاوية التائية والبائية (T and B lymphocytes ) ذات وزن جزيئي 80 كيلو دالتون .( Kirkland *et al* ., 1990 ) ومن البروتينات الأخرى الرابطة لـ LPS هو بروتين زيادة النفاذية القاتل للبكتريا (Bactericidal permability increasing protein) (BPI) ، وهو مماثل لـ LBP السابق الذكر ، غير أنه يختلف عنه بكونه مثبط لعمل LPS و يعادله عند الارتباط على سطوح خلايا البلاعم الكبيرة (Macrophages) و إيقاف تنشيط الخلايا المناعية (Immune cells) .(Wittmann *et al*., 2008)

وجد أن LPS يحث الأخماج في كل من الحيوان والإنسان ، مسبباً تغيرات فسلجية منها الحمى (Fever) ، فقدان الشهية (Anorexia) ، فقدان الوزن ، نوم خفيف (Sleep slow-wave) ، ضعف في النشاط و الحركة (Suppression of locomotor activity) ، انخفاض الرغبة للأكل (Decrease in food motivation) ( Arai *et al* ., 2001 ) ، كذلك يسبب عدد من التأثيرات البايولوجية مثل الصدمة (Shock) ،التخثر داخل الأوعية الدموية (Intravascular coagulation) ، انخفاض في عدد خلايا الدم البيض (Leucopenia) ، انخفاض ضغط الدم (Hypotension) والتي يمكن أن تؤدي الى فشل الأعضاء المتعدد (Multiple organs dysfunction) والموت ، كما أن انتشار التخثر(Coagulation) واحد من أهم خصائص التسمم (Sepsis) و التي يمكن أن تؤدي الى الخثرة المنتشرة داخل

الأوعـــــيـــــــــة (Disseminated intravasoular coagulation) (DIC) . ( Perez-Casanova *et al*., 2010 ; Kim *et al*., 2007 ; Kanga *et al*., 2003)

بعد تحـــلل الخــــلايا البكتيرية يتحرر عـــديــد السكـــريد الشحمــــي الــــى الـــدورة الـــدمويـــة (Circulation) و يتم تميـــزه من قبـــل نظــــام المناعـــة غير المتخصص (Innate immune system) ، و أن LPS يعمل علـــى تحفيز الخلايـا المتجمعة فـــي مناطق الالتهـابات والأنسجة المحطمة ،وتنتج هذه الخلايا الوسائـــط الالتهــــابية بكـــميات كـــــبيرة مثل (Cytokines) كعـامـــل النـخر الـورمي – الفا (Tumore necrosis factor- $a$) ( TNF $a$ ) ، الأنـــترلـــــوكينـــــــات مثــــل (IL-6,IL-1B,IL-8 ) وكذلك (IL-12 , IL-18) ، الـى جانب السايتوكاينات هناك عوامل تنتج أيضاً من قبـــل Macrophage مثـل عـــامــــل تنشيــط الصفــائح الدمـويـــة (platelet activating factor) (PAF) ، بروستاكلاندينات (Prostaglandin) ، ثرومبوكسان (Thromboxane) ، لوكوترينات (Leukotriene) هذه العوامل مسؤولة عن تنشيط البطانة الوعـائيــة (Vascular endothelium) للأوعيــة أو تنظيم النغمة الـوعائية (Vascular tone) ، و المستويـات العـاليـة منها تـؤدي الــــى حـــدوث تحطـــم الأوعيـة (Vascular damage) ، وبصورة عامة أن وجود كميات كبيرة من LPSتــؤدي الى تنشط هذه الوسائـط (Mediators) والـذي ينتج عنه الصدمة السمية (Septic shock) أو تـؤدي الى فشــــل الأعضـــــــــــــاء المتعـــدد والــــذي يـــــــؤدي الــــــى الـوفـــــاة ( Cohen , 2002 ; Quan *et al*., 2001 ; Qureshi *et al.* 2010; Fuentes *et al*.,2008 (Woltmann *et a l*., 1998.كذلك التسبب بالـ (Endotoxemia) والـــذي يكـــــــــون شــــــائــــعـــــــاً فـــي الأشخــــاص ذوي أمــراض الكـــــبــد وخصوصـــــاً أمراض الكـــبد الكحوليـــة (Alcoholic liver disease ) و الفشــــل الكبـــدي ( Liver failure ) . ( Yuan *et al*., 2006b ; Hussein *et al*., 2011) .

## 7-2 النباتات الطبية Medical Plants

النبـــاتات الطبية هي النباتات التي تحوي مـواداً فعـــالة تستخـــدم لأغـــراض عـلاجية أو كـبوادر لتصنيـــع الأدويـــة ،إذ استخـدمت هـذه النبـاتات مـــن قبـل ثقافات مختلفة للأغراض الطـبية . أكثر من 5000 نـوع مـــن النباتات عـرفت باستخدامهـــا الطـبي في إفريقيا ولكن القليل منها تـم دراسته ووصفه . إن المنتـجات الطبيـعية لـلنباتات يمكن أن تعد مصـدراً فعالاً أخـــر لاكتـشاف الفعـالية البايولوجيـة كمضادات للسـرطـــان (Anticancer) و مضادات الأكسدة (Antioxidants). ( Adebayo *et al*., 2010).

إن ما يقارب 80 % من سكان العالم تعتمد بصورة حصرية على النباتات لأغراض الصحة و الشـــفـاء،على الـرغم مـــن الاعتمـاد على العمـــليـات الجـــراحـية وطـــب الأدويـــة (Pharmaceutical) والذي يعد أكثر فـائدة ، ولكن في السنـوات الأخيرة نجد أن كثيراً من الأشخاص يعتمدون في أكمال علاجهم على مواد طبيعية ،حيث نرى تزايد الميول تجاه الأعشـــاب و ذلك نتيجـــــة للقلـــق الناتـــج عن الأضرار الجانبيـــة لـلأدويــــة (Khalil *et al* ., 2007). وأن من أحد أهم هذه النباتات الطبية الشاي الأخضر الذي يعود تأريخه الى أكثر من 4000 سنة ، حيث أكتشف لأول مـرة فـــي الصين بصـــورة عـــرضية عـــام 2737 قبل الميلاد من قبل إمبراطور صيني وخـبير طبـــي يـدعـــى Shen-Nung ، إذ كان عادة ما يقوم بغلي الماء قبل شربه ، وفي أحدى الـمرات وعنـد غليانه للماء تحت شجرة الشاي سقطت بضعـــة أوراق من تلك الشجرة في الماء عرضياً ، وبعد تذوقه لاحظ الطعم القوي والرائحة العطرة ،عندها قام بإضافة الشاي الى قائمة الأعشاب الطبيـة الخاصة به (Axelrod *et al*., ; Brannon , 2008; Sahley and Birkner, 2006 2010 ) .

يمكننا القول أنه مع بدايات القرن الثالث قبل الميلاد بدأ استخدام الشاي الأخضر كشراب طبي ، إذ كـــان يستخــــدم لعـــلاج الاكـــتئاب وآلام الـمـعدة والقـــلق (Anxiety) والصـــداع (Axelrod *et al* ., 2010 ;Lin *et al* ., 2003) ، و أوجـــاع الجسـم (Body aches) و آلام ومـــشاكـــــل الهضـــــم ، كـــــما كـــان يستخـــدم لــــتحسيـن وظـــــائـف الجـسم الـمنـــاعية (Improve immune functions) وإزالــــة السمـوم (Detoxification) والحصول على الطاقة وإدامة الحيـاة (Brannon , 2008 ) . و تعـد الصين أول حضارة لزراعة و إستهلاك الشاي الأخضر على وجه الخصوص و ذلك لأهميته العلاجيـة ، لذا فأن استخدام الشـاي الأخضـر حتى ذلك الحيـن كان مقتصـــراً علـى استخـدامه كـشراب طـبي و علاجي ( Lin *et al*., 2003) ، وحتى أواخـر القرن السادس الهجري

عندما قام أباطرة وكهنة الصين فضلاً عن طبقات المجتمع الراقية باستخدام الشاي الأخضر كشراب منعش ، وأن استهلاكه من قبل هذه الفئات فقط يعود الى كونه كان يباع بأسعار باهضة جداً ( Sahley and Berkiner , 2006 ; Campbell, 2004).

وفي أوائل القرن الثامن أشتهر الشاي الأخضر من الصين الى اليابان من خلال تباين الثقافات والتبادل التجاري وأستخدم أيضاً لأهميته الطبية ، وخلال تلك الفترة وحتى القرن الخامس عشر أستخدم الشاي الأخضر كشراب منعش من قبل طبقات المجتمع الراقي ، وبمرور السنين وحتى أواخر القرن السادس عشر أشتهر شراب الشاي الأخضر حتى بات يشمل شرائح المجتمع المدني كافة حيث أصبح مشروباً عاماً للمجتمع الصيني فضلاً عن استخدامه كعلاج لمنع داء الإسقربوط (Scurvy) من قبل البحارة الصينين لاحتوائه على فيتامين C (Axelrod *et al*., 2010 ; Campbell, 2004) .

كما تعد الهند الى جانب الصين من الدول التي اشتهرت باستخدام الشاي الأخضر منذ عقود كمشروب طبي ( Gupta *et al*., 2009) .

وخلال هذه الفترة من القرن السادس عشر جرى أتساع استخدام الشاي الأخضر الى أوربا حتى وصل أمريكا و انكلترا (Sahley and Berkner, 2006) .

أشتهر الشاي الأخضر بأسماء شائعة عدة منها :الشاي الأخضر(Green Tea)، الشاي الصيني (Chinese tea) ، الشاي الياباني (Japanese tea) ،الشاي غير المخمر (Unfermented tea) .أما الاسم العلمي فهو *Camellia sinensis* و الـ *Camellia* أسم الجنس سميت بهذا الاسم من قبل Carolus Linnaeus عام 1735 تكريماً لعالم النبات Georg Joseph Kamel مستخدماً الاسم اللاتيني له Camellus ، أما أسم النوع *sinensis* و الذي يعني باللاتينية China . ، (Gupta *et al*., 2009 ; Sarma *et al*., 2008 ; Anon, 2002 ; Cooper,1978) وأما التصنيف العلمي للشاي الأخضر فهو كالآتي :

Superdivision : Spermatophyta- Seed plants

Division : Magnoliophyta- Flowering plants

Class : Magnoliopsida- Dicotyledons

Subclass : Dilleniidae

Order : Theales

Family : Theaceae- Tea family

Genus : *Camellia*

Species : *C. sinensis*

(Mahmood *et al*., 2010)

## 8-2 وصف النبات Plant Description

شجرة أو شجيرة دائمة الخضرة يصل ارتفاعها الى (1-5) م وقد يصل الى 9 م ، الأوراق خضراء داكنة اللون ، أهليليجية الشكل (Oval) بحافات مسننة (Serrated edges) ذات أبعاد ما بين (2-7.5) سم عرضاً و (5-14) سم طولاً، عديمة الأهداب (Exstipulate ) بترتيب متبادل (Alternate) .والأزهار بيضاء ذات رائحة عطرة ، أبطية (Axillar) أو شبه طرفية (Sub terminal) تظهر بهيئة عناقيد (Clusters) بقطر (2.5-3.5) سم أو تكون منفردة (Singly) كما في الشكل (2-3)، ذات أوراق كأسية (Sepals) بحدود 5أوراق ، وأوراق تويجية (Petals) (6-8) أوراق ، و تكون الأوراق التويجية متصلة مع سداة واسعة عند القاعدة النصل ذو طول يتراوح بين (5-10) ملم . المبيض يحتوي على ثلاث غرف . أما الثمرة فهي من نوع (Capsule) خشنة خضراء اللون وبقطر (1-1.5) سم تحتوي من (1-3) بذور ملساء بنية اللون . (Shu , 2007 ; Gruenwald *et al.,* ,1998)

**شكل (2-3) يوضح زهرة و أوراق الشاي الأخضر (Odom,2007)**

## 2-9 التوزيع الجغرافي للشاي الأخضر

تعد الغابات الاستوائية و شبه الاستوائية بيئة طبيعية للشاي الأخضر ،حيث تكون منطقتي جنوب وجنوب شرق آسيا موطناً لزراعته ،كما يزرع في مناطق من وسط أفريقيا و الشـرق الأوسط ( Gupta *et al*., 2009;Lin *et al*., 2003) .

لذا فان أكبر إنتاج للشاي الأخضر يقدر بنصف أنتـاج العـالم يكـون مصـدره الصين والهند بينما تشكل كل من أنـدنوسيـا ،كينيـا ، و سيرلانكا معاً ربع الإنتاج الكلي ، في حين تشكل كل من اليابان،بنغلادش ، الأرجنتين ، ملاوي و تنزانيا معدلات منخفضة من الإنتاج ، ذكره(2008) Abdul-Jabbar , نقلاً عن (Chang and Yabuki , 2003) كما تعرف سيرلانكا بأنها أول منتج للشاي الأخضر عام 1986 كما يـزرع أيضاً في كـل من،كوريا ، تايلند ، تايوان وأثيوبيا حيث توسعت زراعة الشاي الأخضر لتشمل أكثر من 20 دولة آسيويـة وافـريقية ومنـاطق جـنوب أمـريكا ، و فـي الـوقت الحاضر

تعــد الصين واليــابــان مــن الــدول المسيطرة عــلــى إنتــاج الشــاي الأخـــضر (Axelrod *et al*., 2010;Corporation , 2007; Lin *et al*., 2003) .

## 10-2 المواد الفعالة Active Constituents

تحـوي أوراق الشاي الأخضر على مـركبــات متعـــددة الفيــنـول (Polyphenolic compounds) ، وأن أغلب هـــذه المـــركبات هـــي الـــ Flavanols والتـــي تعرف بـCatechines وتشمـل epicatechin (EC)،epicatechin-3-gallate (ECG) ، epigallocatechin (EGC) ، epigallocatechin -3-gallat (EGCG)،حيث تعـد هـذه المــركبات من أكثر المواد الفعــالة بايــولـوجيــاً وعلى وجه الخصوص (EGCG) ، تشكل مركبات Catechines حوالي (30-42) % من الــوزن الجــاف الصلب للشــاي الأخضر ( Yang *et al*., 2000 ; Lin *et al*., 2003 ;Sharma *et al*., 2007; Gupta *et al*., 2010 ;Adak and Gabar , 2011) فــي حين تشــكـــــــل EGCG (10-50) % مــــــن المحتــوى الكـــلــي للـ Catechines (Gupta *et al*., 2009) كمـــا تشــمــل المركــبات المتـــعـددة الفــيــنــول Phenolic acid ، Flavonoids و Flavadiols (Lin *et al* ., 2003 ; Adak and Gabar , 2011). كما يحتوي على المركبات القلـــويـة (Alkaloid) والتي تشمــل الـ Caffeine بنسبــة (3-4)%و Theobromine بنسبــة (0.02-0.04)%(Gupta *et al*., 2010 ) ، كما يحتوي على بروتينات تشكل (15-20)% من الـــوزن الجاف تشكل الأنزيمات جزءاً مهماً منها ،كما يحتوي على أحمـــاض أمينيـــة بنسبــة (1-4) % مثـــل Glutamic acid ،Tryptophan، Glycin ، Serine ،Tyrosin ، Valin ، Lysine وغيرها ، كما تشكل الكاربوهدرات (5-7)% من الوزن الجاف مثل السليلوز ، البكتين ، كلوكوز ، فركتو، و سكروز، فضلاً عن احتوائه على دهــون (lipid) مثـل (linoleic and linolenic acids ) ، وفيتتامينات مثل ( B ، C ، E) وزيوت طيارة (Volatile oiles) و تشكل المعادن حوالي 5 % من الوزن الجاف منها Ca ، Mg ،Mn ، Fe ، Cu ، Zn ، Co ، Na ، P و Al أوغيرها فضلاً عن Quinic acid ، Riboflavin ، Folic acid ، Niacin ، Pantothenic acid و صبــغـات (Chlorophyll وCarotenoids) ومــواد أخـــرى . ( Gupta *et al*., 2010 ; Adak and Gabar , 2011) .

## 11-2 الأهمية الطبية للشاي الأخضر Clinical Indications

إن الرائحة الجذابة للشاي الأخضر وطعمه الجيد وكونه ذو تأثيرات صحية جيدة جعلت منه واحداً من أكثر المشروبات الشعبية المفيدة ، فضلاً عن استخدامه لأهميته الطبية أكثر من غيرها و لذلك يعد الشاي ثاني أكبر شراب مستهلك في العالم (Adak and Gabar ; Gupta *et al*., 2009; Sharma *et al*., 2007 ;Anon,2002 , 2011) .

إن للشاي الأخضر استخدامات طبية عدة اذ يستخدم لعلاج الإسهال (Diarrhea) والتقيؤ (Vomiting)، كما يستخدم لعلاج اضطرابات المعدة ومشاكل الهضم ،كما يستخدم لعلاج الصداع ولعلاج عسر البول (Dysuria) ، و يعمل على تنظيم درجة حرارة الجسم ، وحماية الجلد من الأضرار الناتجة عن التعرض لأشعة الشمس فيما يعمل على تحسين اليقظة العقلية (Improve mental alertness) حيث يستخدم كمنشط يعمل على تحفيز الجهاز العصبي المركزي (Sarma *et al*.,2008 ; Anon, 2003 ) .

إن الشاي الأخضر يساعد على فقدان الوزن حيث وجد خلال الدراسات أن مستخلصات الشاي الأخضر والتي تحوي على 90 mg من EGCG و بأخذه ثلاث مرات يومياً تحرق ما يعادل أكثر من 266 سعرة حرارية باليوم الواحد حيث يحفز التوليد الحراري (Thermogenesis) الذي ينتج عنه زيادة في إنتاج الطاقة وبالتالي زيادة في السعرات المتحررة (Brannon , 2008 ; Anon , 2002) .

ويستخدم أيضاً الشاي الأخضر لعلاج مرض السكري (Diabetes) حيث يعمل على اختزال مستويات السكر بالدم إذ أوضحت العديد من الدراسات أن مستخلصات الشاي الأخضر تعمل على خفض السكر بالدم كونها تعمل على تحسين فعالية الأنسولين الذي يعمل على تنظيم السكر بالدم . (Gupta *et al*., 2010 ;Brannon,2008;Sahley and Berkiner,2006 ) .

أما لعلاج أمراض القلب ، فيعمل الشاي الأخضر على خفض تركيز الكوليسترول الكلي في المصل ( Gupta *et al*., 2010; Anon, 2002) وكذلك خفض ضغط الدم ، حيث أوضح Dr.Bautista عام (2004) في دراسته التي تضمنت 15 حالة مرضية لارتفاع الكولسترول لأشخاص لم يكونوا من مستهلكي الشاي الأخضر ، و قد عمدت الدراسة الى

جعل كل مريض يأخذ ثـلاث أكواب يومياً من الشاي الأخضر لمدة أسبوعين ، فكانت النتيجة انخفـاض الكوليسترول من 235 مليغرام/ديسلتير الى 187 مليغرام/ ديسليتر كما لوحظ انخفاض الدهون أيضاً (Lower density lipid) (LDL) من 144 مليغرام/ ديسليتر الـى 137 مليغرام/ ديسليتر كما سجـل انخفـاضاً فـي ضغـط الـدم أيضـاً (Sahley and Berkine, 2006) ، كمـا أن الشـاي الأخضر يختـزل خطورة أمراض الأوعية الدموية القلبية (Cardiovascular disease) ويثبط تثخـر الـدم الغـير طبيعي (Axelrod *et al* ., 2010 ). فضلاً عن ذلك يساعد على الحمـاية من تطـور حصى الكـلى حيث يـؤثر على امتصـاص الـ(Oxalate) التي تـؤدي الـى تكـوين الحصى (Brannon , 2008 ).كما يستخدم لعلاج أمراض الكبد من خلال حمايته من التأثيرات الناتجـة من المواد السامة مثل الكحول ، حيث سجل إن الشاي الأخضر أو مستخلصاته توفرالحماية ضد أضرار الكبد الكحولية المستحثة ( Alcoholic-induced liver injury) بميكانيكية غيرمعروفة تماماً (Yuan *et al* .,2006a). كـما يلعب الشاي الأخضر دوراً فـي منـع التصـاق البكتريـا بـالأسنـان كونـه حـاوي علـى الفلـوريد بصورة

طبيعيـة كـما انـه يثبـط نمـو البكتريـا بتجـاوبف الأسنـان مثـل *Escherichia coli* , *Streptococcus mutans* و *Streptococcu sobrinus* ( Ogle ,2009; Brannon , 2008) .

أهـم استخدامات الشـاي الأخضر و مستخلصـاته وخصوصـاً ( EGCG ) يمثـل كونـه مضاد للأكسدة (Antioxidant) ، مضـاد للالتهـابات (Anti-inflammatory) ومضـاد للسـرطـان (Anticarcinogenic) مثـل سـرطـان ( البنكريـاس ، القولـون ، الـرئة ، المـرئ ، المثانـة و سـرطان الجـلد و غيرهـا ) (Axelrod *et al* ., 2010; Adak and Gabar , 2011 ) حيث تعمل مستخلصات الشاي الفينوليـة وخصوصاً EGCG على تثبيـط تطور الورم وتثبيط معـدل تضـاعـف الخـلايا (Anon, 2002) ، كما لـه تأثـير مضاد للأحيـاء المجهرية حيث أنـه لـه فعالية واضحـة في تثبيط نمو الأحياء المجهـريـة حيث أوضحـت دراسـة اجـريت مـن قبل ( Jazani *et al* ., 2007 ) أن مستخلـص الشاي الأخضـر المائي لـه فعالية كقـاتل بـكتيري (Bactericidal) على سلالات من بكتريا

*Pseudomonas aeruginosa* و سلالات بكتيرية أخرى ( Sahley and Berkine, 2006; Ogle , 2009 ; Gupta *et al*., 2010) .

إن استخدام الشاي الأخضر بطريقة معقولة وبكميات معتدلة (3-10) أكواب لليوم الواحد من قبل الأشخاص البالغين يعد استخداماً آمناً، وفي حال أخذ كميات كبيرة وبتركيز عالٍ فأن ذلك يؤدي الى حدوث تأثيرات جانبية كالأرق (Insomnia) ، صداع (Headaches) ، الاهتياج (Irritability) ، العصبية (Nervousness) ، قلق (Anxiety) ، خمول (Restlessness) ، فقدان الشهية (Loss appetite) ، اضطرابات في المعدة و إرتفاع في ضغط الدم (Hypertension) و كما قد يسبب اضطراب قلبي (Cardiacarrhythmias) في الأفراد الحساسين ، فضلاً عن البول المتكرر و الإمساك أو إسهال ( Constipation) . Babitha ;Sarma *et al.*,2008;Anon,2003;Yang *et al*.,2000)or Diarrhea .(*et al.*, 2009

## 12-2 تأثيرات الشاي الأخضر على فعل و أمراضية عديد السكريد الشحمي

تعد المركبات المتعددة الفينول (Polyphenolic compounds) من أهم مركبات الشاي الأخضر و التي تشمل Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ، Epigallocatechin (EGC) ، Epicatechin-3-gallate (ECG) و Epicatechin(EC) ، بصورة عامة تعرف هذه المركبات بـ Catchine (Maruyama *et al.,*2011) .أن هذه المركبات المتعددة الفينول تعد من المجاميع الأكثر أهمية في الشاي الأخضر ، ولها وظائف بايولوجية متعددة منها كمضادات للأكسدة ، مضادات للالتهابات ، ولها تأثير مضاد للسرطان (Yuan *et al*., 2006a ; Yuan *et al*., 2006b ) .

اذ تحتوي مستخلصات الشاي الأخضر على مواد فعالة مضادة للأكسدة مثل فيتامين (C , E) وهي بدورها تعمل على أضعاف فعالية (NF-kB) .كما أن حقائق الشاي الأخضر من حيث كونه مضاد للأكسدة تزداد لاحتوائه على المركبات الفينولية المتعددة والتي تعد من أهم المركبات الفعالة في الشاي الأخضر وخصوصاً Epigallo-3- catechin gallate (EGCG) اذ تعمل على تثبيط التعبير الجيني للوسائط الالتهابية مثل الانترليوكينات ، TNF $\alpha$ و iNOS حيث أكد Yang *et al*., (1998) أن المعاملة المسبقة بالشاي الأخضر تعمل على تنظيم التعبير الجيني لـ TNF $\alpha$ وذلك من خلال تنظيم فعالية NF-kB الناتجة عن خواص الشاي الأخضر كمضاد للأكسدة وبالتالي تعمل EGCG للشاي الأخضر على تثبيط فعالية عديد السكريد الشحمي من إنتاج وتحفيز mRNA لـ TNF $\alpha$ وإيقاف فعالية (NF-kB) داخل النواة ، و كذلك Yuan *et al*., (2006b) الذي عمل على الجرذان حيث لاحظ تثبيط إنتاج أنزيمات iNOS و الذي يؤدي الى إيقاف فعالية (NF-kB) و بطريقة مماثلة للوسائط الالتهابية الأخرى ، كذلك أوضح(2001) ., Yang *et al* أن المستخلص الفينولي للشاي الأخضر وخصوصاً EGCG يعمل على إيقاف نشاط (NF-kB) و ذلك من خلال تثبيط فعالية معقد IkB kinase (IKK)copmlex والذي يتوسط عملية استنساخ ( NF-kB) وبالتالي يعمل بدوره على تثبيط إنتاج الوسائط الالتهابية كما أسلفنا مثل (TNF $\alpha$) ، (Webb , 2002) .

# الفصل الثالث

# المواد وطرائق العمل

# الفصل الثالث

## 3 - المواد وطرائق العمل Materials and Methods

### 1-3 المواد Material

#### 1-1-3 المواد الكيمـــاوية المستخدمـــة :

| الشركة/المنشأ | المادة |
|---|---|
| BDH(England) | α - naphtol الألفانفثول |
| BDH(England) | Ethylenediamintetraaceticacid (EDTA) |
| BDH(England) | Urea اليوريا |
| BDH(England) | Phenol red أحمر الفينول |
| BDH(England) | Methyl red أحمر المثيل |
| BDH(England) | Sodium azide($NaN_3$) أزايد الصوديوم |
| Sigma- Aldrich | Lysozyme أنزيم اللايسوزايم |
| BDH(England) | Iodine الأيودين |
| BDH(England) | Pepton ببتون |
| BDH(England) | Crystal violet البنفسج البلوري |
| Himedia(India) | Bovine Serum albumin البومين المصل البقري |
| Fluka (Switzerland) | Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) بيروكسيد الهيدروجين |
| Fluka (Switzerland) | Glacial acetic acid حامض الخليك الثلجي |
| BDH(England) | Sulphonic acid ($H_2SO_4$) حامض الكبريتك |
| Fluka (Switzerland) | Safranin stain سفرانين |
| الشركة/المنشأ | المادة |

| | | |
|---|---|---|
| BDH(England) | Glucose | سكرالكلوكوز |
| Fluka (Switzerland) | Methylene blue | صبغة المثلين الأزرق |
| Sigma- Aldrich | Comasie blue | صبغة كومـازي الزرقـــاء |
| BDH(England) | Formalin | فورمالين |
| BDH(England) | Dipotassium hydrogen phosphate($K_2HPO_4$) | فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين |
| BDH(England) | Dipotassium hydrogen phosphate($KH_2PO_4$) | فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين |
| BDH(England) | Phenol($C_6H_5OH$) | الفينول |
| Fluka (Switzerland) | N,N,N,NTetramethyl– p–pheylene diaminedihydrochloride | كاشف الأوكسيديز |
| BDH(England) | P-Dimethylaminobenzaldehyde | كاشف الكوفاك |
| BDH(England) | Potassium sulfate ($K_2SO_4$) | كبريتات البوتاسيوم |
| Ajax (Autralia) | Ethanol | كحول أثيلي |
| Ajax (Autralia) | Isoamyl alcohol | الكحول الأيزوأميلي |
| BDH(England) | Sodium chloride (NaCl) | كلوريد الصوديوم |
| BDH(England) | Magnesium chloride ($MgCl_2$) | كلوريد المغنيسيوم |
| BDH(England) | Glycerol | كليسيرول |
| BDH(England) | Potassium hydroxid (KOH) | هيدروكسيد البوتاسيوم |
| Fluka (Switzerland) | Potassium iodid | يوديد البوتاسيوم |

## 3-1-2 الاجهزة المستخدمة

استخدمت الاجهزة الاتية :

| الشركة/ المنشأ | اسم الجهاز | |
|---|---|---|
| Mauritius- Germany | pH meter | جهاز قياس الرقم الهيدروجيني |
| Termaks-stockholm | Incubator | حاضنة |
| Labtech – Korea | Shaking incubator | حاضنة هزازة |
| Julabo SW23-Germany | Shaker water bath | حمام مائي هزاز |
| Denka – Korea | Blender | طاحونة كهربائية |
| Memmert – Germany | Electrical oven | فرن حراري كهربائي |
| YX-280 B – china | Autoclave | مؤصدة |
| Kenwoodchef-Germany | Vortex mixer | مازج مغناطيسي |
| Motic - Germany | Light microscope | مجهر ضوئي |
| Labtech – Korea | Magnatic stirrer hot plate | محرك مغناطيسي ذو الصفيحة الساخنة |
| American optical co. | Microtome | المشراح |
| Tudor – Korea | Specterophotometer | مطياف ضوئي |
| Hettich – Germany | Centrifuge | منبذة |
| Hettich – Germany | Heigh speed cooling centrifuge | منبذة مبردة عالية السرعة |
| Sartorius – Germany | Sensitive balance | ميزان حساس |

## 3-1-3 الأوساط الزراعية Culture media تـم

تعقيم الأوساط الـزراعية بالمؤصـدة بدرجـة حـرارة 121°م تحت ضغط 15 باوند / انج ² ولمدة 15 دقيقة .

### 3-1-3-1 : وسط غراء الماكونكي ( MacConkey agar ) ( Himedia )

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، حضر الوسط وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد الى درجة حرارة 50°م وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ، استعمل هذا الوسط لاختبار القابلية على تخمير سكر اللاكتوز .

### 3-1-3-2 وسط الغراء المغذي ( Nutrient agar ) ( Himedia)

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ،حضر الوسط وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد الى درجة حرارة 50 °م ، بعدها صب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ، استعمل هذا الوسط لتنمية العزلة البكتيرية ، ودراسة خصائصها المظهرية .

### 3-1-3-3 وسط ( King A )

حضر بإذابة 20غم من الببتون (Difco ) ، 10 مل من الـ كليسيرول ، 1.4 غم من $MgCl_2$ ، 10 غم من $K_2SO_4$ و15 غم من الأكار في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الى لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة ، بعدها ترك ليبرد الى 50°م ثم صب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ، استعمل الوسط لأختبار قابلية العزلة البكتيرية على إنتاج مـادة البايوسيانين (Pyocyanin) .

### 3-1-3-4 وسط غراء ثلاثي السكر والحديد ( Tripl sugar iron agar ) ( Oxoid )

حضر الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، ثم وزع في أنابيب زجاجية نظيفة وبواقع 5 مليلتر لكل أنبوبة ، وبعدها عقمت الأنابيب بالمؤصدة و بعد التعقيم وضعت الأنابيب بصورة مائلة لتتصلب وحفظت بدرجة حرارة 4°م حتى الأستعمال .أستعمل هذا الوسط للتحري عن القابلية على تخمير سكر الكلوكوز واللاكتوز والسكروز وكذلك إنتاج غازي كبريتيد الهيدروجين $H_2S$ و ثاني أوكسيد الكاربون $CO_2$ .

### 3-1-3-5 وسط غراء اليوريا ( Urea agar )

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، تم تحضير 950 مليلتر وسط غراء اليوريا الأساسي (Urea agar base) (Oxoid) ثم عقم بالمؤصدة و ترك ليبرد الى درجة حرارة 45 مْ ، ثم تم إضافة 50 مليلتر من محلول اليوريا ( 40% ) المعقم بالترشيح ، بعدها تم صب الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة وبواقع 5 مليلتر لكل أنبوبة وتركت أنابيب بصورة مائلة للتصلب .استعمل الوسط للكشف عن قابلية العزلة البكتيرية على إنتاج أنزيم اليوريز ( Urease ) الذي يحلل اليوريا الى أمونيا و ثاني أوكسيد الكاربون .

### 3-1-3-6 وسط الحركة ( Motility medium )

حضر وسط المرق المغذي وفق تعليمات الشركة المجهزة ( Himedia ) وأضيفت اليه الأكار( Agar- agar ) (Oxoid ) بنسبة (0.4%) و وزع في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مليلتر لكل أنبوبة ، عقم بعدها بالمؤصدة وترك ليتصلب بشكل عمودي ، أستخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية الحركة للعزلة البكتيرية .

### 3-1-3-7 وسط ماء الببتون ( Indol production medium )

حضر بإذابة 20 غم من الببتون و 5 غم من NaCl في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الى لتر من الماء المقطر، و ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ووزع في أنابيب زجاجية نظيفة وعقم بالمؤصدة ، استعمل الوسط للتحري عن إنتاج الأندول من قبل العزلة البكتيرية .

### 3-1-3-8 وسط أحمر المثيل – فوكس بروسكور

### (Oxoid) ( Methyl red – Vogas prosKauer medium)

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة تم تحضير هذا الوسط ووزع في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة ، ثم عقم بالمؤصدة ، هذا الوسط استعمل للتحري عن قابلية العزلة البكتيرية على تخمير السكر بمسلك الحوامض الخليطة ( Mixed acid fermentat ) وإنتاج الاسيتوين ( Acetoin ) .

### 3-1-3-9 وسط غراء سترات سيمون ( Simmnon،s citrate agar ) (Oxoid )

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، حضر الوسط و وزع في أنابيب زجاجية نظيفة وبواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة ، وعقم بالمؤصدة وتركت الأنابيب بعدها لتبرد بصورة مائلة ، استعمل الوسط للكشف عن قابلية العزلة البكتيرية على استخدام السترات كمصدر وحيد للكاربون .

### 3-1-3-10 وسط الجلاتين ( Gelatine medium )

حضر هذا الوسط وفقاً لـ Macfaddin, (2000) وذلك بإذابة الجلاتين ( BDH ) في الماء المقطر بتركيز 12% وترك بعدها لمدة ( 15 – 30 ) دقيقة من ثم سخن على درجة حرارة 50 °م لإذابة الجلاتين كلياً ، تمت بعدها إضافة خلاصة لحم البقر ( Beef extract ) بتركيز 0.3% والببتون بتركيز 0.5% وسخن مرة أخرى على ( 50 °م) ، بعد ذلك وزع الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة ، عقمت بالمؤصدة وتركت الأنابيب لتصلب الوسط بشكل عمودي ، استخدم الوسط للتحري عن إنتاج أنزيم حال الجلاتين ( Gelatinase ) .

### 3-1-3-11 وسط تخمر السكريات (Sugar fermetation medium )

وفقاً لـ ( 2000 ) ، Macfaddin حضر الوسط بإذابة ( 10, 5 ,0.08 )غم من الببتون (Difco) وكلوريد الصوديوم Nacl (BDH) وأحمر الفنيول (BDH) على التوالي في كمية من الماء المقطر ، بعدها تم أكمال الحجم الى 500 مليلتر بالماء المقطر بعد ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ووزع الوسط في أنابيب زجاجية بواقع 5 ملليتر لكل أنبوبة مع وضع أنبوبة درهم ( Derhum tube ) مقلوبة ، ثم عقمت الأنابيب بالمؤصدة وبعد ذلك تركت لتبرد واضيفت لها السكريات المعقمة وبتركيز 1% .

### 3-1-3-12 مرق نقيع القلب والدماغ ( Brain heart infusion broth ) (Difco )

حضر الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، وتم توزيعه في أوعية نظيفة مختلفة الأحجام وحسب الحاجة وعقم الوسط بالمؤصدة ، استعمل الوسط كمنشط لنمو البكتريا .

## 3-1-4 الكواشف و المحاليل Indicators and Reagents

### 3-1-4-1 الكواشف

#### 3-1-4-1-1 محاليل ملون غرام ( Gram،s stain )

تم تحضير الصبغة وفقاً لـ (Talib , 1996 ) :

**أ- صبغة البنفسج البلوري ( Crystal violete)**

محلول A : تم إذابة 2 غم من مسحوق الصبغة في 20 ملیلترمن الكحول الأثيلي 95%.

محلول B : 0.5 غم من أوكزالات الأمونيوم ، ويخلط المحلولين حتى التجانس ، ثم رشح المحلول بورق الترشيح (Whattman) مرتين وحفظت في قناني زجـــاجية معتمة ونظيفة .

**ب- صبغة السفرانين ( Safranin )**

حضرت بإذابـة 0.25 غم من مسحوق الصبغة في 10 ملیلتر مـن الكحول الأثيلي 95% ويضاف له 100 ملیلترمن الماء المقطر، و رشحت بورق الترشيح (Whattman) و حفظت في قناني زجاجية معتمة ونظيفة .

**جـ - مثبت الأيودين ( Mordant iodine )**

حضر بمزج 1 غم من حبيبات الأيودين مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم مع الطحن الجيد وأذيب الخليط في 20 ملیلتر من الماء المقطر بعدها تم أكمال الحجم الى 300 ملیلتر بالماء المقطر .

**د- محلول القصر ( Decolorizer )**

تم استعمال الكحول الأثيلي بتـركـيز 95% لإزالــة الصبغـة .

#### 3-1-4-1-2 كاشف كوفاكس ( Kovac،s Reagent)

حضر هذا الكاشف بإذابة 5 غم من (P- Dimethylaminobenzaldehyde) في 75 مليلتر من الكحول الأيزواميلي (Isoamyl alcohol) واضيف لهما ببطء 25 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك (37%) ، ( Macfaddin , 2000) .

### 3-1-4-1-3 كاشف أحمر المثيل (Methyl – Red Reagent)

حضر هذا الكاشف بإذابة 0.01 غم من مسحوق أحمر المثيل في 30 مليلتر من 95% كحول أثيلي Ethanol ، و تم أكمال الحجم الى 50 مليلتر باستخدام الماء المقطر ، (Macfaddin , 2000) .

### 4-1-4-1-3 كاشف باريت (Barrit's indicator)

وفقاً لما جاء في (Macfaddin , (2000 حضر من محلولين :

الاول : محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40% ، والذي حضر بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مليلتر من الماء المقطر .

الثاني : حضر هذا المحلول آنياً ، وذلك بإذابة 0.05 غم من مسحوق الالفا نفثول ( α - naphtol ) في 100 مليلتر في 95% كحول أثيلي .

### 5-1-4-1-3 كاشف أنزيم السايتوكروم اوكسيديز( Cytochrome oxidase indicator)

حضر الكاشف بإذابة 1 غم من مسحوق N,N,N,NTetramethyl– p–pheylene diamine dihydrochloride في 100 مليلتر من الماء المقطر وحفظ في قنينة زجاجية معتمة .

### 6-1-4-1-3 كاشف أنزيم الكاتاليز (Catalase indicator)

أستعمل محلول بيروكسيد الهيدروجين ($H_2O_2$) بتركيز 3% .

### 3-1-4-2 المحاليل المستعملة في استخلاص عديد السكريد الشحمي LPS الخام من الخلايا البكتيرية .

أولاً- محلول رقم ( 1 ) :

دارئ الفوسفات الملحي ( Phosphate buffered saline) : حضرعلى وفق بير وجماعته (1978) و Pier *et al.* ويتكون من :

| | | |
|---|---|---|
| كلوريد الصوديوم | NaCl (BDH) | 8غم |
| فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين | $K_2HPO_4$ (BDH) | 1.21غم |
| فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين | $KH_2PO_4$ (BDH) | 0.34 غم |

تم إذابة المواد أعلاه في لتر من الماء المقطر مع ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ، ثم عقم بالمؤصدة .

ثانياً - محلول رقم (2 ) :

دارئ الفوسفات الملحي والمضاف له 0.5% من الفورمالين (Formalin) ذو التركيز 30% : حضر بإضافة 5 مليلتر من الفورمالين الى لترتقريباً من محلول رقم (1) .

ثالثاً - محلول رقم (3) :

هو (0.05) مولاري دارئ فوسفات الصوديوم ذو الرقم الهيدروجيني (7) : مضافا اليه (0.05) مولاري EDTA و 0.05% أزايد الصوديوم ( Sodium azide) . اذ حضر هذا المحلول بإذابة 7.8 غم من فوسفات الصوديوم و 18.61غم من الـ EDTA و 0.5 غم من أزايد الصوديوم في 900 مليلتر من الماء المقطر ، وبعد تعديل الأس الهيدروجيني الى 7 تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة الماء المقطر.

رابعاً - محلول رقم (4) :

محلول 0.02 مولاري كلوريد المغنيسيوم ( $MgCl_2$) : حضر بإذابة 4.066 غم من كلوريد المغنيسيوم في كمية من الماء المقطر بعدها تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة الماء المقطر .

خامساً - محلول رقم ( 5 ) :

محلول الفينول Phenol 90% : والذي حضر بإذابة 90 غم من الفينول في أقل حجم ممكن من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مليلتر بإضافة الماء المقطر ، حضر هذا المحلول آنياً .

**3-4-1-3 المحاليل المستعملة في تقدير كمية الكاربوهيدرات في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي LPS .**

حضرت وفقاً لـ ( Dubois *et al*., (1956 وهي كالآتي :

أولاً - محلول رقم ( 1 ) :

محلول الكلوكوز الخزين : حضر بإذابة 0.01 غم من سكر الكلوكوز في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مليلتر بإضافة الماء المقطر .

ثانياً - محلول رقم ( 2 ) :

محلول الفينول 5% : حضر بإذابة 5غم من بلورات الفينول في أقل حجم ممكن من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم الى 100 مليلتر بإضافة الماء المقطر .

ثالثاً - محلول رقم ( 3 ) :

حامض الكبريتيك المركز $H_2SO_4$ .

**4-4-1-3 المحاليل المستعملة في تقدير كمية البروتين في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي LPS .**

حضرت وفقاً لـ Bradford *et al*., (1976) وهي كالآتي :

أولاً - محلول رقم ( 1 ) :

المحلول الخزين من ألبومين المصل البقري (Bovine Serum albumin) : والذي حضر بإذابة 10 ملغرام منه في 100 مليلتر من الماء المقطر .

ثانياً - محلول رقم (2 ) :

صبغة كومازي الزرقاء (Comasie blue) : حضرت وفق تعلميات الشركة المجهرة (SIGMA- ALDRICH) ، بإذابة 100 ملغم من مسحوق صبغة الكومازي الزرقاء في 50 مليلتر من الكحول الأثيلي 95 % ، ثم اضيف الى 100 مليلتر من حامض الفسفوريك 85% ، بعدها تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة الماء المقطر .

## 3-1-4-5 المحاليل والمواد المستعملة في عد خلايا الدم البيض .

حضرت المحاليل وفقاً لـ Davidsohn , (2001) وهي كالآتي :

**أ- صبغة المثيلين الازرق Methylene blue**

حضرت بإذابة 0.3 غم من مسحوق الصبغة في 30 مليلتر من الكحول الأثيلي 95% وبعد الذوبان الكلي لها تم إضافة 100 مليلتر من الماء المقطر ثم رشحت باستعمال ورق الترشيح (Whattman) ثم حفظت في قنينة نظيفة .

**ب- محلول تخفيف خلايا الدم .**

حضر المحلول بإضافة 2 مليلتر من حامض الخليك الثلجي( Glacial acetic acid )الى 97 مليلتر من الماء المقطر والمعقم مع إضافة 1 مليلتر صبغة المثيلين الأزرق كدليل لوني وحفظت بدرجة حرارة 4°م .

**جـ - العدة الخاصة بالعد وتتكون من شريحة العد Haemocytometer ذو عمق 0.100 ملم ومساحة 0.0025 ملم$^2$ و الماصة الخاصة بسحب الدم و تخفيفه .**

## 3-1-4-6 المواد والمحاليل المستعملة في تحضير المقاطع النسيجية للأعضاء المنتخبة من الفئران .

**أ- محلول تثبيت أعضاء الفئران**

محلول دارئ الفورمالين 10% المتعادل ( Buffered formalin ) ، والذي استخدم لتثبيت الأعضاء المنتخبة من الفئران بعد تشريحها ، والذي حضر من 4 غم من فوسفات الصوديوم الحامضية $Na_2HPO_4 . H_2O$ و 6.5 غم من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين و 100 ملليترمن الفورمالين ، ثم تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة ماء الحنفية مع ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7 .

**ب – الصبغات**

- صبغة الهيماتوكسيلين ( Haematoxylin ).
- صبغة الايوسين ( Eosin ) .

**جـ- الكحولات**

- الكحول الاثيلي بتراكيز مختلفة ( Ethanol) .
- الزايلول ( Xylole ) .
- الكحول المحمض ( Acid alcohol ) .

## 2-3 طرائق العمل Methods

### 1-2-3 العينات Specimens

#### 1-1-2-3 العينة النباتية

تم الحصول على أوراق نبات الشاي الأخضر من الأسواق المحلية ، وتم طحنه بواسطة طاحونة كهربائية (Blender)لجعله بشكل مسحوق وحفظ هذا المسحوق في أكياس نايلون جافة ونظيفة في الثلاجة لحين الاستعمال.

#### 2-1-2-3 العزلة البكتيرية .

تم الحصول على عزلة واحدة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* مشخصة من قبل العاملين في مختبرات مستشفى الحسين (ع) العام وقد عزلت هذه العزلة من مريض مصاب بخمج السبيل البولي (Urinary tract infection) وتم أعادة تشخيصها من قبلنا تأكيدياً .

### 2-2-3 الحيوانات المختبرية Lab Animals

تم استخدام ذكور الفئران السويسرية نوع ( Balb c ) البيضاء بأعمار تتراوح بين ( 8-10) أسابيع وأوزان ( 20 – 25 ) غم ، إذ تم الحصول عليها من المركز الوطني للوقاية والبحوث الدوائية في بغداد . هذه الحيوانات وضعت في أقفاص خاصة داخل البيت الحيواني مع مراعاة نظافة مياه الشرب والعلف مع تعقيم الأقفاص بين الحين والأخر .

### 3-2-3 تحضير مستخلصات الشاي الأخضر

#### اولاً : المستخلص المائي الحار :

تم وزن 5 غرام من مسحوق الشاي الأخضر المحضر وفقاً للفقرة ( 3-2-1-1 ) أعلاه ووضع في وعاء زجاجي نظيف ومعقم واضيف اليه 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم المغلي ووضع على جهاز المحرك المغناطيسي لمدة نصف ساعة ، ترك المستخلص بعدها ليبرد وترك الى اليوم التالي وتم ترشيحه باستعمال الشاش الطبي النظيف ، Awasthi and Mukerjee (1980) .

**ثانياً : المستخلص الكحولي :**

تم وزن 5 غرام مـــن مسحوق الشـــاي الأخضر والمحضر وفـــقاً للفقـــرة ( 3-2-1-1 ) أعلاه ووضع في وعاء زجاجي نظيف ومعقم وأضيف اليه 100 مليلتر من الكحول الأثيلي 70% ووضع المستخلص بعدها في حاضنة هزازة بسرعة 100 هزة / دقيقة لمدة نصف ساعة مع وترك الى اليوم التالي وتم ترشيحه باستعمال الشاش الطبي النظيف Awasthi and Mukerjee (1980) .

## 3-2-4 الاختبارات التشخيصية للعزلة البكتيرية Laboratory Diagnosis

تم التشخيص بالاعتماد على مصنف بيرجي Holt *et al* ., (1994) و باستعمال الطرائق المتبعة من قبل Macfaddin , (2000) و Collee *et al*, (1996) باستعمال الاختبارات الكيموحيوية و المظهرية الآتية :

### 3-2-4-1 شكل النمو على وسط غراء الماكونكي

زرعت العزلة البكتيرية على وسط غراء الماكونكي بطريقة التخطيط وتمت الحضانة بدرجة 37مْ لمدة (24 - 48) ساعة وذلك لدراسة الخصائص المزرعية من شكل وحجم المستعمرات ولونها والقابلية على تخمير سكر اللاكتوز .

### 3-2-4-2 الفحص المجهري ( Microscopic Examination )

وذلك من خلال فحص استجابة العزلة البكتيرية لملون غرام ( Gram stain ) حيث تم أخذ جزء من مستعمرة مفردة نامية على وسط الغراء المغذي بواسطة عروة الناقل ثم عمل منها لطخة (Bacterial smear) ، بعدها تم تصبيغها بملون غرام من خلال فحصها بالمجهر الضوئي (Light microscope) وباستعمال العدسة الزيتية تم ملاحظة شكل ولون الخلايا البكتيرية .

### 3-2-4-3 اختبار النمو على وسط King (A)

زرعت العزلة البكتيرية على وسط King (A) بطريقة التخطيط والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-2-1-3 ) ، بعدها

تم الحضن بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة . إن تغير لون الوسط الى ( أخضر – مزرق ) دليل على ايجابية الاختبار .

## 3-2-4-4 اختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد ((Triple sugar iron test (TSI)

زرعت العزلة البكتيرية على السطح المائل لوسط ثلاثي السكر والحديد والمحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-4) بطريقة الطعن ثم التخطيط ، ثم حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37°م ، ولوحظت النتائج من خلال تغير لون الوسط في القعر والسطح المائل فضلاً عن تكون الفقاعات الهوائية أو تكوين الراسب الأسود الذي يدل على تولد غاز $H_2S$ .

## 3-2-4-5 اختبار فعالية أنزيم السايتوكروم اوكسيديز ( Cytochrome oxidase )

تم ترطيب ورقة الترشيح بقطرات من محلول الكاشف و المحضر حسب الفقرة ( 3-1-3-1-5 ) ، ثم نقلت المستعمرة البكتيرية النامية على وسط الغراء المغذي وبعمر 24 ساعة ، بواسطة أعواد خشبية معقمة ومزجت جيداً مع الكاشف ، إن ظهور اللون البنفسجي خلال ( 10 – 20 ) ثانية يعد نتيجة موجبة .

## 3-2-4-6 اختبار الكشف عن أنزيم الكاتاليز ( Catalase test )

تم نقل جزء من المستعمرة البكترية بواسطة الناقل الى سطح شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيف اليها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين 3% ، ان ظهور الفقاعات دليل على النتيجة الموجبة .

أن هذا الكشف يستعمل للتحري عن قابلية العزلة البكتيرية على إنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ الى أوكسجين وماء .

## 3-2-4-7 اختبار الحركة ( Motility Test )

لقح وسط الحركة المحضر وفقا للفقرة ( 3-1-2-6 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية بطريقة الطعن باستعمال الإبرة ، بعدها حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ، إن ظهور ضبابية حول منطقة الطعن يدل على قابلية البكتريا على الحركة .

## 3-2-4-8 اختبار الكشف عن أنزيم محلل اليوريا ( Urease test )

تم تلقيح وسط مائل اكار اليوريا ( Urea agar ) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-2-5 ) بالعزلة البكتيرية بطريقة الطعن ، ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، ان تغير لون الوسط من الأصفر الى الوردي يعد نتيجة موجبة تدل على قابلية البكتريا على إنتاج أنـزيم محلل اليوريا .

## 3-2-4-9 اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test )

تلقيح وسط غراء السترات سيمون Simmon's citrate agar والمحضر وفقا للفقرة ( 3-1-2-9 ) بالعزلة البكترية ، ثم حضنت بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ، إن تحول لون الوسط من الأخضر الى الأزرق يدل على ايجابية التفاعل .

## 3-2-4-10 اختبار الأندول ( Indole test )

تم تلقيح وسط ماء الببتون المحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-7 ) بالعزلة البكترية ، بعدها حضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين ( 24 - 96 ) ساعة ، وتم الاستدلال على النتائج بعد الحضن بإضافة قطرات من كاشف Kovac's reagent المحضر وفق الفقرة ( 3-1-3-1-2 ) ، إن ظهور الحلقة الحمراء في على الوسط إشارة الى ايجابية التفاعل .

## 3-2-4-11 اختبار المثيل الأحمر ( Methyl red test )

لقح وسط Vogas proskauer – Methyl red والمحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-8 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية ، ثم حضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين ( 24 - 48 ) ساعة ، بعد الحضن أضيفت قطرات من كاشف المثيل الأحمر والمحضر وفق الفقرة ( 3-1-3-1-3 ) ان تغير لون الوسط الى الأحمر يعد نتيجة موجبة .

## 3-2-4-12 اختبار فوكس بروسكاور ( Vogas – proskauer test )

لقح وسط ( MR – VP ) المحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-8 ) بالعزلة البكتيرية وبعد الحضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين ( 24 - 48 ) ساعة اضيف 1 مليلتر من هيدروكسيد الصوديوم 40 % و 3 مليلتر من α - naphthol مع الرج ، أن ظهور اللون الوردي الغامق هو نتيجة ايجابية .

## 3-3-4-13 اختبار تميع الجلاتين ( Gelatin liquification test )

لقح وسط الجلاتين المحضر وفقاً للفقرة (3-1-2-10 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية بطعن الوسط بالإبرة وبعد الحضن بدرجة حرارة 37 °م لمدة تتراوح بين 24 ساعة الى 7 أيام ، تم وضع الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة 4مْ لمدة 30 دقيقة ، يعد تحول الجلاتين من القوام الصلب الى السائل دليل على ايجابية الاختبار .

## 3-2-4-14 أختبار تخمر السكريات (Sugar fermentation test )

لقحت الأوساط المحضرة في الفقرة ( 3-1-2-11 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية ، وتم حضنها بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة . إن تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر مع أرتفاع أنبوبة درهم لأمتلائها بالهواء يعد نتيجة موجبة للاختبار .

## 3-2-4-15 استعمال نظام API 20E للعائلة المعوية (bio Merirux)

1- تم فتح حافظة الشريط والحاوية على العديد من الحفر ورطبت بإضافة 5 مليلتر من الماء المقطر الى تلك الحفر .

2- حضر العالق البكتيري وذلك بنقل 5 مستعمرات منفردة من وسط غراء الماكونكي ومزجت بصورة جيدة بإضافتها الى 5 مليلتر من محلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم ثم رجت بصورة جيدة حتى أصبح المحلول عكراً .

3- بواسطة ماصة باستور نظفية والمعقمة تم تلقيح الشريط وذلك بملء الجزء السفلي Tube والجزء العلوي Cupule بالعالق البكتيري لكل من أنابيب VP , GEL , CIT ولجعل الظروف لاهوائية ملئ الجزء السفلي فقط لكل من الأنابيب ADH , $H_2S$ , URE , LDC , ODC في حين ملء الجزء العلوي بزيت البارافين السائل والمعقم .

4- تم إغلاق الحافظة بعد وضع الشريط بداخلها وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين ( 24 - 48 ) ساعة .

بعد الحضن سجلت النتائج للأنابيب بصورة مباشرة باستثناء الأنابيب التالية والتي يضاف اليها الكواشف :

أ - قطرة من كاشف كوفاكس الى أنبوبة IND

ب - قطرة من كاشف TDA الى أنبوبة TDA

جـ - قطرة من كاشف $VP_1$ ثم قطرة من كاشف $VP_2$ مباشرة الى أنبوبة VP مع الانتظار لمدة 10 دقائق تقريباً .

سجلت النتائج حسب تعليمات الشركة المجهزة وصولاً الى رقم مكون من سبعة أرقام ، و بعد ذلك تم البحث عنه في الدليل المرفق لنظام API 20E والذي يعطي أسم النوع البكتيري .

## 3-2-5 استخلاص عديد السكريد الشحمي الخام

## Extraction of Crude Lipoplysaccharide

### 3-2-5-1 جمع الخلايا البكتيرية وتجفيفها .

حضر ( 10 ) لتر من مرق نقيع القلب والدماغ ( Brain heart infusion broth) ، في دوارق زجاجية بسعة 1 لترو بواقع 500 مليلتر لكل دورق زجاجي ، بعد تعقيمها بالمؤصدة تم تبريدها ثم لقح كل دورق بـ 5 ملليتر من عالق الخلايا البكتيرية والفتية الذي تم تنميته في مرق نقيع القلب والدماغ . حُضنت الدوارق في حاضنة هزازة وبسرعة 100 هزة / دقيقة وبدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين (24-48) ساعة ، و بعملية النبذ المركزي وبسرعة 3000 دورة / دقيقة جمعت الخلايا البكتيرية ثم غسلت ثلاث مرات بدارئ الفوسفات الملحي( PBS ) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2 - أولاً) ، بعدها تم تعليق الخلايا البكتيرية بمحلول رقم(2) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2-ثانياً ) مدة 18 ساعة ورسبت مرة أخرى بعملية النبذ المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة ثم غسلت بالمحلول نفسه مرتين ، جففت الخلايا البكتيرية المرسبة و ذلك بإضافة الأسيتون وبواقع 10 مرات بقدر حجم الخلايا الناتجة عن الترسيب ، وبعد عملية التجفيف تم حساب الوزن الجاف لها ، ( 1976 ) , Johnson and Perry .

### 3-2-5-2 الهضم الأنزيمي للخلايا البكتيرية Enzymatic digestion

على وفق طريقة ( 1976 ) , Johnson and Perry تم تكسير الخلايا البكتيرية بعملية الهضم الإنزيمي حيث تم استخدام دورق زجاجي نظيف ومعقم علق فيه 5 غم من الخلايا البكتيرية المجففة بالأستون في 50 مليلتر من محلول رقم (3) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2- ثالثاً ) ، تم وضع الدورق الزجاجي على جهاز المحرك المغناطيسي بالسرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة ، ثم أضيف 0.1 غم من أنزيم اللايسوزايم ( Lysozyme) ثم أعيد الدورق الحاوي على العالق البكتيري مرة أخرى الى المحرك المغناطيسي ، وتحت ظروف درجة حرارية 4°م ولمدة 16 ساعة ، بعدها أخذ العالق و وضع بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 20 دقيقة ، و تم أعادته مرة أخرى الى جهاز المحرك المغناطيسي وبالسرعة القصوى لمدة 3 دقائق ولكن في هذه المرة وضع العالق في دورق زجاجي نظيف يفوق حجم العالق بخمس مرات مع أكمال حجم العالق الى 100 مليلتر وذلك بإضافة

محلول رقم ( 4 ) المحضر وفق الفقرة ( 3-1-3-2 - رابعاً) ، بعدها حضن العالق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 10 دقائق أخرى .

## 3-5-2-3 عملية الاستخلاص

تم اعتماد طريقة ( 1952 ) ., Westphal *et al* واستناداً لما ذكره ( 1976 ) , Johnson and perry ، تم أخذ العالق البكتيري الذي تم الحصول عليه من عملية الهضم الأنزيمي ومزجه بصورة جيدة بوضعه على جهاز المحرك المغناطيسي بالسرعة القصوى لمدة 3 دقائق ، ثم سخن الى درجة حرارة 70مْ وأضيف له حجم مساوٍ من محلول الفينول 95 % والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2- خامساً) الساخن بدرجة حرارة 70 مْ ووضع على المحرك المغناطيسي لمدة 15 دقيقة ، وبعد هذه المرحلة تم تبريده مباشرة الى 5 °م وذلك بوضعه في الحمام الثلجي مع استمرارية التحريك على جهاز المحرك المغناطيسي . بعدها تم النبذ المركزي وذلك باستخدام المنبذة المبردة فائقة السرعة (High speed cooling centrifuge) وبسرعة دوران مقدارها 10000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة وبانتهاء هذه المرحلة تم الحصول على الأطوار الآتية وبترتيب من الأعلى الى الأسفل .

1- الطور المائي ( Aqueous Phase ) .

2- الطور البيني ( Inter Phase ) .

3- الطور الفينولي ( Phenolic Phase ) .

4- الراسب ( Sediment ) .

سحب كل من الطورين المائي والفينولي كل على حدة باستعمال ماصة باستور معقمة ، ثم جمع الطور المائي من كل أنابيب النبذ المركزي في وعاء نظيف ومعقم مع إهمال الطور الفينولي ، أما ما تبقى في أنابيب النبذ المركزي فأعيد تعليقه بواقع 3 مرات بقدر حجمه من الماء المقطر، ووضع على المحرك المغناطيسي بوجود الحمام الثلجي ولمدة 5 دقائق بعدها أعيد النبذ المركزي بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة .

بعد انتهاء هذه المرحلة وتحصيل الطور المائي مرة أخرى وأضافته الى ما تم جمعه مسبقاً من الطور المائي ، أجريت عملية الديلزة مقابل الماء بدرجة حرارة 4 مْ ولمدة 4 أيام ولحين اختفاء رائحة الفينول ، إذ أستعمل في اليوم الأول من الديلزة ماء الحنفية وبعدها أستخدم الماء المقطر ، ثم جفف المستخلص وحفظ لحين الاستعمال .

## 6-2-3 التحليل الكيميائي لعديد السكريد الشحمي الخام

### 1-6-2-3 تقدير كمية الكاربوهيدرات الكلية .

لتقدير كمية الكاربوهيدرات الكلية في عديد السكريد الشحمي الخام تم اعتماد طريقة Dubois *et al* . , (1956) وكما يلي :

**اولاً : المنحي القياسي لسكر الكلوكوز ( Standard curve of glucose )**

حضرت تراكيز مختلفة لسكر الكلوكوز وذلك بخلط حجوم من المحلول رقم ( 1 ) والمحضر وفقاً للفقرة (3-1-3-3- أولاً ) مع الماء المقطر في أنابيب زجاجية نظيفة وجافة وكما هو موضح في الجدول ( 3 – 1 ) :

**جدول ( 3-1 ) تراكيز سكر الكلوكوز المستخدمة في تحضير المنحنى القياسي للكلوكوز**

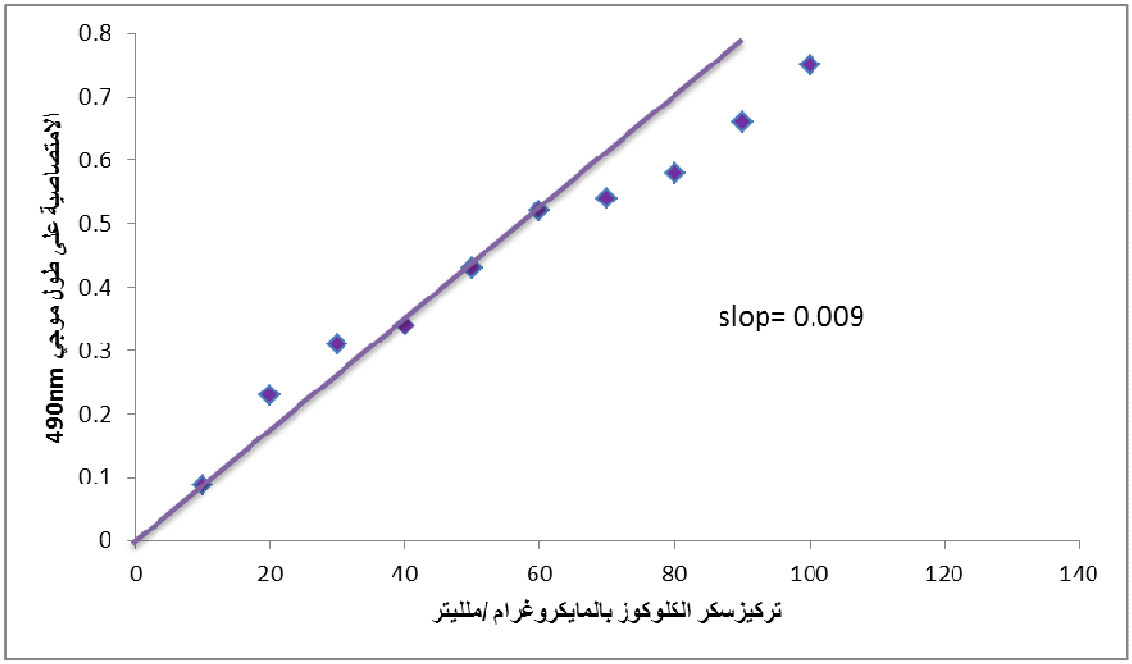
| رقم الانبوبة | حجم المحلول رقم ( 1 ) بالمليلتر | حجم الماء المقطر بالمليلتر | الحجم النهائي بالمليلتر | تركيز سكر الكلوكوز بالمايكروغرام / مليلتر |
|---|---|---|---|---|
| 1 | **0** | **1** | **1** | **0** |
| 2 | **0.1** | **0.9** | **1** | **10** |
| 3 | **0.2** | **0.8** | **1** | **20** |
| 4 | **0.3** | **0.7** | **1** | **30** |
| 5 | **0.4** | **0.6** | **1** | **40** |
| 6 | **0.5** | **0.5** | **1** | **50** |
| 7 | **0.6** | **0.4** | **1** | **60** |
| 8 | **0.7** | **0.3** | **1** | **70** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 80 | 1 | 0.2 | 0.8 | 9 |
| 90 | 1 | 0.1 | 0.9 | 10 |
| 100 | 1 | 0 | 1 | 11 |

أضيف ( 1 ) مليلتر من محلول رقم ( 2 ) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-3- ثانياً ) الى كل أنبوبة مع الرج الجيد للأنابيب ، بعدها تمت إضافة 5 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز ورجت الأنابيب بصورة جيدة ، ثم تركت لتبرد بدرجة حرارة الغرفة ، و تم قراءة الكثـــافة البصرية وعلى طول موجي 490 نانـوميتر مع استخدام الأنبوبة رقم ( 1 ) لتصفير جهاز المطياف الضوئي و للحصول على المنحني القياسي لسكر الكلوكوز ، ثم رسمت العلاقة البيانية .

$$\text{الميل} \quad \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

و قد أستعمل الميل لحساب تركيز الكاربوهيدرات الكلية لنموذج عديد السكريد الشحمي الخام .



**شكل (3-1) المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز**

**ثانياً : تقدير كمية الكاربوهيدرات الكلية لنماذج عديد السكريد الشحمي الخام**

اضيف 1 مليلتر من محلول رقم (2) والمحضر وفقاً للفقرة (3-1-3-3- ثانياً) و 5 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز الى 1 ملليتر من نموذج عديد السكر الشحمي الخام وتم قراءة الامتصاصية بالطول الموجي نفسه ، ثم تم حساب تركيز الكاربوهيدرات في النموذج و العلاقة الآتية :

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

## 3-2-6-2 تقدير كمية البروتينات في عديد السكريد الشحمي الخام

تم اعتماد طريقة Bradford *et al*.,( 1976) في تقدير البروتينات في عديد السكريد الشحمي وكما يأتي :

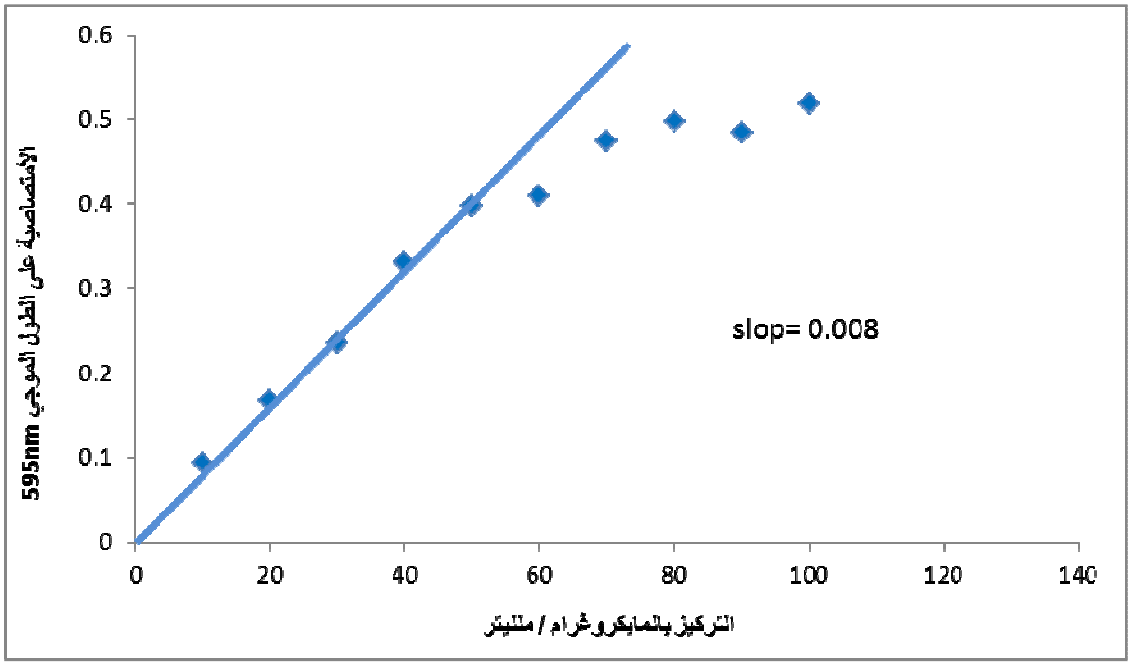
**أولاً : المنحي القياسي لبروتين المصل البقري( Standard curve of bovin serum almumin)**

حضرت تراكيز مختلفة من بروتين ألبومين المصل البقري وذلك بمزج حجوم من محلول رقم (1) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-4- أولاً ) مع الماء المقطر وكما موضح في الجدول (3-2)

جدول ( 3-2 ) تراكيز البومين المصل البقري المستخدمة في تحضير المنحنى القياسي

| رقم الانبوبة | حجم المحلول رقم ( 1 ) بالمليلتر | حجم الماء المقطر بالمليلتر | الحجم النهائي بالمليلتر | تركيز الألبومين بالمايكروغرام / مليلتر |
|---|---|---|---|---|
| 1 | **0** | **1** | **1** | **0** |
| 2 | **0.1** | **0.9** | **1** | **10** |
| 3 | **0.2** | **0.8** | **1** | **20** |
| 4 | **0.3** | **0.7** | **1** | **30** |
| 5 | **0.4** | **0.6** | **1** | **40** |
| 6 | **0.5** | **0.5** | **1** | **50** |
| 7 | **0.6** | **0.4** | **1** | **60** |
| 8 | **0.7** | **0.3** | **1** | **70** |
| 9 | **0.8** | **0.2** | **1** | **80** |
| 10 | **0.9** | **0.1** | **1** | **90** |
| 11 | **1** | **0** | **1** | **100** |

أضيف 2.5 مليلتر من محلول رقم (2) الى 500 مايكروليتر من كل تركيز ، بعدها مزج الخليط جيداً وترك لمدة 5 دقائق ، قرأت بعد ذلك الامتصاصية على الطول الموجي 595 نانوميتر ، ولعمل المنحي القياسي رسمت العلاقة البيانية بين الامتصاصية وتركيز البروتين ، ثم استخرج الميل وفق العلاقة الموضحة في الفقرة ( 3-2-5-1 أولاً) سابقاً .




**شكل (3-2) المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري**

**ثانياً : قياس تركيز البروتين في نموذج عديد السكريد الشحمي الخام .**

اضيف 2.5 مليلتر من محلول رقم (2) والمحضر وفقا للفقرة ( 3-1-3-4- ثانياً ) الى 500 ماكروليتر من نموذج عديد السكرد الشحمي الخام ، وتم قراءة الامتصاصية على بالطـول الموجي نفسه ، ثم تم حساب تركيز البروتين في النموذج وفق العلاقة التالية :

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

## 3-2-7 تحديد الجرعة المهلكة الكلية ( $LD_{100}$ ) لعديد السكريد الشحمي الخام المستخلص من بكتريا *P. aeruginosa*

حضرت التراكيز ( 50 , 75 , 100 , 125 , 150 , 175 ,200 ) مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عديد السكريد الشحمي الخام ، ثم حقن 0.5 مليلتر من كل تركيز وبواقع 4 فئران للتركيز الواحد داخل البريتون ، أما مجموعة السيطرة فحقنت بدارئ الفوسفات الملحي ( PBS) وبواقع 4 فئران أيضاً . وبعد مرور 5 أيام ، تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل مجموعة على حدة ومن خلال ذلك تم تحديد الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ للنموذج الخام وفقاً لـ ( Reed and Muench , (1938 كذلك تم حساب الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ و معرفة الجرعة الممرضة لعديد السكريد الشحمي الخام.

## 3-2-8 دراسة التأثيرات المرضية في الفئران المحقونة بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام

و تضمنت الآتي :

### 3-2-8-1 التغيرات الظاهرية الملحوظة على الفئران المصابة وأعضائها .

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 كذلك تم سحب الدم من الفئران قبل تشريحها لغرض حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض .

## 3-2-8-2 دراسة التغيرات المرضية النسيجية لاعضاء الفئران .

درست التغيرات المرضية في أنسجة كل من ( الكبد و الطحال ) بعد مضي 72 ساعة من الحقن بواسطة تثبيت وتقطيع الأعضاء الى شرائح نسيجية و تصبيغها ، وقد أجريت هذه الخطوات في مستشفى الحسين (ع) العام ومستشفى الكوفة في النجف الأشراف وكما يأتي :

أ- **التثبيت والتقطيع**

اعتمدت طريقة ( 1972 ) , Humason و كالآتي :

- التثبيت ( Fixation ) :

تم استخدام الفورمالين 10 % والمحضر وفقا للفقرة ( 3-1-3-6 - أ) في تثبيت الأعضاء المنتخبة من الفئران .

- الغسل ( Washing ) :

للتخلص من الفورمالين ، تم غسل الأعضاء بماء الحنفية .

- الانكاز ( Dehydration ) :

حضرت تراكيز تصاعدية من الكحول الأثيلي (90,80,70,50) % ، بعدها تم تمرير الأعضاء بهذه السلسلة من التراكيز ولمدة ساعتين لكل تركيز ، وأجريت هذه العملية لسحب الماء من الأعضاء .

- الترويق ( Clearing ) :

أستعمل الزايلول ومن ثم الكحولات المتدرجة لهذا الغرض .

- التشريب ( Infiltration ) :

تم وضع الأعضاء في شمع البارافين لعمل قوالب شمعية .

- التشذيب والتقطيع ( Trimming and Sectioning )

باستعمال شفرات حادة ، تم تشذيب قوالب الشمع الحاوية على الأعضاء ، بعدها قطعت باستعمال جهاز المشراح ( Microtome ) . اذ تم التقطيع بسمك 6 مايكروميتر ثم نقلت المقاطع الى شرائح زجاجية و ثبتت عليها بمادة لاصقة ألبومين ماير Mayer's albumine ، ثم وضعت على صفيحة ساخنة ( Hot plate ) بدرجة حرارة 37 °م .

ب- **التصبيغ ( Staining )**

تم اعتماد طريقة ( Drury and Wallington, (1980 ، حيث أستعملت كل من صبغة اليهاتوكسيلين والأيوسين لتصبيغ الشرائح المحملة بالمقاطع وكما يأتي :

- أستخدم الزايلول لإزالة الشمع من الشرائح .
- مررت الشرائح بسلسلة متدرجة تنازلية من الكحولات ( 80 - 50 ) % وبواقع دقيقة لكل محلول .
- وضعت الشرائح في ماء الحنفية عدة دقائق .
- وضعت الشرائح في اليهماتوكسلين لمدة دقيقة ونصف .
- كحول محمض حتى يصبح اللون ورديا .
- ماء حنفية جارٍ .
- ماء مقطر .
- وضعت الشرائح في الايوسين لمدة دقيقة .
- غسلت الشرائح بالماء المقطر .
- مررت الشرائح في سلسلة من التراكيز الكحولية التصاعدية ( 50 – 80 )% ولمدة دقيقتين لكل تركيز .
- تم نقل الشرائح الى كحول مطلق لمدة 5 دقائق لتجفيفها .
- أستخدم الزايلول لترويق الشرائح لمدة دقيقة .
- وضعت مادة كندا بلسم على المقطع النسيجي ثم غطي بغطاء الشريحة .
- أستخدم المجهر الضوئي لفحص ودراسة التغيرات النسيجية الحاصلة في أعضاء الفئران .

## 3-2-9 تحديد الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص النباتي ضد الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ من عديد السكريد الشحمي الخام

حضرت التراكيز ( 5-10-15-20 ) ملغم/0.5 مليلترلمستخلص الشاي الأخضر المائي و تم أعطائه

للفئران عن طريق التجريع . وكذلك حضرت نفس التراكيز السابقة للمستخلص الكحولي نفسه و الذي تم أعطائه أيضاً للفئران عن طريق الحقن داخل البريتون (Intraperitoneal) ، وبهذا قسمت الفئران الى

مجموعتين :

- **المجموعة الاولى :**

تم تجريع فئرانها بالتراكيز ( 20,15,10,5) ملغم / 0.5 مليلترمن المستخلص المائي لكل فأرة وبواقع 4 فئران للتركيز الواحد ، الانتظار لمدة ساعتين بعدها حقنت الفئران داخل البريتون بالجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ لعديد السكريد الشحمي المحضر في 0.5 مليلتر/فأرة .

- **المجموعة الثانية :**

حقنت فئرانها بالمستخلص الكحولي داخل البريتون و بتراكيز المستخلص المائي نفسه بواقع 4 فئران للتركيز الواحد أيضاً وبعد نصف ساعة حقنت داخل البريتون بالجرعة المهلكة الكـلية لعديد السـكريد الشحمي أيضاً .

ولغرض تحديد الجرعة الوقائية للمستخلصات النباتية تجاه الجرعة المهلكة $LD_{100}$ لعديد السكريد الشحمي ، تم حساب عدد الفئران الحية والميتة بعد مرور ثلاثة أيام مع الأخذ بنظر الاعتبار مجموعة السيطرة المحقونة بالدارئ الفسلجي .

## 3-2-10 دراسة تأثير الجرعة الوقائية المثلى من نبات الشاي الأخضر في أمراضية عديد السكريد الشحمي الخام للفئران

بعد تحديد الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص المائي و الكحولي من نبات الشاي الأخضر ضد الجرعة المهلكة الكلية من عديد السكريد الشحمي الخام ، تم أجراء التجربة المبينة تفاصيلها في الجدول( 3-3) لغرض دراسة تأثير الجرعة الوقائية المثلى من نبات الشاي الأخضر ضد أمراضية عديد السكريد الشحمي في الفئران.

**جدول (3-3) معاملة الفئران بالجرعة الوقائية المثلى من نبات الشاي الأخضر و الجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام**

| رقم المجموعة | عدد الفئران | المعاملة |
|---|---|---|
| 1 | 4 | جرعت الفئران بالجرعة الوقائية المثلى من المستخلص المائي و بعد ساعتين حقنت بالبريتون بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام . |
| 2 | 4 | حقنت الفئران في البريتون بالجرعة الوقائية المثلى من المستخلص الكحولي و بعد نصف ساعة حقنت بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام في البريتون أيضاً. |
| 3 | 4 | عوملت الفئران بالمستخلص المائي كما في المجموعة رقم (1) أعلاه ثم حقنت بالدارئ الفسلجي بعد ساعتين . |
| 4 | 4 | عوملت الفئران بالمستخلص الكحولي كما في المجموعة رقم (2) أعلاه ثم حقنت بالدارئ الفسلجي بعد نصف ساعة . |

استخدمت المجموعتين 3 و 4 كسيطرة للتجربة لمعرفة تأثير المستخلص المائي و الكحولـــي على أجسام الفئران ، و بعد مرور ثلاثة أيام تم تخدير الفئران و سحب منها الدم ووضع في أنابيب خاصة حاوية على مانع للتخثر ، إذ أستعمل لحساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض .

وكذلك درست التغيرات الظاهرية و النسيجية لأعضاء الفئران بالمقارنة مع فئران السيطرة المحقونة بالدارئ الفسلجي كما في الفقرة (3-2-8) أعلاه

### 3-2-11 العد الكلي لخلايا الدم البيض WBCs Count

سحب 20 مايكروليتر من الدم والذي أضيف الى محلول التخفيف المحضر وفق الفقرة (3-1-3-5) في أنبوبة نظيفة وتركت الأنبوبة لمدة 5 دقائق ، ثم تم نقل قطرة منه الى شريحة العد (Haemocytometer)

وتركت لمدة ( 1–2 ) دقيقة لضمان استقرار الخلايا على سطح شريحة العد ، وتم حساب خلايا الدم البيض باستعمال المجهر الضوئي على القُوة (40 X) وذلك بحساب الخلايا في المربعات الأربعة الجانبية الكبرى والذي يحوي فيها المربع الواحد على 16 مربع أخـــر صغير .

## 12-2-3 التصميم والتحليل الإحصائي

أتبع في تصميم التجربة التصميم العشوائي التام ( Completely Randomized Design C.D.R )) وبأربعة مكررات . و أستعمل اختبار L.S.D على مستوى احتمال 0.05 لمقارنة المتوسطات بين المعاملات . (الراوي و خلف الله , 1980) .كما أستعمل أيضاً اختبار T على مستوى احتمال 0.001 لمقارنة المتوسطات بين المعاملات .

# الفصل الثالث

## 3 - المواد وطرائق العمل Materials and Methods

### 1-3 المواد Material

#### 1-1-3 المواد الكيمـــاوية المستخدمـــة :

| الشركة/المنشأ | المادة |
|---|---|
| BDH(England) | $\alpha$ - naphtol الألفانفثول |
| BDH(England) | Ethylenediamintetraaceticacid (EDTA) |
| BDH(England) | Urea اليوريا |
| BDH(England) | Phenol red أحمر الفينول |
| BDH(England) | Methyl red أحمر المثيل |
| BDH(England) | Sodium azide($NaN_3$) أزايد الصوديوم |
| Sigma- Aldrich | Lysozyme أنزيم اللايسوزايم |
| BDH(England) | Iodine الأيودين |
| BDH(England) | Pepton ببتون |
| BDH(England) | Crystal violet البنفسج البلوري |
| Himedia(India) | Bovine Serum albumin البومين المصل البقري |
| Fluka (Switzerland) | Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) بيروكسيد الهيدروجين |
| Fluka (Switzerland) | Glacial acetic acid حامض الخليك الثلجي |
| BDH(England) | Sulphonic acid ($H_2SO_4$) حامض الكبريتك |
| Fluka (Switzerland) | Safranin stain سفرانين |
| الشركة/المنشأ | المادة |

| | | |
|---|---|---|
| BDH(England) | Glucose | سكرالكلوكوز |
| Fluka (Switzerland) | Methylene blue | صبغة المثلين الأزرق |
| Sigma- Aldrich | Comasie blue | صبغة كومـازي الزرقـــاء |
| BDH(England) | Formalin | فورمالين |
| BDH(England) | Dipotassium hydrogen phosphate($K_2HPO_4$) | فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين |
| BDH(England) | Dipotassium hydrogen phosphate($KH_2PO_4$) | فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين |
| BDH(England) | Phenol($C_6H_5OH$) | الفينول |
| Fluka (Switzerland) | N,N,N,NTetramethyl– p–pheylene diaminedihydrochloride | كاشف الأوكسيديز |
| BDH(England) | P-Dimethylaminobenzaldehyde | كاشف الكوفاك |
| BDH(England) | Potassium sulfate ($K_2SO_4$) | كبريتات البوتاسيوم |
| Ajax (Autralia) | Ethanol | كحول أثيلي |
| Ajax (Autralia) | Isoamyl alcohol | الكحول الأيزوأميلي |
| BDH(England) | Sodium chloride (NaCl) | كلوريد الصوديوم |
| BDH(England) | Magnesium chloride ($MgCl_2$) | كلوريد المغنيسيوم |
| BDH(England) | Glycerol | كليسيرول |
| BDH(England) | Potassium hydroxid (KOH) | هيدروكسيد البوتاسيوم |
| Fluka (Switzerland) | Potassium iodid | يوديد البوتاسيوم |

## 3-1-2 الاجهزة المستخدمة

استخدمت الاجهزة الاتية :

| الشركة/ المنشأ | اسم الجهاز |
|---|---|
| Mauritius- Germany | pH meter جهاز قياس الرقم الهيدروجيني |
| Termaks-stockholm | Incubator حاضنة |
| Labtech – Korea | Shaking incubator حاضنة هزازة |
| Julabo SW23-Germany | Shaker water bath حمام مائي هزاز |
| Denka – Korea | Blender طاحونة كهربائية |
| Memmert – Germany | Electrical oven فرن حراري كهربائي |
| YX-280 B – china | Autoclave مؤصدة |
| Kenwoodchef-Germany | Vortex mixer مازج مغناطيسي |
| Motic - Germany | Light microscope مجهر ضوئي |
| Labtech – Korea | Magnatic stirrer hot plate محرك مغناطيسي ذو الصفيحة الساخنة |
| American optical co. | Microtome المشراح |
| Tudor – Korea | Specterophotometer مطياف ضوئي |
| Hettich – Germany | Centrifuge منبذة |
| Hettich – Germany | Heigh speed cooling centrifuge منبذة مبردة عالية السرعة |
| Sartorius – Germany | Sensitive balance ميزان حساس |

## 3-1-3 الأوساط الزراعية Culture media تـم

تعقيم الأوساط الـزراعية بالمؤصـدة بدرجـة حـرارة 121°م تحت ضغط 15 باوند / انج ² ولمدة 15 دقيقة .

### 1-3-1-3 : وسط غراء الماكونكي ( MacConkey agar ) ( Himedia )

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، حضر الوسط وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد الى درجة حرارة 50°م وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ، استعمل هذا الوسط لاختبار القابلية على تخمير سكر اللاكتوز .

### 2-3-1-3 وسط الغراء المغذي ( Nutrient agar ) ( Himedia)

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ،حضر الوسط وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد الى درجة حرارة 50 °م ، بعدها صب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ، استعمل هذا الوسط لتنمية العزلة البكتيرية ، ودراسة خصائصها المظهرية .

### 3-3-1-3 وسط ( King A )

حضر بإذابة 20غم من الببتون (Difco ) ، 10 مل من الـ كليسيرول ، 1.4 غم من $MgCl_2$ ، 10 غم من $K_2SO_4$ و15 غم من الأكار في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الى لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة ، بعدها ترك ليبرد الى 50°م ثم صب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ، استعمل الوسط لأختبار قابلية العزلة البكتيرية على إنتاج مـادة البايوسيانين (Pyocyanin) .

### 4-3-1-3 وسط غراء ثلاثي السكر والحديد ( Tripl sugar iron agar ) ( Oxoid )

حضر الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، ثم وزع في أنابيب زجاجية نظيفة وبواقع 5 مليلتر لكل أنبوبة ، وبعدها عقمت الأنابيب بالمؤصدة و بعد التعقيم وضعت الأنابيب بصورة مائلة لتتصلب وحفظت بدرجة حرارة 4°م حتى الأستعمال .أستعمل هذا الوسط للتحري عن القابلية على تخمير سكر الكلوكوز واللاكتوز والسكروز وكذلك إنتاج غازي كبريتيد الهيدروجين $H_2S$ و ثاني أوكسيد الكاربون $CO_2$ .

### 3-1-3-5 وسط غراء اليوريا ( Urea agar )

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، تم تحضير 950 مليلتر وسط غراء اليوريا الأساسي (Urea agar base) (Oxoid) ثم عقم بالمؤصدة و ترك ليبرد الى درجة حرارة 45 مْ ، ثم تم إضافة 50 مليلتر من محلول اليوريا ( 40% ) المعقم بالترشيح ، بعدها تم صب الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة وبواقع 5 مليلتر لكل أنبوبة وتركت أنابيب بصورة مائلة للتصلب .استعمل الوسط للكشف عن قابلية العزلة البكتيرية على إنتاج أنزيم اليوريز ( Urease ) الذي يحلل اليوريا الى أمونيا و ثاني أوكسيد الكاربون .

### 3-1-3-6 وسط الحركة ( Motility medium )

حضر وسط المرق المغذي وفق تعليمات الشركة المجهزة ( Himedia ) وأضيفت اليه الأكار( Agar- agar ) (Oxoid ) بنسبة (0.4%) و وزع في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مليلتر لكل أنبوبة ، عقم بعدها بالمؤصدة وترك ليتصلب بشكل عمودي ، أستخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية الحركة للعزلة البكتيرية .

### 3-1-3-7 وسط ماء الببتون ( Indol production medium )

حضر بإذابة 20 غم من الببتون و 5 غم من NaCl في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الى لتر من الماء المقطر، و ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ووزع في أنابيب زجاجية نظيفة وعقم بالمؤصدة ، استعمل الوسط للتحري عن إنتاج الأندول من قبل العزلة البكتيرية .

### 3-1-3-8 وسط أحمر المثيل – فوكس بروسكور

### (Oxoid) ( Methyl red – Vogas prosKauer medium)

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة تم تحضير هذا الوسط ووزع في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة ، ثم عقم بالمؤصدة ، هذا الوسط استعمل للتحري عن قابلية العزلة البكتيرية على تخمير السكر بمسلك الحوامض الخليطة ( Mixed acid fermentat ) وإنتاج الاسيتوين ( Acetoin ) .

### 3-1-3-9 وسط غراء سترات سيمون ( Simmnon،s citrate agar ) (Oxoid )

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، حضر الوسط و وزع في أنابيب زجاجية نظيفة وبواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة ، وعقم بالمؤصدة وتركت الأنابيب بعدها لتبرد بصورة مائلة ، استعمل الوسط للكشف عن قابلية العزلة البكتيرية على استخدام السترات كمصدر وحيد للكاربون .

### 3-1-3-10 وسط الجلاتين ( Gelatine medium )

حضر هذا الوسط وفقاً لـ Macfaddin, (2000) وذلك بإذابة الجلاتين ( BDH ) في الماء المقطر بتركيز 12% وترك بعدها لمدة ( 15 – 30 ) دقيقة من ثم سخن على درجة حرارة 50 °م لإذابة الجلاتين كلياً ، تمت بعدها إضافة خلاصة لحم البقر ( Beef extract ) بتركيز 0.3% والببتون بتركيز 0.5% وسخن مرة أخرى على ( 50 °م) ، بعد ذلك وزع الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة ، عقمت بالمؤصدة وتركت الأنابيب لتصلب الوسط بشكل عمودي ، استخدم الوسط للتحري عن إنتاج أنزيم حال الجلاتين ( Gelatinase ) .

### 3-1-3-11 وسط تخمر السكريات (Sugar fermetation medium )

وفقاً لـ ( 2000 ) ، Macfaddin حضر الوسط بإذابة ( 10, 5 ,0.08 )غم من الببتون (Difco) وكلوريد الصوديوم Nacl (BDH) وأحمر الفنيول (BDH) على التوالي في كمية من الماء المقطر ، بعدها تم أكمال الحجم الى 500 مليلتر بالماء المقطر بعد ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ووزع الوسط في أنابيب زجاجية بواقع 5 ملليتر لكل أنبوبة مع وضع أنبوبة درهم ( Derhum tube ) مقلوبة ، ثم عقمت الأنابيب بالمؤصدة وبعد ذلك تركت لتبرد واضيفت لها السكريات المعقمة وبتركيز 1% .

### 3-1-3-12 مرق نقيع القلب والدماغ ( Brain heart infusion broth ) (Difco )

حضر الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، وتم توزيعه في أوعية نظيفة مختلفة الأحجام وحسب الحاجة وعقم الوسط بالمؤصدة ، استعمل الوسط كمنشط لنمو البكتريا .

## 3-1-4 الكواشف و المحاليل Indicators and Reagents

### 3-1-4-1 الكواشف

#### 3-1-4-1-1 محاليل ملون غرام ( Gram،s stain )

تم تحضير الصبغة وفقاً لـ (Talib , 1996 ) :

**أ- صبغة البنفسج البلوري ( Crystal violete)**

محلول A : تم إذابة 2 غم من مسحوق الصبغة في 20 ملیلترمن الكحول الأثيلي 95%.

محلول B : 0.5 غم من أوكزالات الأمونيوم ، ويخلط المحلولين حتى التجانس ، ثم رشح المحلول بورق الترشيح (Whattman) مرتين وحفظت في قناني زجـــاجية معتمة ونظيفة .

**ب- صبغة السفرانين ( Safranin )**

حضرت بإذابـة 0.25 غم من مسحوق الصبغة في 10 ملیلتر مـن الكحول الأثيلي 95% ويضاف له 100 ملیلترمن الماء المقطر، و رشحت بورق الترشيح (Whattman) و حفظت في قناني زجاجية معتمة ونظيفة .

**جـ - مثبت الأيودين ( Mordant iodine )**

حضر بمزج 1 غم من حبيبات الأيودين مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم مع الطحن الجيد وأذيب الخليط في 20 ملیلتر من الماء المقطر بعدها تم أكمال الحجم الى 300 ملیلتر بالماء المقطر .

**د- محلول القصر ( Decolorizer )**

تم استعمال الكحول الأثيلي بتـركـيز 95% لإزالــة الصبغـة .

#### 3-1-4-1-2 كاشف كوفاكس ( Kovac،s Reagent)

حضـر هـذا الكـاشـف بإذابــة 5 غم من (P- Dimethylaminobenzaldehyde) في 75 مـليلتـر من الكحول الأيزواميلي (Isoamyl alcohol) واضيف لهما ببطء 25 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك (37%) ، ( Macfaddin , 2000) .

### 3-1-4-1-3 كاشف أحمر المثيل (Methyl – Red Reagent)

حضر هذا الكاشف بإذابة 0.01 غم من مسحوق أحمر المثيل في 30 مليلتر من 95% كحول أثيـلي Ethanol ، و تم أكـمال الحجم الى 50 مليلتر بـــاستخدام المـاء المقـطر ، (Macfaddin , 2000) .

### 4-1-4-1-3 كاشف باريت (Barrit's indicator)

وفقاً لما جاء في Macfaddin , (2000) حضر من محلولين :

الاول : محلـول هيدروكسيد البـوتاسـيوم 40% ، والذي حضر بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مليلتر من الماء المقطر .

الثاني : حضر هذا المحلول آنياً ، وذلك بإذابة 0.05 غم من مسحوق الالفا نـفثـول ( $\alpha$ - naphtol) في 100 مليلتر في 95% كحـول أثيـلي .

### 5-1-4-1-3 كاشف أنزيم السايتوكروم اوكسيديز( Cytochrome oxidase indicator)

حضر الكاشف بإذابة 1 غم من مسحوق N,N,N,NTetramethyl– p–pheylene diamine dihydrochloride في 100 مليلتر من الماء المقطر وحفظ في قنينة زجاجية معتمة .

### 6-1-4-1-3 كاشف أنزيم الكاتاليز (Catalase indicator)

أستعمل محلول بيروكسيد الهيدروجين ($H_2O_2$) بتركيز 3% .

### 3-1-4-2 المحاليل المستعملة في استخلاص عديد السكريد الشحمي LPS الخام من الخلايا البكتيرية .

أولاً- محلول رقم ( 1 ) :

دارئ الفوسفات الملحي ( Phosphate buffered saline) : حضرعلى وفق بير وجماعته (1978) و Pier *et al.* ويتكون من :

| | | |
|---|---|---|
| كلوريد الصوديوم | NaCl (BDH) | 8غم |
| فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين | $K_2HPO_4$ (BDH) | 1.21غم |
| فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين | $KH_2PO_4$ (BDH) | 0.34 غم |

تم إذابة المواد أعلاه في لتر من الماء المقطر مع ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ، ثم عقم بالمؤصدة .

ثانياً - محلول رقم (2 ) :

دارئ الفوسفات الملحي والمضاف له 0.5% من الفورمالين (Formalin) ذو التركيز 30% : حضر بإضافة 5 مليلتر من الفورمالين الى لترتقريباً من محلول رقم (1) .

ثالثاً - محلول رقم (3) :

هو (0.05) مولاري دارئ فوسفات الصوديوم ذو الرقم الهيدروجيني (7) : مضافا اليه (0.05) مولاري EDTA و 0.05% أزايد الصوديوم ( Sodium azide) . اذ حضر هذا المحلول بإذابة 7.8 غم من فوسفات الصوديوم و 18.61غم من الـ EDTA و 0.5 غم من أزايد الصوديوم في 900 مليلتر من الماء المقطر ، وبعد تعديل الأس الهيدروجيني الى 7 تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة الماء المقطر.

رابعاً - محلول رقم (4) :

محلول 0.02 مولاري كلوريد المغنيسيوم ( $MgCl_2$) : حضر بإذابة 4.066 غم من كلوريد المغنيسيوم في كمية من الماء المقطر بعدها تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة الماء المقطر .

خامساً - محلول رقم ( 5 ) :

محلول الفينول Phenol 90% : والذي حضر بإذابة 90 غم من الفينول في أقل حجم ممكن من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مليلتر بإضافة الماء المقطر ، حضر هذا المحلول آنياً .

### 3-4-1-3 المحاليل المستعملة في تقدير كمية الكاربوهيدرات في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي LPS .

حضرت وفقاً لـ ( Dubois *et al*., (1956 وهي كالآتي :

أولاً - محلول رقم ( 1 ) :

محلول الكلوكوز الخزين : حضر بإذابة 0.01 غم من سكر الكلوكوز في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مليلتر بإضافة الماء المقطر .

ثانياً - محلول رقم ( 2 ) :

محلول الفينول 5% : حضر بإذابة 5غم من بلورات الفينول في أقل حجم ممكن من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم الى 100 مليلتر بإضافة الماء المقطر .

ثالثاً - محلول رقم ( 3 ) :

حامض الكبريتيك المركز $H_2SO_4$ .

### 4-4-1-3 المحاليل المستعملة في تقدير كمية البروتين في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي LPS .

حضرت وفقاً لـ (Bradford *et al*., (1976 وهي كالآتي :

أولاً - محلول رقم ( 1 ) :

المحلول الخزين من ألبومين المصل البقري (Bovine Serum albumin) : والذي حضر بإذابة 10 ملغرام منه في 100 مليلتر من الماء المقطر .

ثانياً - محلول رقم (2 ) :

صبغة كومازي الزرقاء (Comasie blue) : حضرت وفق تعلميات الشركة المجهرة (SIGMA- ALDRICH) ، بإذابة 100 ملغم من مسحوق صبغة الكومازي الزرقاء في 50 مليلتر من الكحول الأثيلي 95 % ، ثم اضيف الى 100 مليلتر من حامض الفسفوريك 85% ، بعدها تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة الماء المقطر .

## 3-1-4-5 المحاليل والمواد المستعملة في عد خلايا الدم البيض .

حضرت المحاليل وفقاً لـ Davidsohn , (2001) وهي كالآتي :

**أ- صبغة المثيلين الازرق Methylene blue**

حضرت بإذابة 0.3 غم من مسحوق الصبغة في 30 مليلتر من الكحول الأثيلي 95% وبعد الذوبان الكلي لها تم إضافة 100 مليلتر من الماء المقطر ثم رشحت باستعمال ورق الترشيح (Whattman) ثم حفظت في قنينة نظيفة .

**ب- محلول تخفيف خلايا الدم .**

حضر المحلول بإضافة 2 مليلتر من حامض الخليك الثلجي( Glacial acetic acid )الى 97 مليلتر من الماء المقطر والمعقم مع إضافة 1 مليلتر صبغة المثيلين الأزرق كدليل لوني وحفظت بدرجة حرارة 4°م .

**جـ - العدة الخاصة بالعد وتتكون من شريحة العد Haemocytometer ذو عمق 0.100 ملم ومساحة 0.0025 ملم$^2$ و الماصة الخاصة بسحب الدم و تخفيفه .**

## 3-1-4-6 المواد والمحاليل المستعملة في تحضير المقاطع النسيجية للأعضاء المنتخبة من الفئران .

**أ- محلول تثبيت أعضاء الفئران**

محلول دارئ الفورمالين 10% المتعادل ( Buffered formalin ) ، والذي استخدم لتثبيت الأعضاء المنتخبة من الفئران بعد تشريحها ، والذي حضر من 4 غم من فوسفات الصوديوم الحامضية $Na_2HPO_4 . H_2O$ و 6.5 غم من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين و 100 ملليترمن الفورمالين ، ثم تم أكمال الحجم الى لتر بإضافة ماء الحنفية مع ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7 .

**ب – الصبغات**

- صبغة الهيماتوكسيلين ( Haematoxylin ).
- صبغة الايوسين ( Eosin ) .

**جـ- الكحولات**

- الكحول الاثيلي بتراكيز مختلفة ( Ethanol) .
- الزايلول ( Xylole ) .
- الكحول المحمض ( Acid alcohol ) .

## 2-3 طرائق العمل Methods

### 1-2-3 العينات Specimens

#### 1-1-2-3 العينة النباتية

تم الحصول على أوراق نبات الشاي الأخضر من الأسواق المحلية ، وتم طحنه بواسطة طاحونة كهربائية (Blender)لجعله بشكل مسحوق وحفظ هذا المسحوق في أكياس نايلون جافة ونظيفة في الثلاجة لحين الاستعمال.

#### 2-1-2-3 العزلة البكتيرية .

تم الحصول على عزلة واحدة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* مشخصة من قبل العاملين في مختبرات مستشفى الحسين (ع) العام وقد عزلت هذه العزلة من مريض مصاب بخمج السبيل البولي (Urinary tract infection) وتم أعادة تشخيصها من قبلنا تأكيدياً .

### 2-2-3 الحيوانات المختبرية Lab Animals

تم استخدام ذكور الفئران السويسرية نوع ( Balb c ) البيضاء بأعمار تتراوح بين ( 8-10) أسابيع وأوزان ( 20 – 25 ) غم ، إذ تم الحصول عليها من المركز الوطني للوقاية والبحوث الدوائية في بغداد . هذه الحيوانات وضعت في أقفاص خاصة داخل البيت الحيواني مع مراعاة نظافة مياه الشرب والعلف مع تعقيم الأقفاص بين الحين والأخر .

### 3-2-3 تحضير مستخلصات الشاي الأخضر

#### اولاً : المستخلص المائي الحار :

تم وزن 10 غرام من مسحوق الشاي الأخضر المحضر وفقاً للفقرة ( 3-2-1-1 ) أعلاه ووضع في وعاء زجاجي نظيف ومعقم واضيف اليه 200 مليلتر من الماء المقطر المعقم المغلي ووضع على جهاز المحرك المغناطيسي لمدة 24 ساعة ، وتم ترشيحه باستعمال عدة طبقات الشاش الطبي النظيف ، ثم رشح باستعمال أوراق

الترشيح للحصول على محلول رائق ، جفف المستخلص باستعمال الفرن عند درجة حرارة 40°م ثم حفظ في الثلاجـة لحين الاستعمال ، (1994) ., Hernandez et al .

**ثانياً : المستخلص الكحولي :**

تم وزن 20 غرام مـــن مسحوق الشـــاي الأخضر والمحضر وفـــقاً للفقــرة ( 3-2-1-1 ) أعلاه ووضع في وعاء زجاجي نظيف ومعقم وأضيف اليه 400 مليلتر من الكحول الأثيلي 70% ووضع المستخلص بعدها في حمام مائي هزاز بدرجة 40 °م و لمدة 24 وتم ترشيحه باستعمال طبقات عدة من الشاش الطبي النظيف ،ثم رشح باستعمال ورق الترشيح وجفف المستخلص باستعمال الفرن درجة حرارة 40°م ، ثم حفظ في الثلاجـة لحين الاستعمال (1998) ., Ahmed *et al* .

## 3-2-4 الاختبارات التشخيصية للعزلة البكتيرية Laboratory Diagnosis

تم التشخيص بالاعتماد على مصنف بيرجي (1994) ., Holt *et al* و باستعمال الطرائق المتبعة من قبل Macfaddin , (2000) و Collee *et al*, (1996) باستعمال الاختبارات الكيموحيوية و المظهرية الآتية :

### 3-2-4-1 شكل النمو على وسط غراء الماكونكي

زرعت العزلة البكتيرية على وسط غراء الماكونكي بطريقة التخطيط وتمت الحضانة بدرجة 37مْ لمدة (24 - 48) ساعة وذلك لدراسة الخصائص المزرعية من شكل وحجم المستعمرات ولونها والقابلية على تخمير سكر اللاكتوز .

### 3-2-4-2 الفحص المجهري ( Microscopic Examination )

وذلك من خلال فحص استجابة العزلة البكتيرية لملون غرام ( Gram stain ) حيث تم أخذ جزء من مستعمرة مفردة نامية على وسط الغراء المغذي بواسطة عروة الناقل ثم عمل منها لطخة (Bacterial smear) ، بعدها تم تصبيغها بملون غرام من خلال فحصها بالمجهر الضوئي (Light microscope) وباستعمال العدسة الزيتية تم ملاحظة شكل ولون الخلايا البكتيرية .

### 3-4-2-3 اختبار النمو على وسط King (A)

زرعت العزلة البكتيرية على وسط King (A) بطريقة التخطيط والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-2-3 ) ، بعدها تم الحضن بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة . إن تغير لون الوسط الى ( أخضر – مزرق ) دليل على ايجابية الاختبار .

### 4-4-2-3 اختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد ((Triple sugar iron test (TSI)

زرعت العزلة البكتيرية على السطح المائل لوسط ثلاثي السكر والحديد والمحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-4) بطريقة الطعن ثم التخطيط ، ثم حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37°م ، ولوحظت النتائج من خلال تغير لون الوسط في القعر والسطح المائل فضلاً عن تكون الفقاعات الهوائية أو تكوين الراسب الأسود الذي يدل على تولد غاز $H_2S$ .

### 5-4-2-3 اختبار فعالية أنزيم السايتوكروم اوكسيديز ( Cytochrome oxidase )

تم ترطيب ورقة الترشيح بقطرات من محلول الكاشف و المحضر حسب الفقرة ( 3-1-3-1-5 ) ، ثم نقلت المستعمرة البكتيرية النامية على وسط الغراء المغذي وبعمر 24 ساعة ، بواسطة أعواد خشبية معقمة ومزجت جيداً مع الكاشف ، إن ظهور اللون البنفسجي خلال ( 10 – 20 ) ثانية يعد نتيجة موجبة .

### 6-4-2-3 اختبار الكشف عن أنزيم الكاتاليز ( Catalase test )

تم نقل جزء من المستعمرة البكترية بواسطة الناقل الى سطح شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيف اليها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين 3% ، ان ظهور الفقاعات دليل على النتيجة الموجبة .

أن هذا الكشف يستعمل للتحري عن قابلية العزلة البكتيرية على إنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ الى أوكسجين وماء .

### 7-4-2-3 اختبار الحركة ( Motility Test )

لقح وسط الحركة المحضر وفقا للفقرة ( 3-1-2-6 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية بطريقة الطعن باستعمال الإبرة ، بعدها حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ، إن ظهور ضبابية حول منطقة الطعن يدل على قابلية البكتريا على الحركة .

### 8-4-2-3 اختبار الكشف عن أنزيم محلل اليوريا ( Urease test )

تم تلقيح وسط مائل اكار اليوريا ( Urea agar ) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-2-5 ) بالعزلة البكتيرية بطريقة الطعن ، ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، ان تغير لون الوسط من الأصفر الى الوردي يعد نتيجة موجبة تدل على قابلية البكتريا على إنتاج أنـزيم محلل اليوريا .

### 9-4-2-3 اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test )

تلقيح وسط غراء السترات سيمون Simmon's citrate agar والمحضر وفقا للفقرة ( 3-1-2-9 ) بالعزلة البكترية ، ثم حضنت بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ، إن تحول لون الوسط من الأخضر الى الأزرق يدل على ايجابية التفاعل .

### 10-4-2-3 اختبار الأندول ( Indole test )

تم تلقيح وسط ماء الببتون المحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-7 ) بالعزلة البكترية ، بعدها حضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين ( 24 - 96 ) ساعة ، وتم الاستدلال على النتائج بعد الحضن بإضافة قطرات من كاشف Kovac's reagent المحضر وفق الفقرة ( 3-1-3-1-2 ) ، إن ظهور الحلقة الحمراء في على الوسط إشارة الى ايجابية التفاعل .

### 11-4-2-3 اختبار المثيل الأحمر ( Methyl red test )

لقح وسط Vogas proskauer – Methyl red والمحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-8 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية ، ثم حضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين ( 24 - 48 ) ساعة ، بعد الحضن أضيفت قطرات من كاشف المثيل الأحمر والمحضر وفق الفقرة ( 3-1-3-1-3 ) ان تغير لون الوسط الى الأحمر يعد نتيجة موجبة .

### 12-4-2-3 اختبار فوكس بروسكاور ( Vogas – proskauer test )

لقح وسط ( MR – VP ) المحضر وفق الفقرة ( 3-1-2-8 ) بالعزلة البكتيرية وبعد الحضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين ( 24 - 48 ) ساعة اضيف 1 مليلتر من هيدروكسيد الصوديوم 40 % و 3 مليلتر من α - naphthol مع الرج ، أن ظهور اللون الوردي الغامق هو نتيجة ايجابية .

## 13-4-3-3 اختبار تميع الجلاتين ( Gelatin liquification test )

لقح وسط الجلاتين المحضر وفقاً للفقرة (3-1-2-10 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية بطعن الوسط بالإبرة وبعد الحضن بدرجة حرارة 37 °م لمدة تتراوح بين 24 ساعة الى 7 أيام ، تم وضع الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة 4مْ لمدة 30 دقيقة ، يعد تحول الجلاتين من القوام الصلب الى السائل دليل على ايجابية الاختبار .

## 14-4-2-3 أختبار تخمر السكريات (Sugar fermentation test )

لقحت الأوساط المحضرة في الفقرة ( 3-1-2-11 ) بمستعمرات العزلة البكتيرية ، وتم حضنها بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة . إن تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر مع أرتفاع أنبوبة درهم لأمتلائها بالهواء يعد نتيجة موجبة للاختبار .

## 15-4-2-3 استعمال نظام API 20E للعائلة المعوية (bio Merirux)

1- تم فتح حافظة الشريط والحاوية على العديد من الحفر ورطبت بإضافة 5 مليلتر من الماء المقطر الى تلك الحفر .

2- حضر العالق البكتيري وذلك بنقل 5 مستعمرات منفردة من وسط غراء الماكونكي ومزجت بصورة جيدة بإضافتها الى 5 مليلتر من محلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم ثم رجت بصورة جيدة حتى أصبح المحلول عكراً .

3- بواسطة ماصة باستور نظفية والمعقمة تم تلقيح الشريط وذلك بملء الجزء السفلي Tube والجزء العلوي Cupule بالعالق البكتيري لكل من أنابيب VP , GEL , CIT ولجعل الظروف لاهوائية ملئ الجزء السفلي فقط لكل من الأنابيب ADH , $H_2S$ , URE , LDC , ODC في حين ملء الجزء العلوي بزيت البارافين السائل والمعقم .

4- تـم إغلاق الحـافظة بعد وضع الشريط بداخلها وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمـدة تتـراوح بين ( 24 - 48 ) ساعة .

بعد الحضن سجلت النتائج للأنابيب بصورة مباشرة باستثناء الأنابيب التالية والتي يضاف اليها الكواشف :

أ - قطرة من كاشف كوفاكس الى أنبوبة IND

ب - قطرة من كاشف TDA الى أنبوبة TDA

جـ - قطرة من كاشف $VP_1$ ثم قطرة من كاشف $VP_2$ مباشرة الى أنبوبة VP مع الانتظار لمدة 10 دقائق تقريباً .

سجلت النتائج حسب تعليمات الشركة المجهزة وصولاً الى رقم مكون من سبعة أرقام ، و بعد ذلك تم البحث عنه في الدليل المرفق لنظام API 20E والذي يعطي أسم النوع البكتيري .

## 5-2-3 استخلاص عديد السكريد الشحمي الخام

## Extraction of Crude Lipoplysaccharide

### 1-5-2-3 جمع الخلايا البكتيرية وتجفيفها .

حضر ( 10 ) لتر من مرق نقيع القلب والدماغ ( Brain heart infusion broth) ، في دوارق زجاجية بسعة 1 لترو بواقع 500 مليلتر لكل دورق زجاجي ، بعد تعقيمها بالمؤصدة تم تبريدها ثم لقح كل دورق بـ 5 ملليتر من عالق الخلايا البكتيرية والفتية الذي تم تنميته في مرق نقيع القلب والدماغ . حُضنت الدوارق في حاضنة هزازة وبسرعة 100 هزة / دقيقة وبدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين (24-48) ساعة ، و بعملية النبذ المركزي وبسرعة 3000 دورة / دقيقة جمعت الخلايا البكتيرية ثم غسلت ثلاث مرات بدارئ الفوسفات الملحي( PBS ) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2 - أولاً) ، بعدها تم تعليق الخلايا البكتيرية بمحلول رقم(2) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2-ثانياً ) مدة 18 ساعة ورسبت مرة أخرى بعملية النبذ المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة ثم غسلت بالمحلول نفسه مرتين ، جففت الخلايا البكتيرية المرسبة و ذلك بإضافة الأسيتون وبواقع 10 مرات بقدر حجم الخلايا الناتجة عن الترسيب ، وبعد عملية التجفيف تم حساب الوزن الجاف لها ، ( 1976 ) , Johnson and Perry .

### 2-4-2-3 الهضم الأنزيمي للخلايا البكتيرية Enzymatic digestion

على وفق طريقة ( 1976 ) , Johnson and Perry تم تكسير الخلايا البكتيرية بعملية الهضم الإنزيمي حيث تم استخدام دورق زجاجي نظيف ومعقم علق فيه 5 غم من الخلايا البكتيرية المجففة بالأستون في 50 مليلتر من محلول رقم (3) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2- ثالثاً ) ، تم وضع الدورق الزجاجي على جهاز المحرك المغناطيسي بالسرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة ، ثم أضيف 0.1 غم من أنزيم اللايسوزايم ( Lysozyme) ثم أعيد الدورق الحاوي على العالق البكتيري مرة أخرى الى المحرك المغناطيسي ، وتحت ظروف درجة حرارية 4°م ولمدة 16 ساعة ، بعدها أخذ العالق و وضع بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 20 دقيقة ، و تم أعادته مرة

أخرى الى جهاز المحرك المغناطيسي وبالسرعة القصوى لمدة 3 دقائق ولكن في هذه المرة وضع العالق في دورق زجاجي نظيف يفوق حجم العالق بخمس مرات مع أكمال حجم العالق الى 100 مليلتر وذلك بإضافة محلول رقم ( 4 ) المحضر وفق الفقرة ( 3-1-3-2 - رابعاً) ، بعدها حضن العالق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 10 دقائق أخرى .

## 3-5-2-3 عملية الاستخلاص

تم اعتماد طريقة ( 1952 ) ,.Westphal *et al* واستناداً لما ذكره ( 1976 ) , Johnson and perry ، تم أخذ العالق البكتيري الذي تم الحصول عليه من عملية الهضم الأنزيمي ومزجه بصورة جيدة بوضعه على جهاز المحرك المغناطيسي بالسرعة القصوى لمدة 3 دقائق ، ثم سخن الى درجة حرارة 70مْ وأضيف له حجم مساوٍ من محلول الفينول 95 % والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-2- خامساً) الساخن بدرجة حرارة 70 مْ ووضع على المحرك المغناطيسي لمدة 15 دقيقة ، وبعد هذه المرحلة تم تبريده مباشرة الى 5 °م وذلك بوضعه في الحمام الثلجي مع استمرارية التحريك على جهاز المحرك المغناطيسي . بعدها تم النبذ المركزي وذلك باستخدام المنبذة المبردة فائقة السرعة (High speed cooling centrifuge) وبسرعة دوران مقدارها 10000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة وبانتهاء هذه المرحلة تم الحصول على الأطوار الآتية وبترتيب من الأعلى الى الأسفل .

1- الطور المائي ( Aqueous Phase ) .

2- الطور البيني ( Inter Phase ) .

3- الطور الفينولي ( Phenolic Phase ) .

4- الراسب ( Sediment ) .

سحب كل من الطورين المائي والفينولي كل على حدة باستعمال ماصة باستور معقمة ، ثم جمع الطور المائي من كل أنابيب النبذ المركزي في وعاء نظيف ومعقم مع إهمال الطور الفينولي ، أما ما تبقى في أنابيب النبذ المركزي فأعيد تعليقه بواقع 3 مرات بقدر حجمه من الماء المقطر، ووضع على المحرك المغناطيسي بوجود الحمام الثلجي ولمدة 5 دقائق بعدها أعيد النبذ المركزي بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة .

بعد انتهاء هذه المرحلة وتحصيل الطور المائي مرة أخرى وأضافته الى ما تم جمعه مسبقاً من الطور المائي ، أجريت عملية الديلزة مقابل الماء بدرجة حرارة 4 مْ ولمدة 4 أيام ولحين اختفاء رائحة الفينول ، إذ أستعمل في اليوم الأول من الديلزة ماء الحنفية وبعدها أستخدم الماء المقطر ، ثم جفف المستخلص وحفظ لحين الاستعمال .

## 6-2-3 التحليل الكيميائي لعديد السكريد الشحمي الخام

### 1-6-2-3 تقدير كمية الكاربوهيدرات الكلية .

لتقدير كمية الكاربوهيدرات الكلية في عديد السكريد الشحمي الخام تم اعتماد طريقة Dubois *et al* . , (1956) وكما يلي :

**اولاً : المنحي القياسي لسكر الكلوكوز ( Standard curve of glucose )**

حضرت تراكيز مختلفة لسكر الكلوكوز وذلك بخلط حجوم من المحلول رقم ( 1 ) والمحضر وفقاً للفقرة (3-1-3-3- أولاً ) مع الماء المقطر في أنابيب زجاجية نظيفة وجافة وكما هو موضح في الجدول ( 3 – 1 ) :

**جدول ( 3-1 ) تراكيز سكر الكلوكوز المستخدمة في تحضير المنحنى القياسي للكلوكوز**

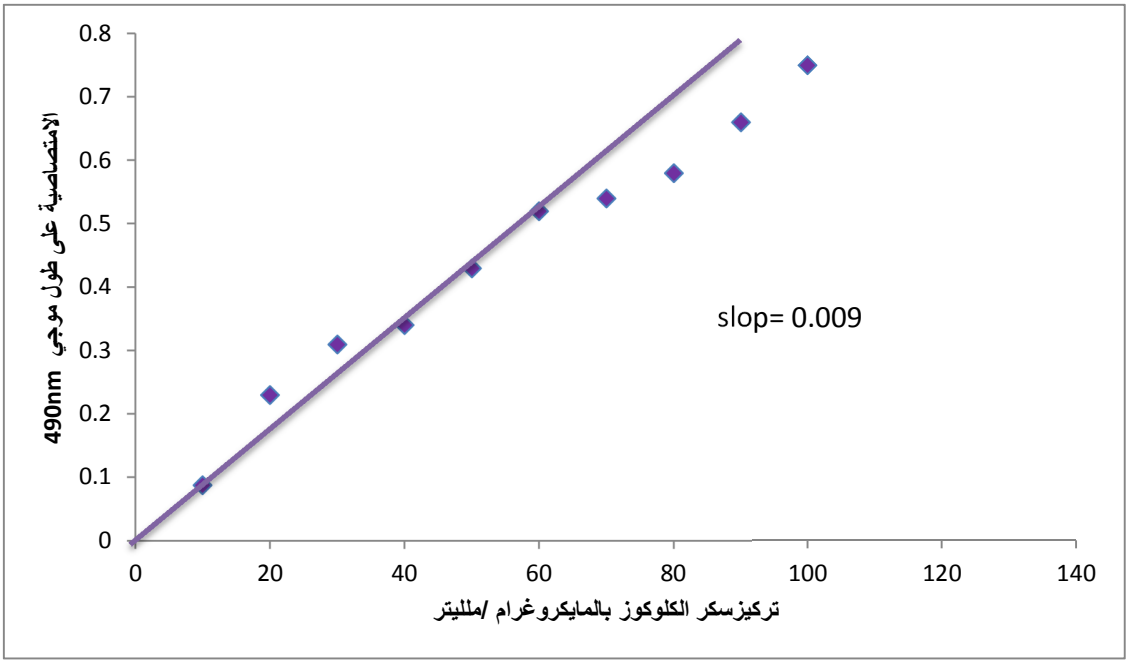
| رقم الانبوبة | حجم المحلول رقم ( 1 ) بالمليلتر | حجم الماء المقطر بالمليلتر | الحجم النهائي بالمليلتر | تركيز سكر الكلوكوز بالمايكروغرام / مليلتر |
|---|---|---|---|---|
| 1 | **0** | **1** | **1** | **0** |
| 2 | **0.1** | **0.9** | **1** | **10** |
| 3 | **0.2** | **0.8** | **1** | **20** |
| 4 | **0.3** | **0.7** | **1** | **30** |
| 5 | **0.4** | **0.6** | **1** | **40** |
| 6 | **0.5** | **0.5** | **1** | **50** |
| 7 | **0.6** | **0.4** | **1** | **60** |
| 8 | **0.7** | **0.3** | **1** | **70** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 80 | 1 | 0.2 | 0.8 | 9 |
| 90 | 1 | 0.1 | 0.9 | 10 |
| 100 | 1 | 0 | 1 | 11 |

أضيف ( 1 ) مليلتر من محلول رقم ( 2 ) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-3- ثانياً ) الى كل أنبوبة مع الرج الجيد للأنابيب ، بعدها تمت إضافة 5 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز ورجت الأنابيب بصورة جيدة ، ثم تركت لتبرد بدرجة حرارة الغرفة ، و تم قراءة الكثـــافة البصرية وعلى طول موجي 490 نانـوميتر مع استخدام الأنبوبة رقم ( 1 ) لتصفير جهاز المطياف الضوئي و للحصول على المنحني القياسي لسكر الكلوكوز ، ثم رسمت العلاقة البيانية .

$$\text{الميل} \quad \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

و قد أستعمل الميل لحساب تركيز الكاربوهيدرات الكلية لنموذج عديد السكريد الشحمي الخام .



**شكل (3-1) المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز**

**ثانياً : تقدير كمية الكاربوهيدرات الكلية لنماذج عديد السكريد الشحمي الخام**

اضيف 1 مليلتر من محلول رقم (2) والمحضر وفقاً للفقرة (3-1-3-3- ثانياً) و 5 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز الى 1 ملليتر من نموذج عديد السكر الشحمي الخام وتم قراءة الامتصاصية بالطول الموجي نفسه ، ثم تم حساب تركيز الكاربوهيدرات في النموذج و العلاقة الآتية :

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

## 3-2-6-2 تقدير كمية البروتينات في عديد السكريد الشحمي الخام

تم اعتماد طريقة Bradford *et al*.,( 1976) في تقدير البروتينات في عديد السكريد الشحمي وكما يأتي :

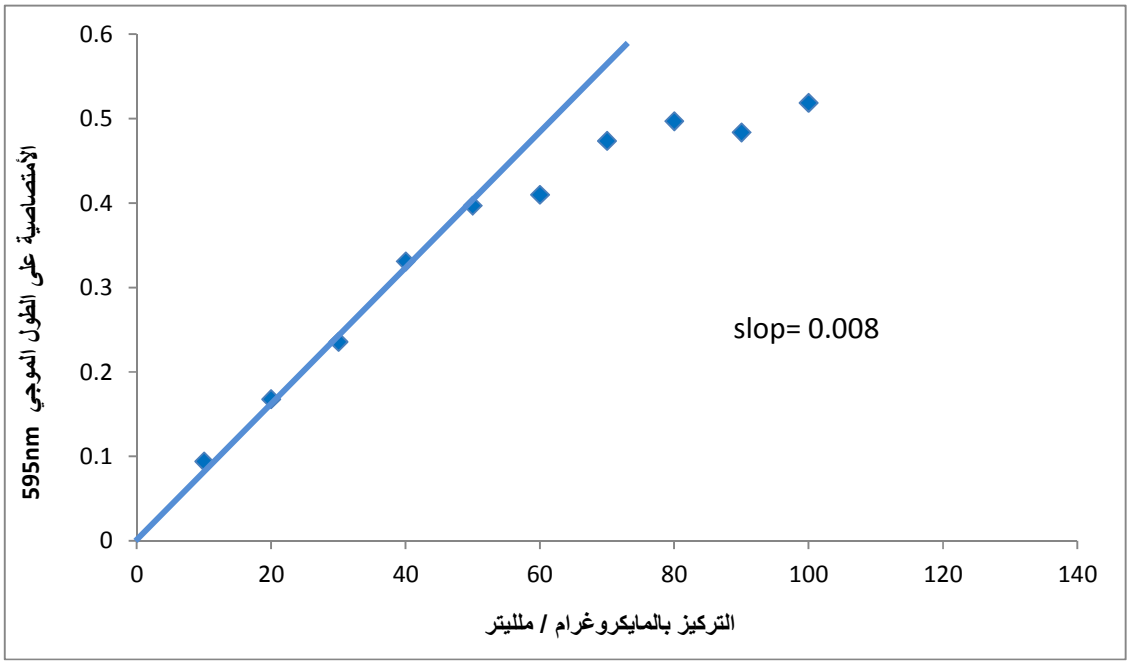
**أولاً : المنحي القياسي لبروتين المصل البقري( Standard curve of bovin serum almumin)**

حضرت تراكيز مختلفة من بروتين ألبومين المصل البقري وذلك بمزج حجوم من محلول رقم (1) والمحضر وفقاً للفقرة ( 3-1-3-4- أولاً ) مع الماء المقطر وكما موضح في الجدول (3-2)

جدول ( 3-2 ) تراكيز البومين المصل البقري المستخدمة في تحضير المنحنى القياسي

| رقم الانبوبة | حجم المحلول رقم ( 1 ) بالمليلتر | حجم الماء المقطر بالمليلتر | الحجم النهائي بالمليلتر | تركيز الألبومين بالمايكروغرام / مليلتر |
|---|---|---|---|---|
| 1 | **0** | **1** | **1** | **0** |
| 2 | **0.1** | **0.9** | **1** | **10** |
| 3 | **0.2** | **0.8** | **1** | **20** |
| 4 | **0.3** | **0.7** | **1** | **30** |
| 5 | **0.4** | **0.6** | **1** | **40** |
| 6 | **0.5** | **0.5** | **1** | **50** |
| 7 | **0.6** | **0.4** | **1** | **60** |
| 8 | **0.7** | **0.3** | **1** | **70** |
| 9 | **0.8** | **0.2** | **1** | **80** |
| 10 | **0.9** | **0.1** | **1** | **90** |
| 11 | **1** | **0** | **1** | **100** |

أضيف 2.5 مليلتر من محلول رقم (2) الى 500 مايكروليتر من كل تركيز ، بعدها مزج الخليط جيداً وترك لمدة 5 دقائق ، قرأت بعد ذلك الامتصاصية على الطول الموجي 595 نانوميتر ، ولعمل المنحي القياسي رسمت العلاقة البيانية بين الامتصاصية وتركيز البروتين ، ثم استخرج الميل وفق العلاقة الموضحة في الفقرة ( 3-2-5-1 أولاً) سابقاً .




**شكل (3-2) المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري**

**ثانياً : قياس تركيز البروتين في نموذج عديد السكريد الشحمي الخام .**

اضيف 2.5 مليلتر من محلول رقم (2) والمحضر وفقا للفقرة ( 3-1-3-4- ثانياً ) الى 500 ماكروليتر من نموذج عديد السكرد الشحمي الخام ، وتم قراءة الامتصاصية على بالطـول الموجي نفسه ، ثم تم حساب تركيز البروتين في النموذج وفق العلاقة التالية :

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

## 3-2-7 تحديد الجرعة المهلكة الكلية ( $LD_{100}$ ) لعديد السكريد الشحمي الخام المستخلص من بكتريا *P. aeruginosa*

حضرت التراكيز ( 50 , 75 , 100 , 125 , 150 , 175 ,200 ) مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عديد السكريد الشحمي الخام ، ثم حقن 0.5 مليلتر من كل تركيز وبواقع 4 فئران للتركيز الواحد داخل البريتون ، أما مجموعة السيطرة فحقنت بدارئ الفوسفات الملحي ( PBS) وبواقع 4 فئران أيضاً . وبعد مرور 5 أيام ، تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل مجموعة على حدة ومن خلال ذلك تم تحديد الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ للنموذج الخام وفقاً لـ ( Reed and Muench , (1938 كذلك تم حساب الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ و معرفة الجرعة الممرضة لعديد السكريد الشحمي الخام.

## 3-2-8 دراسة التأثيرات المرضية في الفئران المحقونة بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام

و تضمنت الآتي :

### 3-2-8-1 التغيرات الظاهرية الملحوظة على الفئران المصابة وأعضائها .

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 كذلك تم سحب الدم من الفئران قبل تشريحها لغرض حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض .

## 3-2-8-2 دراسة التغيرات المرضية النسيجية لاعضاء الفئران .

درست التغيرات المرضية في أنسجة كل من ( الكبد و الطحال ) بعد مضي 72 ساعة من الحقن بواسطة تثبيت وتقطيع الأعضاء الى شرائح نسيجية و تصبيغها ، وقد أجريت هذه الخطوات في مستشفى الحسين (ع) العام ومستشفى الكوفة في النجف الأشراف وكما يأتي :

أ- **التثبيت والتقطيع**

اعتمدت طريقة ( 1972 ) , Humason و كالآتي :

- التثبيت ( Fixation ) :

تم استخدام الفورمالين 10 % والمحضر وفقا للفقرة ( 3-1-3-6 - أ) في تثبيت الأعضاء المنتخبة من الفئران .

- الغسل ( Washing ) :

للتخلص من الفورمالين ، تم غسل الأعضاء بماء الحنفية .

- الانكاز ( Dehydration ) :

حضرت تراكيز تصاعدية من الكحول الأثيلي (90,80,70,50) % ، بعدها تم تمرير الأعضاء بهذه السلسلة من التراكيز ولمدة ساعتين لكل تركيز ، وأجريت هذه العملية لسحب الماء من الأعضاء .

- الترويق ( Clearing ) :

أستعمل الزايلول ومن ثم الكحولات المتدرجة لهذا الغرض .

- التشريب ( Infiltration ) :

تم وضع الأعضاء في شمع البارافين لعمل قوالب شمعية .

- التشذيب والتقطيع ( Trimming and Sectioning )

باستعمال شفرات حادة ، تم تشذيب قوالب الشمع الحاوية على الأعضاء ، بعدها قطعت باستعمال جهاز المشراح ( Microtome ) . اذ تم التقطيع بسمك 6 مايكروميتر ثم نقلت المقاطع الى شرائح زجاجية و ثبتت عليها بمادة لاصقة ألبومين ماير Mayer's albumine ، ثم وضعت على صفيحة ساخنة ( Hot plate ) بدرجة حرارة 37 °م .

ب- **التصبيغ ( Staining )**

تم اعتماد طريقة ( Drury and Wallington, (1980 ، حيث أستعملت كل من صبغة اليهاتوكسيلين والأيوسين لتصبيغ الشرائح المحملة بالمقاطع وكما يأتي :

- أستخدم الزايلول لإزالة الشمع من الشرائح .
- مررت الشرائح بسلسلة متدرجة تنازلية من الكحولات ( 80 - 50 ) % وبواقع دقيقة لكل محلول .
- وضعت الشرائح في ماء الحنفية عدة دقائق .
- وضعت الشرائح في اليهماتوكسلين لمدة دقيقة ونصف .
- كحول محمض حتى يصبح اللون ورديا .
- ماء حنفية جارٍ .
- ماء مقطر .
- وضعت الشرائح في الايوسين لمدة دقيقة .
- غسلت الشرائح بالماء المقطر .
- مررت الشرائح في سلسلة من التراكيز الكحولية التصاعدية ( 50 – 80 )% ولمدة دقيقتين لكل تركيز .
- تم نقل الشرائح الى كحول مطلق لمدة 5 دقائق لتجفيفها .
- أستخدم الزايلول لترويق الشرائح لمدة دقيقة .
- وضعت مادة كندا بلسم على المقطع النسيجي ثم غطي بغطاء الشريحة .
- أستخدم المجهر الضوئي لفحص ودراسة التغيرات النسيجية الحاصلة في أعضاء الفئران .

## 3-2-9 تحديد الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص النباتي ضد الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ من عديد السكريد الشحمي الخام

حضرت التراكيز ( 5-10-15-20 ) ملغم/0.5 مليلترلمستخلص الشاي الأخضر المائي و تم أعطائه

للفئران عن طريق التجريع . وكذلك حضرت نفس التراكيز السابقة للمستخلص الكحولي نفسه و الذي تم أعطائه أيضاً للفئران عن طريق الحقن داخل البريتون (Intraperitoneal) ، وبهذا قسمت الفئران الى

مجموعتين :

- **المجموعة الاولى :**

تم تجريع فئرانها بالتراكيز ( 20,15,10,5) ملغم / 0.5 مليلترمن المستخلص المائي لكل فأرة وبواقع 4 فئران للتركيز الواحد ، الانتظار لمدة ساعتين بعدها حقنت الفئران داخل البريتون بالجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ لعديد السكريد الشحمي المحضر في 0.5 مليلتر/فأرة .

- **المجموعة الثانية :**

حقنت فئرانها بالمستخلص الكحولي داخل البريتون و بتراكيز المستخلص المائي نفسه بواقع 4 فئران للتركيز الواحد أيضاً وبعد نصف ساعة حقنت داخل البريتون بالجرعة المهلكة الكـلية لعديد السـكريد الشحمي أيضاً .

ولغرض تحديد الجرعة الوقائية للمستخلصات النباتية تجاه الجرعة المهلكة $LD_{100}$ لعديد السكريد الشحمي ، تم حساب عدد الفئران الحية والميتة بعد مرور ثلاثة أيام مع الأخذ بنظر الاعتبار مجموعة السيطرة المحقونة بالدارئ الفسلجي .

## 10-2-3 دراسة تأثير الجرعة الوقائية المثلى من نبات الشاي الأخضر في أمراضية عديد السكريد الشحمي الخام للفئران

بعد تحديد الجرعة الوقائية المثلى من المستخلص المائي و الكحولي من نبات الشاي الأخضر ضد الجرعة المهلكة الكلية من عديد السكريد الشحمي الخام ، تم أجراء التجربة المبينة تفاصيلها في الجدول( 3-3) لغرض دراسة تأثير الجرعة الوقائية المثلى من نبات الشاي الأخضر ضد أمراضية عديد السكريد الشحمي في الفئران.

**جدول (3-3) معاملة الفئران بالجرعة الوقائية المثلى من نبات الشاي الأخضر و الجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام**

| رقم المجموعة | عدد الفئران | المعاملة |
|---|---|---|
| 1 | 4 | جرعت الفئران بالجرعة الوقائية المثلى من المستخلص المائي و بعد ساعتين حقنت بالبريتون بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام . |
| 2 | 4 | حقنت الفئران في البريتون بالجرعة الوقائية المثلى من المستخلص الكحولي و بعد نصف ساعة حقنت بالجرعة الممرضة من عديد السكريد الشحمي الخام في البريتون أيضاً. |
| 3 | 4 | عوملت الفئران بالمستخلص المائي كما في المجموعة رقم (1) أعلاه ثم حقنت بالدارئ الفسلجي بعد ساعتين . |
| 4 | 4 | عوملت الفئران بالمستخلص الكحولي كما في المجموعة رقم (2) أعلاه ثم حقنت بالدارئ الفسلجي بعد نصف ساعة . |

استخدمت المجموعتين 3 و 4 كسيطرة للتجربة لمعرفة تأثير المستخلص المائي و الكحولـــي على أجسام الفئران ، و بعد مرور ثلاثة أيام تم تخدير الفئران و سحب منها الدم ووضع في أنابيب خاصة حاوية على مانع للتخثر ، إذ أستعمل لحساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض .

وكذلك درست التغيرات الظاهرية و النسيجية لأعضاء الفئران بالمقارنة مع فئران السيطرة المحقونة بالدارئ الفسلجي كما في الفقرة (3-2-8) أعلاه

### 3-2-11 العد الكلي لخلايا الدم البيض WBCs Count

سحب 20 مايكروليتر من الدم والذي أضيف الى محلول التخفيف المحضر وفق الفقرة (3-1-3-5) في أنبوبة نظيفة وتركت الأنبوبة لمدة 5 دقائق ، ثم تم نقل قطرة منه الى شريحة العد (Haemocytometer)

وتركت لمدة ( 1–2 ) دقيقة لضمان استقرار الخلايا على سطح شريحة العد ، وتم حساب خلايا الدم البيض باستعمال المجهر الضوئي على القُوة (40 X) وذلك بحساب الخلايا في المربعات الأربعة الجانبية الكبرى والذي يحوي فيها المربع الواحد على 16 مربع أخـــر صغير .

## 12-2-3 التصميم والتحليل الإحصائي

أتبع في تصميم التجربة التصميم العشوائي التام ( Completely Randomized Design C.D.R )) وبأربعة مكررات . و أستعمل اختبار L.S.D على مستوى احتمال 0.05 لمقارنة المتوسطات بين المعاملات . (الراوي و خلف الله , 1980) .كما أستعمل أيضاً اختبار T على مستوى احتمال 0.001 لمقارنة المتوسطات بين المعاملات .

# الفصل الرابع
# النتائج و المناقشة

# الفصل الرابع

## 4-النتائج والمناقشة Results and Discussion

### 1-4 عزل وتشخيص النوع *P. aeruginosa*

### 1-1-4 العزل

تم الحصول على عزلة واحدة من جرثومة *P.aeruginosa* ، والتي عزلت من مريض مصاب بخمج السبيل البولي (Urinary tract infection) .

### 2-1-4 الفحص المجهري Microscopic Examination

بعد أجراء الفحص المجهري للشرائح المصبغة بملون غرام أتضح أن جرثومة *P.aeruginosa* هي عصيات سالبة لملون غرام تظهر بشكل منفرد أو أزواج أو سلاسل قصيرة ونادراً ما تظهر بشكل مجاميع ، غيرمكونة للسبورات .

### 3-1-4 الخصائص المظهرية للمستعمرات Culture characteristic

إن مستعمرات *P.aeruginosa* النامية على وسط MacConkey agar بدت شاحبة المظهر لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز ، أما على وسط Nutrient agar فأن مستعمراتها واسعه ، ذات حافات غير منتظمة ، ملساء ، لزجة ، ذات رائحة تشبه رائحة العنب (Grape) like odor ملونه الوسط بلون أخضر مزرق ناتج عن صبغة البايوسيانين Pyocyanin والتي لوحظ أيضاً إنتاجها على وسط Pyocyanin mediuem (King A) ، (Collee *et al*., 1996) .

### 4-1-4 الفحوصات الكيميوحيوية Biochemical Tests

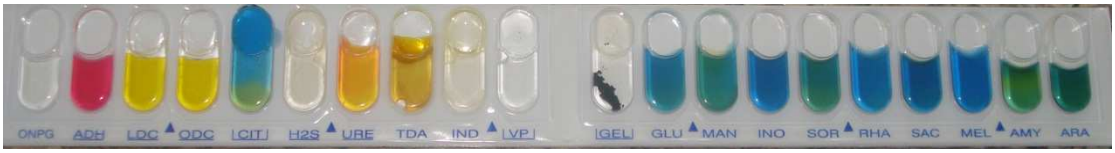
أظهرت نتائج الأختبارات الكيميوحيوية لجرثومة *P.aeruginosa* نتيجة إيجابية لفحص أنزيمي الأوكسيديز و الكالتاليز ، كذلك أنزيم حال الجلاتين Gelatinase ، في حين أعطت نتيجة سالبة لأنزيم محلل اليوريا Urease ، وكذلك لكل من أختبار إنتاج الأندول و المثيل الأحمر (MR) لأنها لا تسلك مسلك التخمر للأحماض الخليطة (Mixed acid fermentation pathway) وسالبة أيضاً في أختبارإنتاج الأسيتون (VP) ، بينما كانت النتيجة إيجابية لأستهلاك السترات كمصدر وحيد

للكاربون ، أمـا النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد TSI فلوحظ أن كل من المـائل slant و القعـر But لونهما أحمر، ولم يلاحظ تكوين راسب كبريتيد الهيدروجين والغاز ،كما أتضح بأنها غير مخمرة لعدد من السكريات مثل الانوستيول ، المانيتول ، الراميـنوز ، السوربتول . ( Macfaddin , 2000 ) . جدول (4-1) .

**جدول (4-1) نتائج الأختبارات التشخيصية للنوع *P.aeruginosa* .**

| الفحـــــــــــــص | النتيجـــــــــــــة |
|---|---|
| التفاعل مع ملون غرام | – |
| اختبار انزيم الاوكسيديز | + |
| اختبار انزيم الكاتاليز | + |
| اختبار انتاج انزيم حال الجلاتين | + |
| اختبار انتاج انزيم محلل اليوريا | – |
| شكل النمو على وسط ثلاثي السكروالحديد | K/K |
| انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين | – |
| فحص الحركة | + |
| اختبار انتاج الأندول | – |
| اختبار احمر المثيل | – |
| اختبار انتاج الاسيتوين | – |
| اختبار استهلاك السترات | + |
| انتاج الصبغات المنتشرة | + |
| اختبار تخمر سكر الكلوكوز | – |

k/k=Alkaline slant/Alkaline but




**شكل (4-1) الأختبارات التشخيصية لبكتريا *P.aeruginosa* باستعمال نظام Api 20E system**

تم أستعمال نظام Api 20E لتأكيد النتائج الكيموحيوية التي تم الحصول عليها اذ تميز أستعمال نظام Api 20E بسهولة التحضير والأداء بدلاً عن أستعمال الفحوصات الكيموحيوية الأعتيادية (Feuk-Lagerstedt , 2010) ، والتي وصفها York *et al* ., (1992) بأنها طرق مكلفة ، بطيئة ومتعبة ، حيث تم طرح هذا النظام في أوائل السبعينيات ، إذ أن أول من أستخدمه هم Washington *et al*,. (1971) ، كما أوضح الباحثان Devenish and Barnum (1982) أن هذا النظام يعطي دقة تصل الى 100 % في تشخيص الأنواع التابعة لجنس الـ *Pseudomonas* و الـ *Acinetobacter* لذلك يبدو أن أعتماد نظام Api 20E لتشخيص جرثومة *P.aeruginosa* هو كاف للتشخيص دون الحاجة الى الاختبارات الكميوحيوية الأعتيادية .

## 4-2 أستخلاص عديد السكريد الشحمي

تم تنمية خلايا بكتريا *P.aeruginosa* في مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth) حيث أن هذا الوسط يحتوي على مواد عضوية منعشة للنمو الجرثومي مما أدى الى زيادة أعداد الخلايا الجرثومية النامية فيه حيث يعد مصدراً لتوفير النتروجين ، الفيتامين و مصدر الكاربون و يحتوي على الـ Dextrose كمصدر للكاربوهدرات ، ولهذا يعد هذا الوسط ضروري ومتعدد الأستعمال (Chapman , 1946) عند حضانة المزارع الجرثومية لمدة 24 ساعة بأستعمال الحاضنة الهزازة ساعدت على التهوية ومجانسة الوسط الزرعي و تم جمع وتجفيف 5 غم من الخلايا الجرثومية وأستعملت الخلايا المجففة لغرض أستخلاص عديد السكريد الشحمي لكي تتم زيادة حصيلة المستخلص تم تحليل الجدران الخلوية وتكسير الخلايا وذلك بأستعمال الهضم الأنزيمي بأستعمال أنزيم Lysozyme مع EDTA اللذين يزيدان من كفاءة تحطيم الجدران الخلوية ، اذ أن المعاملة المسبقة للخلايا بانزيم Lysozyme بوجود EDTA كانت من أكثر الطرق فعالية وسهولة في أستخلاص وتحضير عديد السكريد الشحمي حيث يعمل

أنزيم اللايسوزايم على قتل الخلية البكتيرية و ذلك بتحليل الـ Peptidoglycan (Chan *et al*., 2002). أما الـ EDTA فيعمل على تحطيم سطح الخلية البكتيرية نتيجة لزيادة نفاذية جدار الخلية للمذيبات الخارج خلوية (Robeiro *et al*., 2004)، كما يعود الى التأثير السمي القاتل (Bactericidal effect) الذي يمتلكه مركب الـ EDTA تجاه الأحياء المجهرية السالبة لملون غرام والذي لوحظ تأثيره على بكتريا *Pseudomonas alcaigenes* والتي تكون أكثر حساسية من *P. aeruginosa* و هذا ما أوضحه Key *et al*., (1970) .

تم الحصول على مستخلص أبيض متمثلاً بعديد السكريد الشحمي الخام (Crude LPS) ، حيث بلغ الوزن الجاف حوالي 10 مليغرام والذي كان يشكل 0.002 % من الوزن الجاف للخلايا المستخدمة في عملية الأستخلاص .

## 3-4 التحليل الكيميائي لعديد السكريد الشحمي

أجريت عملية تقدير الكاربوهيدرات للمستخلص الخام وبالأستعانة بالمنحى القياسي لسكر الكلوكوز (الشكل 3-1) وجد أن تركيز الكاربوهيدرات 233 مايكروغرام /مليلتر وبنسبة مئوية 71%، أن هذه النتائج تختلف عما لعدد من الدراسات المحلية التي أجريت على عديد السكريد الشحمي اذ وجدت السعدي ، (2002) أن نسبة الكاربوهيدرات في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي لجرثومة *Aeromonas hydrophila* كانت 17.5% أما جرثومة *Proteus mirabilis* فقد كان تركيز الكاربوهيدرات في المستخلص الخام 153 مايكروغرام /مليلتر ( مالك ، 2006 ) .

تم تقييم البروتينات في مستخلص عديد السكريد الشحمي الخام و ذلك بالأستعانة بالمنحى القياسي لألبومين المصل البقري (شكل 3-2) إذ وجد أن تركيز البروتين 93.5 مايكروغرام /مليلتر و بنسبة مئوية 28 % في حين وجد أن النسبة للبروتينات في المستخلص الخام لعديد السكريد الشحمي LPS لبكتري *Citrobacter freundii* كانت 22 % (المسلماوي ، 2007) ، كما وجد Moreno *et al* (1981),.أن النسبة المئوية للبروتينات كانت 24% للمستخلص الخام من عديد السكريد الشحمي لبكتريا *Brucella abortus* .

أن أرتفاع نسبة البروتين تعكس عدم نقاوة المستخلص اذ إن انخفاض نسبة البروتين و أرتفاع نسبة الكاربوهيدرات تدل على نقاوة المستخلص ، اذ أن معاملة المستخلص البكتيري بأنزيمي الـ DNase و RNase تكون ضرورية لأزالة الأحماض النووية Perdomo and Montero , (2006) ، و التي تؤدي انخفاض نسبة البروتينات .

## 4-4 تحديد الجرعة المهلكة النصفية $LD_{50}$ والكلية $LD_{100}$ للفئران المختبرية من مستخلص عديد السكريد الشحمي الخام

تم حقن 7 تراكيز متدرجة من مستخلص عديد السكريد الشحمي الخام لجرثومة *P.aeruginosa* والتي من خلالها تم تحديد الجرعة المهلكة النصفية $LD_{50}$ و الكلية $LD_{100}$ للفئران المختبرية و وجد أن الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ هي 175 مايكروغرام /0.5 مليلتر ونسبة الهلاك 100% بعد مرور 5 أيام (الجدول 4-2 ) و (الشكل 4-2) .

في حين وجد الجرعة المهلكة للنصف $LD_{50}$ هي 137.5 مايكروغرام / 0.5 مليلتر لكل فأرة ، وهي واقعة بين تركيزين ( 150و125 ) مايكرو غرام / 0.5 مليلتر لكل فأرة وبنسبة هلاك ( 66.6 % و 33.3 %) على التوالي بعد مرور 5 أيام (الجدول 4-2 ) و (الشكل 4-2).

تم من خلال عدد من الدراسات تحديد الجرعة المهلكة $LD_{50}$ لعديد السكريد الشحمي إذ وجد Dyke and Berk,(1973) أن جرعة$LD_{50}$ لعديد السكريد الشحمي المستخلص من بكتريا *P.aeruginosa* هي 450 مايكروغرام/فأرة ، في حين كانت 5 مليغرام/فأرة Pavlovskis *et al* ., (1976) ، كما وجد أن جرعة $LD_{50}$ لعديد السكريد الشحمي لأنواع بكتيرية أخرى ، إذ وجدت الكرخي ، (2001) أن $LD_{50}$ كانت *Acinobacter baummanii* ، وكما وجدت السعدي ، (2002) أن جرعة $LD_{50}$ لعديد السكريد الشحمي لبكتريا *Aeromonas hydrophila* هي 216 مايكروغرام/فأرة .

وقد أوضحت العديد من الدراسات أن مستخلص عديد السكريد الشحمي له النظام البايولوجي (Biological system) نفسه ولكن اختلاف الفعالية البايولوجية تعود الى نوع الكائن

المجهري و طـريقة الأستخلاص المتبعة إضـافة الى وجـود بروتينات الغشـاء الخارجـي (Outer membrane) كـذلك وجـود و تنـوع السلسلة الجـانبية O- لعـديد السكريـد الشحـمـي (Luchi and Morisson , 2000) ، كـمـا أوضـح Perdomo and Montero , (2006) إن معاملة المستخلص بأنزيمي الـ DNase و RNase ضروريـة قبل عملية التنقية و ذلك لأزالة الأحماض النووية ، أضافة الى عمليات التنقية لعديد السكريد الشحمي و التي من خلالها يتم الحصول على مستخلص نقي . أن من جملة هـذه الأسباب قد تـؤدي الى أختلاف قيم الجرعة المهكلة للنصف $LD_{50}$ كوننا أستعملنا مستخلص خام في الدراسة الحالية .

**جدول (4-2) نتائج الجرعة المهلكة النصفية $LD_{50}$ والكلية $LD_{100}$ لمستخلص عديد السكريد الشحمي الخام لعزلة *P.aeruginosa***

| الجرعة من LPS مايكروغرام /0.5 مل | عدد الفئران المعاملة | عدد الفئران الميتة | عدد الفئران الحية | العدد التراكمي للفئران الميتة | العدد التراكمي للفئران الحية | مجموع الاعداد التراكمية | 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 | 16 | 0 |

تم حساب الجرعة المهلكة $LD_{50}$ كالاتي:.

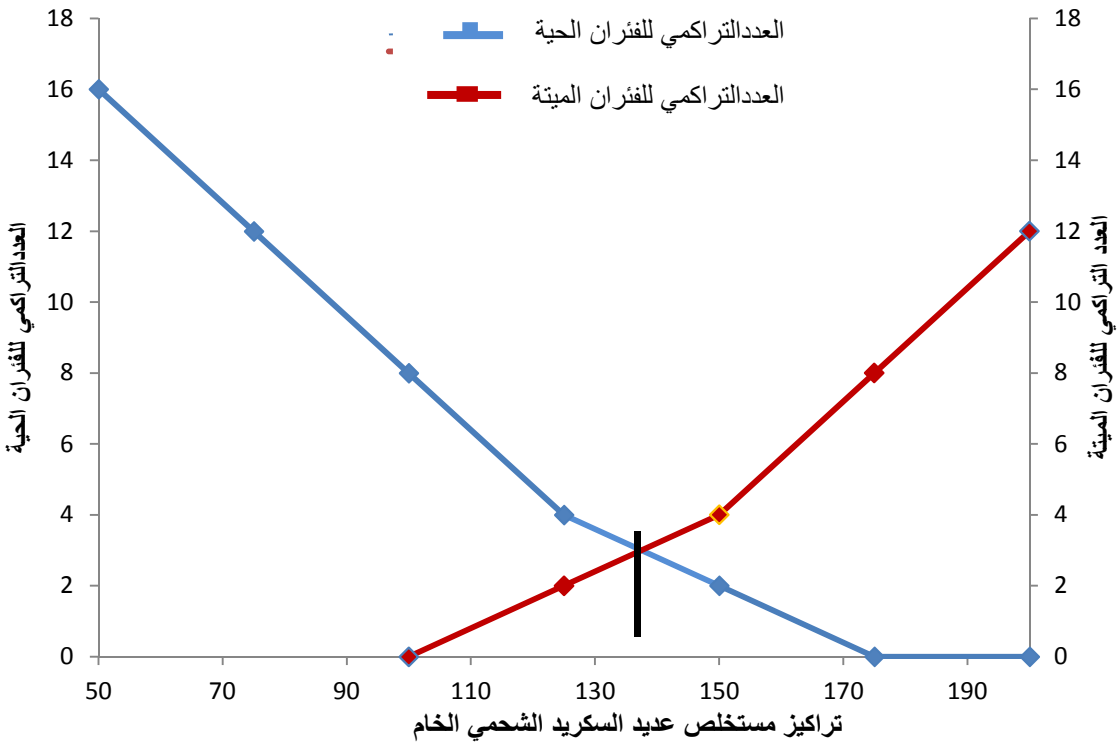
$$\text{المسافة النسبية} = \frac{33.3_50}{33.3-66.6} = \frac{16.7}{33.3} = 0.5$$

المسافة النسبية من 50% = 0.5 X (125_150)

= 0.5 X 25 = 12.5 وحدة

الجرعة المهلكة لـ 50% = 125 + 12.5

= 137.5 مايكرو غرام / 0.5 مليلتر



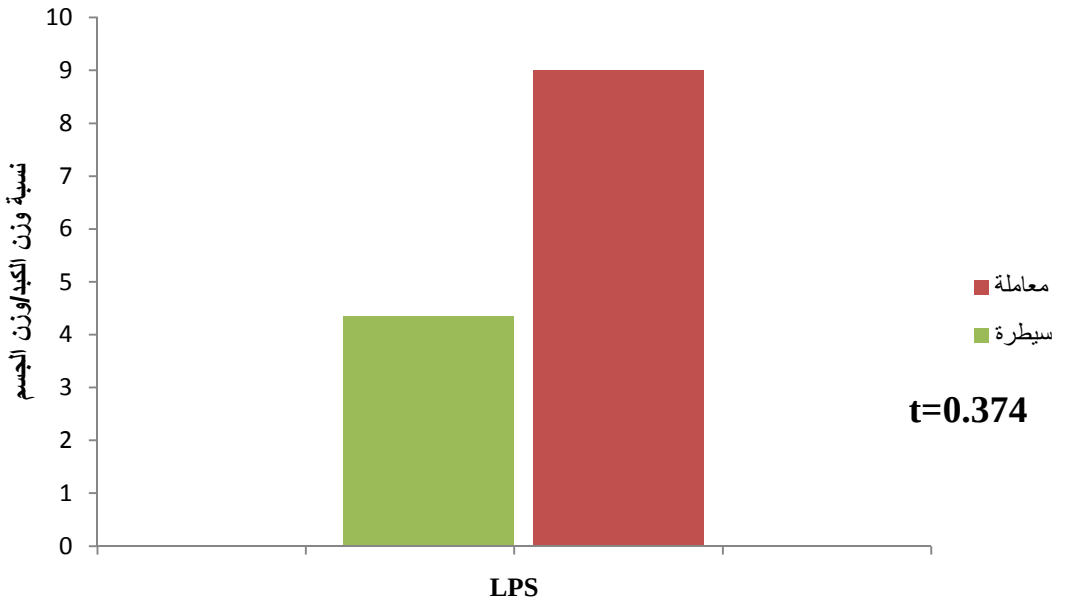

**شكل(4-2) تحديد الجرعة المهلكة للنصف ($LD_{50}$) عند حقن الفئران بمستخلص عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa***

# 5-4 التغيرات المرضية الناتجة عن اصابة الفئران بعديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa*

## 1-5-4 التغيرات الظاهرية Gross Changes

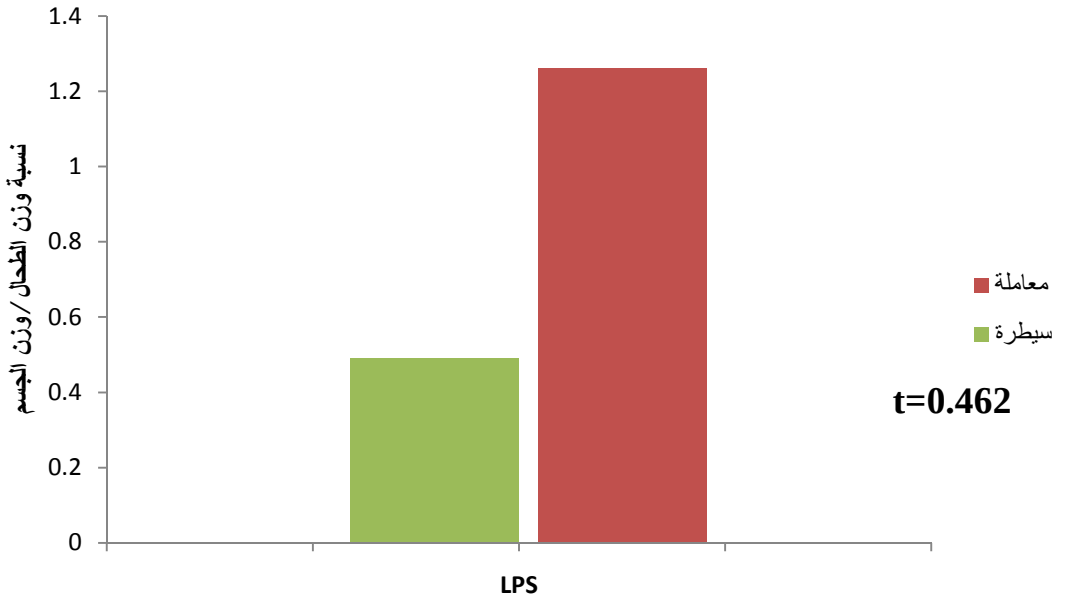
جرت متابعة الفئران بعد حقنها بمستخلص عديد السكريد الشحمي الخام بتركيز 125 مايكروغرام / 0.5 مليلتر لكل فأرة ، وقد لوحظ وجود هذه الفئران بشكل مجاميع مع ملاحظة أعراض الأجهاد والخمول وعدم الأكل مقارنة بفئران السيطرة التي بدت بحالتها الطبيعية من خلال الفحص العياني للأعضاء المنتخبة من الفئران ، تمت ملاحظة 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 تم دراستها 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 بين نسبة وزن الكبد الى وزن الجسم للفئران المحقونة بعديد السكريد الشحمي اذ بلغت 8.8% في حين بلغت السيطرة 4.3% الشكل (3-4).



**شكل (4-3) نسبة وزن الكبد الى وزن الجسم للفئران المحقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 مليلتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* و السيطرة**

أما نسبة وزن الطحال الى وزن الجسم للفئران المحقونة بعديد السكريد الشحمي LPS كانت 1.26% في حين بلغت السيطرة 0.49 % وذلك بسبب تضخم الطحال الناتج عن الفعل التقسمي (Mitogenic effect) لخلايا B التي تعد المكون الرئيس لعضو الطحال والمتسبب عن عديد السكريد الشحمي (Gao *et al* ., 2001 ) . الشكل (4-4) .

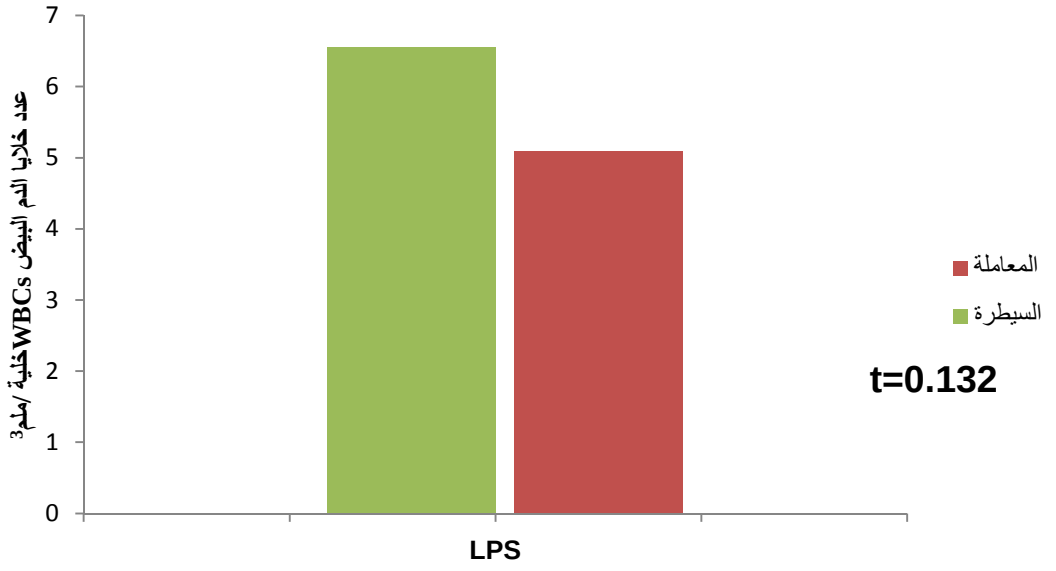



**شكل (4-4) نسبة وزن الطحال الى وزن الجسم للفئران المحقونة بـ 125مايكروغرام/0.5 مليلتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* و السيطرة**

## 4-5-2 تأثيرعديد السكريد الشحمي في عدد خلايا الدم البيض للفئران

تم حقن الفئران بتركيز 125 مايكرو غرام / 0.5 ملبلترلكل فأرة من مستخلص عديد السكريد الشحمي، بعدها تم حساب عدد خلايا الدم البيض WBCs في دم الفئران بعد مرور ثلاثة أيام من الحقن وبأجراء التحليل الأحصائي (اختبار T) لوحظ وجود فرق معنوي واضح ($p < 0.001$) مقارنة مع فئران السيطرة في أعداد خلايا الدم البيض ، اذ بلغ عدد الخلايا $10^3$ X 5.1 خلية /ملم$^3$ في حين بلغت السيطرة $10^3$ X 6.55 خلية /ملم$^3$. شكل (4-5) .

أظهرت العديد من الدراسات أن المعاملة بعديد السكريد الشحمي تؤدي الى حدوث أختزال وأنخفاض واضح في عدد خلايا الدم البيض (Leukocyte counts) في الدم والذي يعرف بـ Leukopenia (Abdella , 2008 ; Noji *et al*., 2001) ، إذ يسبب هذا النوع من السموم تجمع مباشر وتنشيط خلايا الدم البيض (Leukocyte) في الدورة الدموية الصغرى ( Microcircutation) وعلى وجه الخصوص الشعيرات الدموية الرئوية (Alveolar capillaries) كجزء من آليات دفاع المضيف (AL –Dughamy and Homeida , 2008) .




**شكل (4-5) تأثيرمستخلص LPS الخام في عدد خلايا الدم البيض للفئران**

## 4-5-3التغيرات النسيجية المرضية Histopathological changes

أن عديد السكريد الشحمي LPS يعمل على تحفيز الجهاز المناعي من خلال تفاعلة مع خلايا المضيف الدفاعية مثل خلايا البلاعم الكبيرة (Macrophages) وخلايا وحيدة النواة (Monocytes) محفزاً إياها لأنتاج الوسائط الألتهابية Proinflammatory (mediators) مثل السياتوكينات (Cytokines) والتي تعمل بدورها على انتاج سلسلة من الوسائط الألتهابية الأخرى مثل عامل تنشيط الصفائح (Platelet -activating facter (PAF) و Nitric oxide (NO) ، هذا فضلاً عن أرتباطه بمستقبلات بروتينية خاصة على سطوح الخلايا الدفاعية وذلك من خلال اتصاله بالبروتينات المرتبطة بعديد السكريد الشحمي

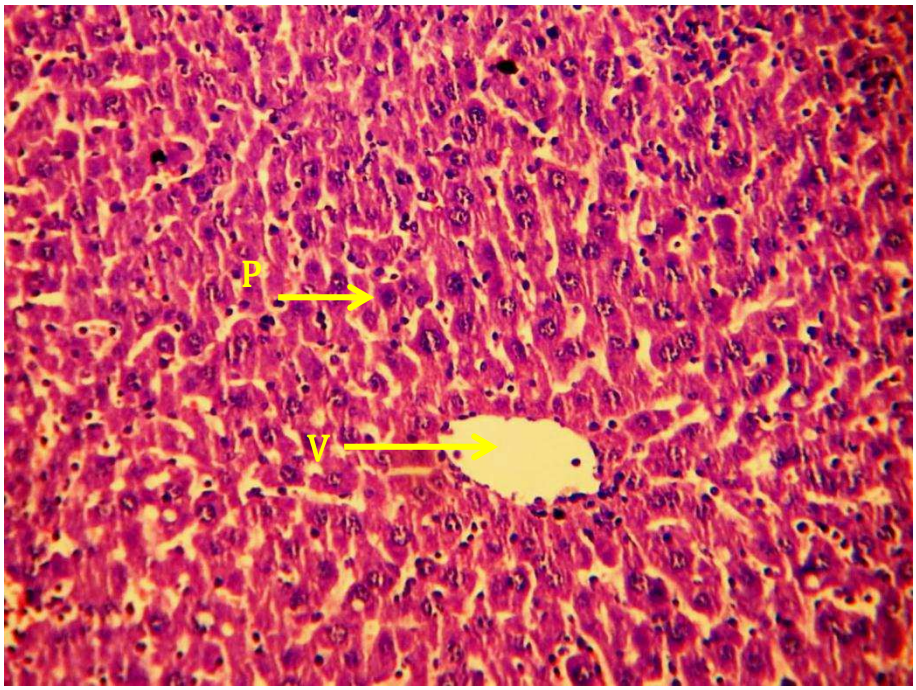
(LPS-binding protein) الموجودة في المصل والـذي يساعد على نقل LPS الى تلك المستقبلات البروتينية ، فضلاً عن وجود مستـقبـلات بروتينيـة ذائبـة في المصل sCD14 والتـي تـعمـل أيـضـاً عـلـى نقـل LPS مـع البـروتينات الـرابطـةلعـديـد السكـريـد الشحمي (LBP) الـى سطـوح الخـلايا الـدفاعيـة Quan *et al* ., 2001 ; Burvenich *et al* ., 2008 ; Kimura *et al*., 2005 ) . ( Krakauer *et al* ., 2010 ;

ينتج عن هذه الأستجابة المناعية تغيرات فسلجية ونسيجية واضحة ،حيث أظهرت نتائج الدراسة النسيجية وجود تأثيرات مرضية واضحة في أعضاء الفئران ،أذ لوحظ في الكبد حدوث أرتشاح الخلايا ضمن الكبد وهجرة الخلايا مشكلة النواة PMN ، وجـود أحتقان ونـزف دموي وحـدوث تجمع في خلايا الكبد وتوسع في الجيبانيات الكبدية التي تـؤدي الى فقـدان نسيـج الكبد الشكل السداسي الخاص به . الأشكال(4-7) (4-8) .

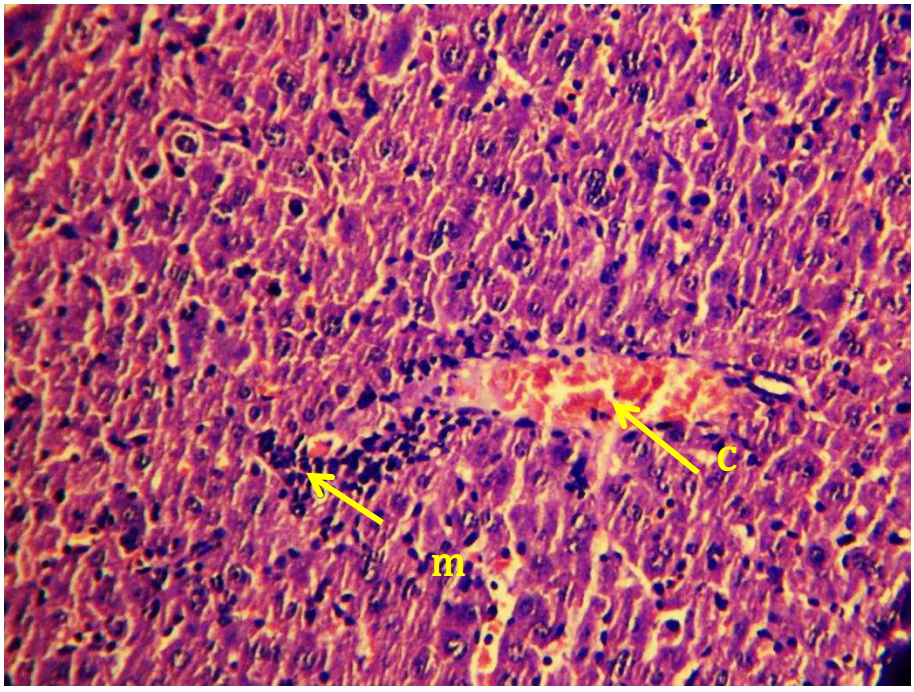
إن موقع الكبد نسبة الى جهاز الـدوران يعد مثالياً لمعادلة و إزالة التأثيرات السمية ، حـيث توجـد الخـلايا الكـبديـة (Hepatocytes) فضـلاً عن وجـود خـلايا البـلاعـم الكـبيرة (Macrophage ) والتـي تعـرف بـ (Kupffer cells) . (Junqueira and Carneiro, 2003)

أما في الطحال فقد لوحظ فرط التنسج (Hyperplasia) وكبر حجم اللب الأبيض وأندماجه ، حيث أن اللب الابيض يوفرالمحيط المـلائم للأرتباط بين الممرض و أنواع خـلايا المضيف الدفاعية اللازمة لتنشيط الاستجابة المناعية ، كما أن لعديد السكريد الشحمي تـأثير تـقسيـمي (Mitogenic effect) لخـلايا B اللمـفاوية محفـزاً إياها على التضاعف ، الشكل(4-10)، حيث يمثل الطحال أكبر تجمع لنسيج اللمف في الجسم Lymphoid (tissue) والتي تشكل خلايا B اللمفاوية المكون الأساس فيه (Junqueira and Carneiro, 2003) كما لوحظ حدوث ارتشاح خلايا PMN و الخلايا اللمفاوية فضـلاً عن النزيف والأحتقان الدموي في اللب الأحمر، الشكل (4-10) ، حيث أظهرت نتائج دراسة من قبل Peavy *et al* ., (1978) أن حقن LPS يؤدي الى حدوث توسع في الطحال و الذي يرافقه الأنقسام الخلوي المتمثل بخلايا B اللمفاوية حيث أفترض من خلال دراسته أن لـ LPS قدرة التفعيل المباشر لخلايا B اللمفاوية ، فضلاً عن التراكم السريع لخلايا PMN مع درجة بسيطة في تضاعفها .إن ما تم التوصل اليه من النتائج من التغيرات النسيجية لكل من الكبد والطحال تعد نوعاً ما مقاربة الى ما تـوصل اليه Groeneveld *et al*.,(1988) و الذي

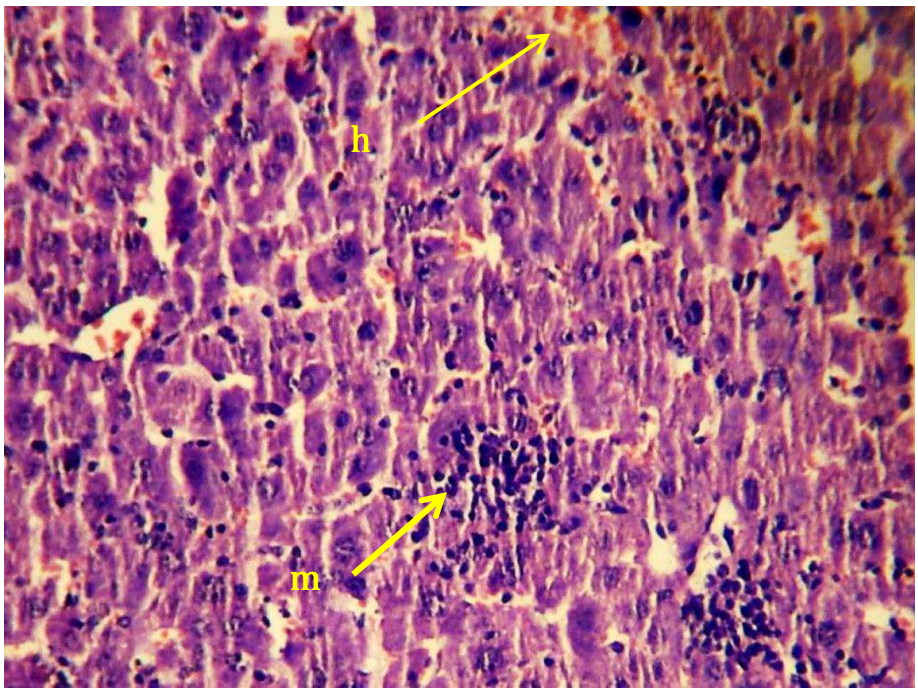
أضـح دور الخلايا الدفاعية في الأمراضية الناتجة عن LPS ذلك لأن خلايا البلاعم الكبيرة ( Macrophage) في الكبد و الطحال تعد المواقع الأولية لتموضع عديد السكريد الشحمي .



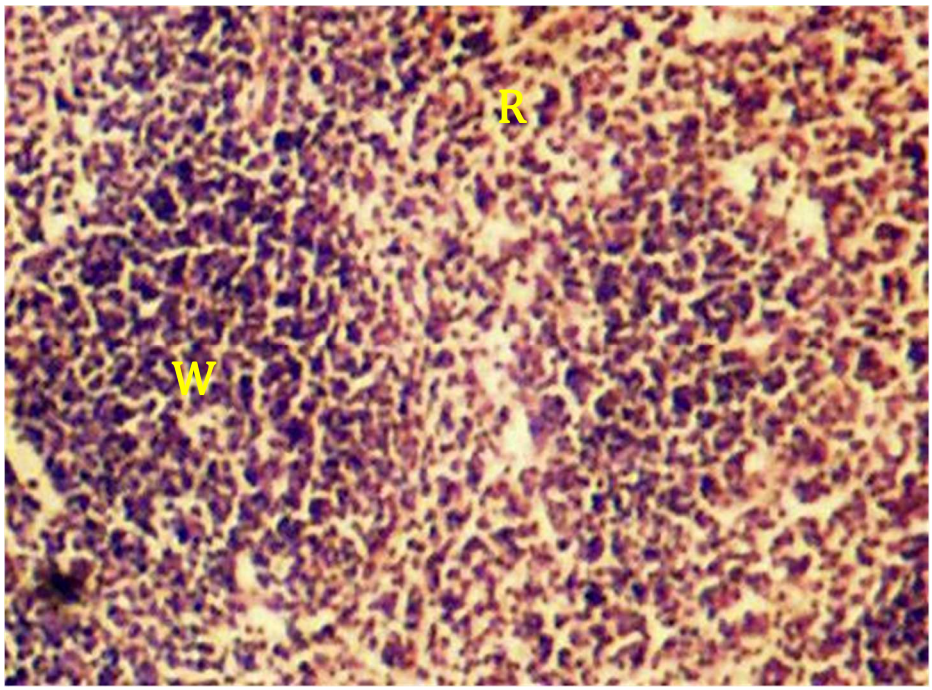

**الشكل (4-6) مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS) ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ، يوضح P : الخلية الكبدية ، V الوريد المركزي**



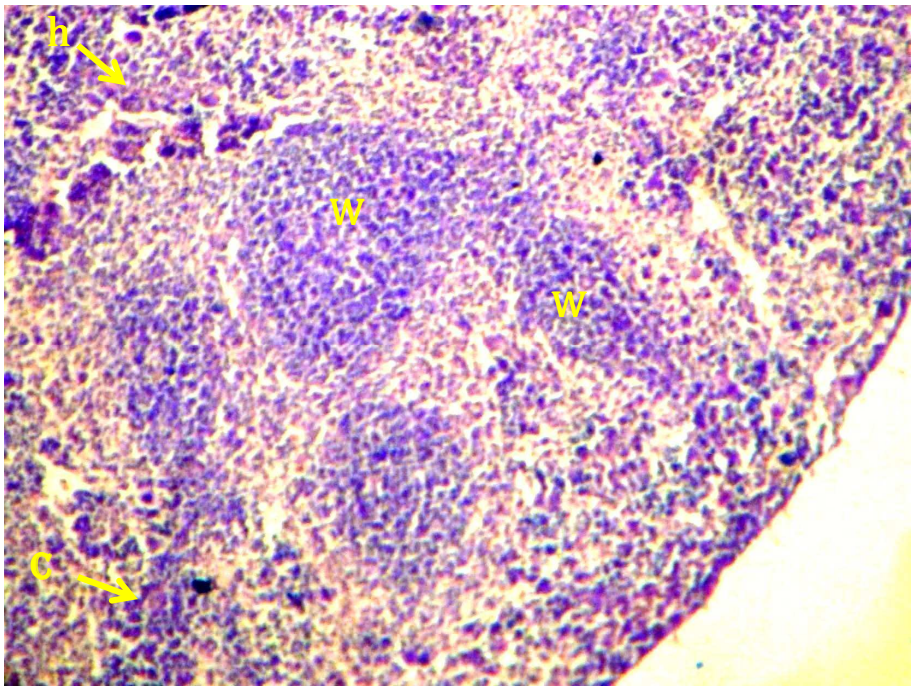
شكل (4-7) مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ، 100X ، يوضح c : الاحتقان الدموي ، m هجرة الخلايا الالتهابية ضمن الوعاء الدموي




شكل (4-8) مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ، يوضح h : النزف الدموي ، m : هجرة الخلايا الالتهابية



**شكل (4-9) مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بدارئ الفوسفات الملحي (PBS) ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ، يوضح W : اللب الأبيض ، R : اللب الأحمر**




**شكل (4-10) مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عديد السكريد الشحمي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ، يوضح تضخم اللب الأبيض و إندماجه ، h : النزف الدموي و c : الاحتقان الدموي.**

## 4-6 تحديد الجرعة الوقائية المثالية من المستخلص النباتي

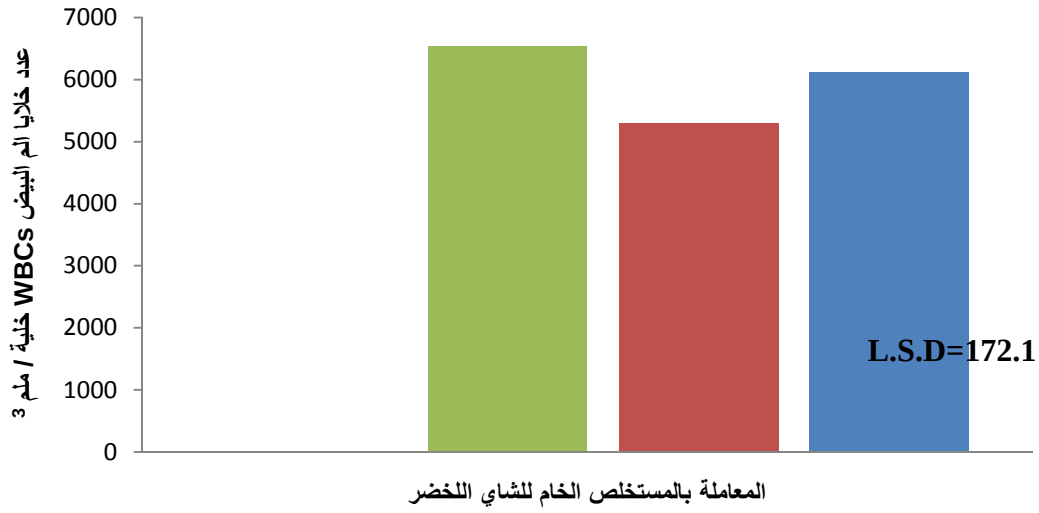
تم تجريع 4 تراكيز متدرجة من المستخلص المائي الحار للشاي الأخضر وبواقع 4 فئران لكل تركيز ، وبعد الأنتظار لمدة ساعتين تم حقن الفئران داخل البريتون بالجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ من مستخلص عديد السكريد الشحمي والمحضرفي 0.5 مليلتر لكل فأرة ، وبعد مرور ثلاثة أيام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لتحديد الجرعة الوقائية المثالية من المستخلص المائي الحار للشاي، ووجد أن التركيز 15 ملغم/0.5 مليلتر لكل فأرة كانت الجرعة الوقائية المثالية وبنسبة نجاة 100% وبأعادة التجربة أعلاه بالنسبة للمستخلص الكحولي بأستثناء حقن عديد السكريد الشحمي بعد نصف ساعة وجد أن التركيز 10 ملغم/0.5 مليلتر لكل فأرة من المستخلص الكحولي للشاي الاخضر كانت الجرعة الوقائية المثالية ،وبنسبة نجاة 100% و

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها ، لوحظ أن تركيز المستخلص الكحولي 10 ملغم/0.5 مليلتر أكفأ من 15 ملغم/0.5 مليلتر للمستخلص المائي ، مما يشير الى كفاءة الكحول كمذيب عضوي للمواد الفعالة وبكمية أكبر مقارنة مع المستخلص المائي الحار على الرغم من أن عامل الحرارة عامل مهم يساعد في إذابة المواد الفعالة في الشاي الأخضر إلا أنه أقل كفاءة من الكحول في عملية الاستخلاص ، إذ أن المركبات الفينولية و الفلافونات تذوب في الكحول الأثيلي و لا تذوب في الماء وهذا ما أشارت اليه العديد من الدراسات في أختبار فعالية المستخلصات المائية والكحولية وفعلها المثبط تجاه أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية ، حيث أظهرت نتائج دراسة أجراها محمود وخليل ، (2010) أن المستخلص الكحولي لنبات الهيل *Elettaria cardamomum* كمثبط بكتيري لكل من *Pseudomonas aeruginosa* ، *Staphylococcus aureus* و *Klebsilla spp.* كان أكفأ من المستخلص المائي الحار وهذا يشير الى أن المذيبات العضوية ذات تأثير أقوى في إذابة المواد الفعالة للنبات فهي بهذا تغلبت على عامل الحرارة و الذي يساعد أيضاً في عملية الأستخلاص ، إذ أوضحت نتائج الدراسة أن المستخلصات المائية تحتوي على الكلايكوسيدات ، القلويدات ، الصابونيات ، التانينات و الزيوت الطيارة هذه المركبات لها القابلية على الذوبان في الماء ، أما المستخلصات الكحولية فتحتوي (أضافةً الى ما ذكر) على مركبات راتنجية و كومارينات و فلافونات و فينولات وهذه المركبات لا تذوب في الماء و لكنها تذوب بالمذيبات العضوية ، و في دراسة أخرى أجريت من قبل علي ، (2004) و التي استخدم فيها الكحول الأثيلي كمذيب عضوي لنبات الدارسين *Cinnamon spp.* لأحتوائه الزيوت الطيارة ،الراتنجات ، الفينولات و الفلافونات ، اذ أظهرهذا المستخلص الكحولي كفاءة تثبيط عالية في نمو بكتريا *P. aeruginosa* .

## 7-4 دراسة تأثير المستخلص النباتي داخل اجسام الفئران المعاملة بمستخلص عديد السكريد الشحمي

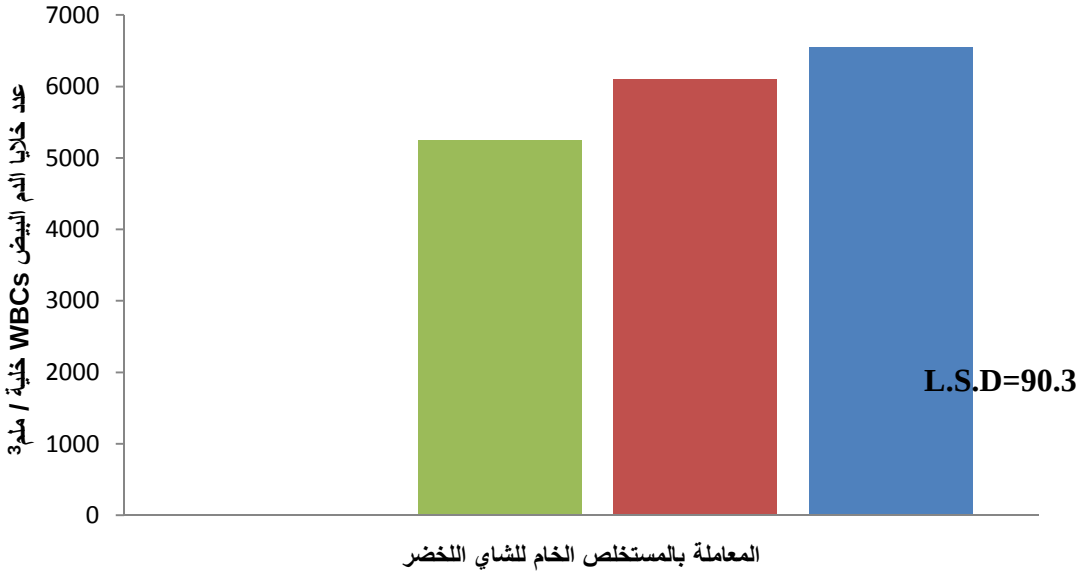
بعد تحيد الجرعة الوقائية المثالية من المستخلص النباتي تم دراسة تأثير الجرعتين الوقائيتين لكل من المستخلص المائي الحار و الكحولي في أجسام الفئران المختبرية والمحقونة بعديد السكريد الشحمي حيث تم تجريع المجموعة رقم 1 من الفئران بتركيز 15 ملغم/0.5 مليلتر من المستخلص المائي الحار وبواقع 4 فئران لهذا التركيز ، وبعد مضي ساعتين تم حقن الفئران داخل البريتون بتركيز 125مايكروغرام / 0.5 مليلتر لكل فأرة من عديد

السكــريد الشحمي . وبتكرار العملية السابقة ولكن بحقــن 10 ملغم/0.5 مليلتر لكـل فـأرة من المستخلص الكحولي مع أستخدام السيطرة المتمثلة بحقن الفئران بالمستخلصات النبــاتية مع الدارئ كما في الجدول (3-3) في الفقرة ( 3-2-10) من طرائق العمل وبعد مرور ثلاثة أيام لــوحظ أن مستخلص الشاي الأخضر يساعد على زيادة خلايا الـدم البيض والتي كـان سبب إنخفــاضها المعاملة بعديد السكريد الشحمي ، ولكن وجد أن الزيادة في عدد خلايا الدم البيض والناتجة عن المعاملة المسبقة بتركيز 15 ملغم/0.5 مليلتر من المستخلص المـائي كانت أقل من الزيــادة الحاصلة في عدد خــلايا الـــدم البيض والنــاتجة عن المعــاملة المسبقة بتــركيز 10 ملغم/0.5 مليلتر مــن المستخلــص الكحــولـــي وبـأجــراء التحـــليل الاحصـــائي ( أختبار L.S.D ) ، لم يــلاحظ وجــود فرق معنوي في عدد خلايا الدم البيض بعد مرور ثلاثة أيام من الحقن مقــارنة بالسيطرة (الفئران المحقونة و المجرعة بالدارئ) (شكل 4-11) ، أذ بلغ عدد خلايا الدم البي $5.287 \times 10^3$ خلية /ملم$^3$ الناتجة عن العاملة المسبقة بالمستخلص المائي الحــار، في حين بــلغ عدد خلايا الدم البيض و النــاتجة عن العاملة المسبقة بالمستخلص الكحولي $6.12 \times 10^3$ خلية /ملم$^3$ مقارنة بالسيطرة والتي بلغت $6.54 \times 10^3$ خلية /ملم$^3$ و بهذا نجد أن الشــاي الأخضــر قــد عمل على تحفيز المنــاعــة الـــذاتية للجسم و المتمثلــة بخـلايا الـدم البيض حيــث أشــار El-Kott and Bin Meferij , (2008) الى حدوث زيادة في عـدد خلايا الدم البيض النـاتجة عن المعاملـة بالمستخلص الخــام للشــاي الأخضر أضافة الى الــزيادة الحاصلة فـي عدد خلايا الدم الحمراء .



**شكل (4-11) تأثير المعاملة المسبقة بالشاي الأخضر على عدد خلايا الدم البيض في الفئران المعاملة بعديد السكريد الشحمي**

أما فيما يخص المجموعتين 4,3 اللتين عـوملتا كسيطرة بواسطة معاملة الفئران بالمستخلص النباتي المائي الحار و الكحولي مع الـــدارئ لـوحـظ وجــود فـرق معنـوي واضح ($p<0.05$) أذ بـــلغ عــدد خــلايا الـــدم البيــض $7.61 X 10^3$ خلية /ملم$^3$ للمستخلص الكحـولي و $6.725 X 10^3$خلية / ملم$^3$ للمستخلص المائي مقارنة مع السيطـرة (الفئران المحقونة و المجرعة بالدارئ) التي بـلغ عدد خلايا الدم البيض فيها $6. 035 X 10^3$ خلية /ملم$^3$ (شكل4-12).






**شكل (4-12) تأثير مستخلص الشاي الأخضر الخام في عدد خلايا الدم البيض**

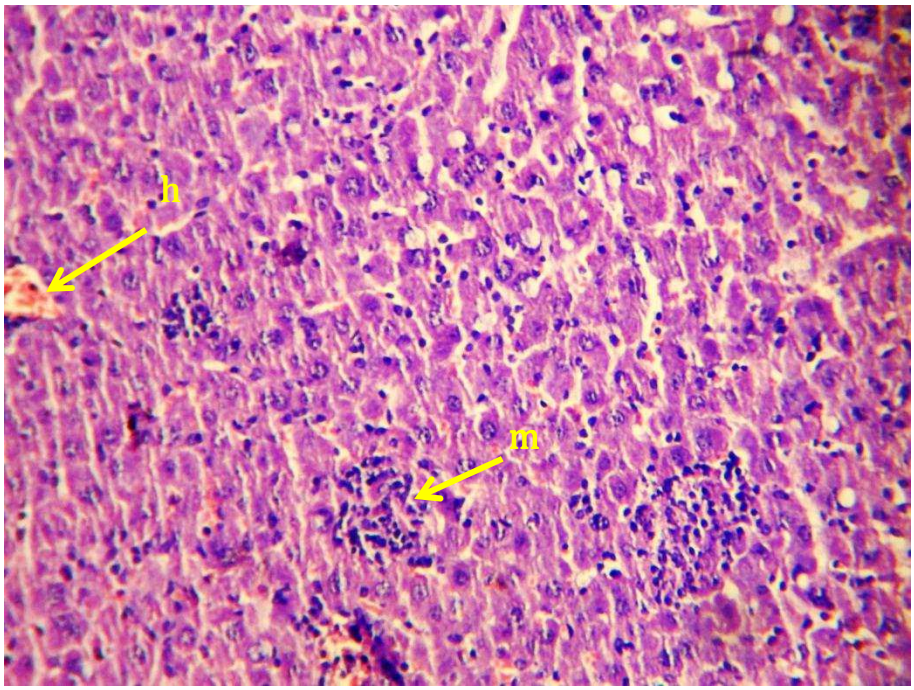
أما فيما يتعلق بدراسة تأثير المستخلص المائي الحـار والكحـــولي على الأعضـاء المنتخبة مـن الفئران ( الكبد والطحال ) بعد مرور ثلاثة أيام ، لوحظ أن المعاملة المسبقة بالمستخلص المائي نتج عنها تأثيرات مرضية قليلة بعد حقن عديد السكريد الشحمي LPS ، حيث لوحـــظ النزف الدموي وارتشاح الخلايا اللمفاوية في الكبد ، أما في الطحال فقد لـوحظ وجود أحتقــان دمـــوي مع بقــاء حجم الفصوص وعدم تضخمها .الأشكال (4-13) (4-14)

.

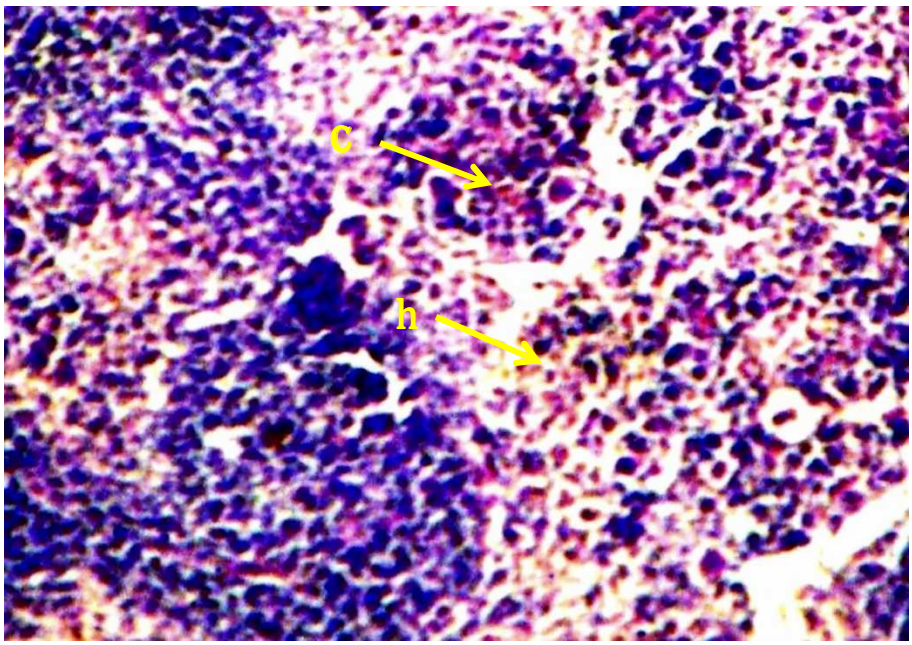
أما المعاملة المسبقة بالمستخلص الكحولي فقد لوحظ عدم وجود اي من الحالات المرضية وهذا يدل على أن فعالية المستخلص الكحولي الوقائية ضد عديد السكريد الشحمي و التي كانت أقوى من فعالية المستخلص المائي الحار الأشكال (4-15) (4-16) ، إن المذيبات العضوية تعد مذيباً جيداً للمركبات متعددة الفينول والتي هي المركبات الأساسية لأوراق الشاي الأخضر، حيث لوحظ أن المستخلص الكحولي للمشمش يحتوي على مركبات الـ Polyphenols مقارنة بالمستخلص المائي علماً أن محتوى المستخلص من هذه المركبات يزداد بأزدياد مدة الأستخلاص (Lapornik *et al* ., 2005) وهذا يشير الى أن تركيز المادة الفعالة في المستخلص الكحولي أعلى منه في المائي وبهذا يكون أكثر تأثيراً. حيث أوضحت دراسة أجراها Turkmen *et al* ., (2007) أن المستخلصات الكحولية للشاي الأسود أظهرت فعالية تثبيط متنوعة أعتماداً على نوع المذيب وتركيزه حيث تم أستعمال مذيبات عضوية مختلفة وبتراكيز مختلفة فضلاً عن نوع الكائن المجهري حيث أن الأحياء المجهرية السالبة لملون غرام أكثر مقاومة من الموجبة لملون غرام لأحتواء الغشاء الخارجي لها على عديد السكريد الشحمي .

بعد أرتباط عديد السكريد الشحمي بالنواقل البروتينية مثل (LBP و sCD14) والتي تعمل على نقله الى المستقبلات البروتينية الموجودة على سطوح الخلايا الدفاعية مثل معقد ( TLR4 – MD2 complex ) الذي يكون متخصصاً للأرتباط بعديد السكريد الشحمي LPS (Cohen , 2002) من جهة أخرى أوضح ( Feng , 2003) أن معدلات CD14 تكون منخفضة طبيعياً و لكن بعد التعرض لعديد السكريد الشحمي يزداد التعبير الجيني لـ CD14 أعتماداً على تراكيز الجرعة المحقونة و يزداد التعبير الجيني للـ TLR4 أيضاً تحت الظروف نفسها و يعقب هذه التفاعلات داخل الخلوية ، والتي تؤدي الى تنشيط وتفعيل (Nuclear factor – Kappa B) (NF-KB) زيادة التعبير الجيني لأنتاج أنواع من الوسائط الألتهابية و الناتجة عن الأستجابة المناعية (Immune response) لعديد السكريد الشحمي المتمثلة بتشكيلة واسعة من الخلايا الدفاعية مثل خلايا البلاعم الكبيرة (Macrophages) و خلايا وحيدة النواة (Monocytes) و الخلايا العدلة (Neutorphiles) و التي تكون حساسة في الأستجابة لعديد السكريد الشحمي محفزاً إياها على أنتاج أنواع من الوسائط الألتهابية (Proinflammatory mediators) مثل السايتوكينات (Cytokines) والتي تشمل عامل النخر الورمي الفا TNF- $\alpha$ ، الأنترليوكينات مثل IL-1,

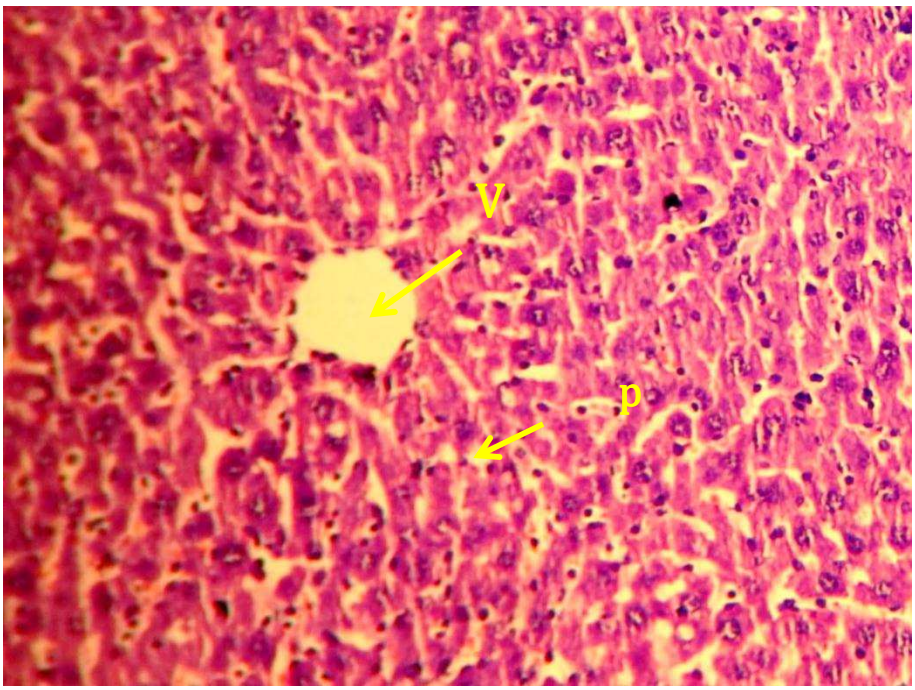
IL-6, IL-8 ( Qureshi *et al*., 2010 ; Rose *et al*., 1995 ) وكـــذلك إنتـاج اوكسيد النتريـــك (Nitric oxide (NO)) الـذي يعـد من العنـاصر الحـرة و المنتـــج من قبـل الخـلايا الـــدفاعيـة للمضيف عقـب التعرض لعـديد السكـريد الشحمـي ، حـيث يـلعب دوراً هامـــاً فـــي دفاعات المضيف و أن الإنتـــاج المفـرط لـه نـــاتج عن الأمـــراضية المتمثـلـة بالتسمـــم البكتيري (Bacterial sepsis) و الألتهابـــات المزمنـــة (Chronic inflammation) ، إن هـذا النـوع من الـوسائط الألتهابيـة ينتـج من قبـل (Nitric oxide synthase) ومن أهم أشكاله هو (inducible nitric oxide synthase)(iNOS) الـذي يعمـل عـديـد السكريد الشحمي أو الـــوسائط الألتـــهابيـة علـى تـنـشيـطـه (Jean-Baptiste , 2007 ; Osama ,1991 ) ، كمـــا أوضحـــت العـديد من الـدراسات أن TNF– $\alpha$ ضروري في حدوث الصـدمة ( Shock) أو الأعراض المرضية الناتجة أثنـاء التعـرض لأصـابة بكتيرية أو جرعـــات قاتـــلة من عديد السكريد الشحمي ومن خـــلال النتـائج التـي تـم التوصل اليها وجد أن المعاملة المسبقة بالمستخلص المائي والكحـــولـــي الخـــام للشـــاي الأخضـر تثبط التـأثيـرات المرضية الناتجة عـــن عديد السكريد الشحمي داخـــل أجســـام الفئران ، مـع الأخذ بعين الاعتبار أن المستخلص المائي الحار و الكحولي في هذه الدراسة أستخدمـــا كمستخلص خـام لـدراسة تأثيراتهما الوقـائية تجـاه تـــأثيرات عـديد السكريد الشحمي ، إذ إن المركبات المتعددة الفينول تمنـــع التأثير النـــاتج عن عـــديد السكريد الشحمي LPS المعروف بتفعيلـه (Activate) لخـــلايـــا البـــلاعـم الكـبيـرة (Macrophage ) وخـــلايـــا ( Kupffer cells ) والذي يحفـــز على تصنيع وإنتـــاج الوســـائط الألتهابية كالســـايوكاينات مثل TNF $\alpha$ - والأنـــترليوكينـــات IL-1 ، IL-6 و NO ، إذ وجـــد أن المـــعامـــلـــة المسبقـة لمـركبات Polyphenol للشـــــاي الأخضر يخـــــتزل أرتفـــــاع TNF- $\alpha$ فـــي المصـــل وكـذلك NO حيث وجـد أن مركبات (Catchine) وخصوصاً EGCGتعمل علـــى تـقـليل وتثبيـــط فـعـــاليـــة الأنـترليـوكينـــات IL-I, TNF- $\alpha$ و NF-kB . (Hussein *et al*., 2011 ; Meki *et al*., 2009 ; Yuan *et al*., 2006b) .



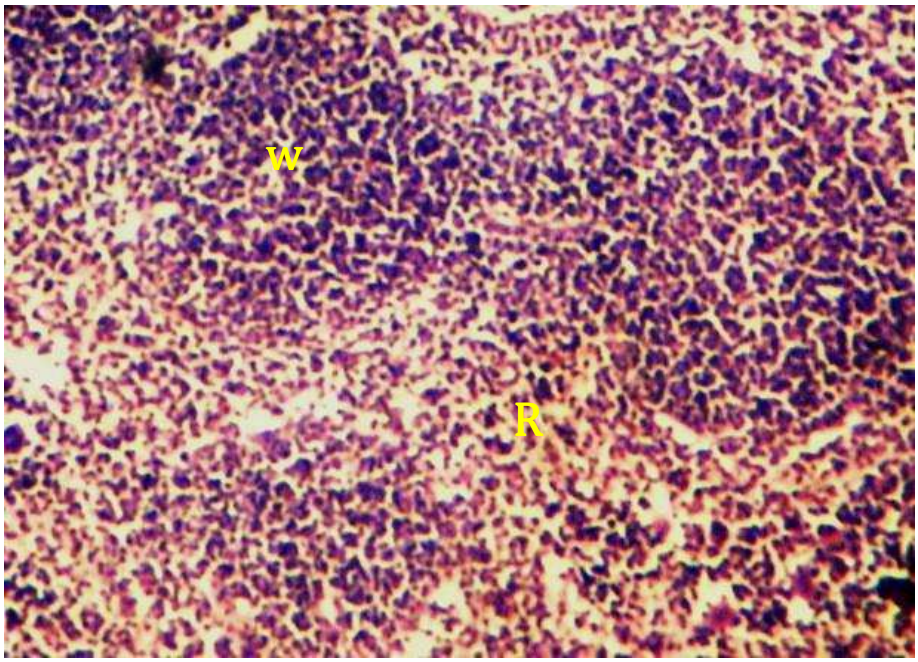

شكل (4-13) مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام/ 0.5 مليلتر من عـديد السكـريد الشحمـي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* ومعاملة مسبقة بالمستخلص المائي الحار للشاي الأخضر بتركيز 15 ملغم/0.5 مليلتر ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ، ، يوضح h : النزف الدموي ، m : هجرة الخلايا الالتهابية .



شكل (4-14) مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عـديد السكـريد الشحمـي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* و معاملة مسبقة بالمستخلص المائي الحار للشاي الأخضر بتركيز 15 ملغم/0.5 مليلتر ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ،.يوضح h : النزف الدموي و c : الأحتقان الدموي .




شكل (4-15) مقطع نسيجي لكبد فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عـديد السكـريد الشحمـي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* ومعاملة مسبقة بالمستخلص الكحولي للشاي الأخضر بتركيز 10 ملغم/0.5 مليلتر ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X يوضح P : الخلية الكبدية ، Vالوريد المركزي.



شكل (4-16) مقطع نسيجي لطحال فأرة محقونة بـ 125مايكروغرام / 0.5 مليلتر من عـديد السكـريد الشحمـي الخام لبكتريا *P.aeruginosa* و معاملة مسبقة بالمستخلص الكحولي للشاي الأخضر بتركيز 10 ملغم/0.5 مليلتر ، مصبغ بالهيماتوكسيلين و الأيوسين ، بقوة تكبير 100X ، يوضح W : اللب الأبيض ، R : اللب الأحمر .

# الأستنتاجات و التوصيات

## الأستنتاجات

نستنتج من الدراسة ما يلي :

1. كانت الجرعة المهلكة الكلية $LD_{100}$ و النصفية $LD_{50}$ من عديد السكريد الشحمي الخام من جرثومة *P. aeruginosa* 175مايكروغرام/0.5 مليلتر و 137.5 مايكروغرام/0.5 مليلتر على التوالي .

2. أتضح من خلال الدراسة المرضية النسيجية (Histopathology) لكل من الكبد و الطحال وجود تأثيرات مرضية واضحة و الناتجة عن المعاملة بعديد السكريد الشحمي .

3. من خلال الدراسة النسيجية تم تحديد الجرعة الوقائية المثلى للمستخلص المائي الحار كانت 15ملغم/0.5 مليلتر بينما للمستخلص الكحولي بلغت 10ملغم/0.5 مليلتر .

4. أظهرت نتائج الدراسة كفاءة المستخلص الكحولي في التقليل من التأثيرات المرضية لعديد السكريد الشحمي أكثر من المائي الحار .

## التوصيات

1. أختبار كفاءة الشاي الأخضر في الحد من بعض عوامل الضراوة الأخرى البكتيرية أو بعض السموم الخارجية .

2. التحري عن أمكانية أستخدام الشاي الأخضر في الحد الأصابات الجرثومية المختلفة .

3. أجراء دراسة مفصلة عن تأثيرات الشاي الأخضر على الخلايا المناعية و منتجاتها من الوسائط .

4. محاولة تنقية المواد الفعالة الموجودة الشاي الأخضر و أختبار تأثيرها في بعض الأصابات الجرثومية .

# المصادر

# المصادر العربية

**أنغام،جاسم محمد علي.(2004).** تأثير مستخلص الكحول الاثيلي لنبات الدارسين *Cinnamon spp* في نمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* داخل جسم الفئران و خارجها ، رسالة ماجستير. كلية العلوم – جامعة الكوفة .

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

**السعدي ، حلى يونس فاضل .(2002).**دراسة التأثيرات المرضية لمتعدد السكريد الشحمي المستخلص من بكتريا *Aeromonas hydrophila* المعزولة من عينات سريرية محلية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد.

**الطريا ، رنا خالد احمد غائب.(2002).** تأثير بعض المستخلصات النباتية في نمو جرثومتي *Proteus Mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من مناطق مختلفة من جسم الإنسان،رسالة ماجستير،كلية التربية -جامعة الموصل.

**العباجي ، فارس ذونون و الجماس ، مي عطاالله.(1999).** بعض إصابات المستشفى و الوقاية منها. مجلة الدواء العربي.18 (2):160 .

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

**الكرخي ، منال خالد محمد. (2001).** دراسة أمراضية بكتريا *Acinobacter baumannii* المعزلة محلياً، رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد .

**مالك ، سلمى نصر الله .(2006).**دراسة فعالية عديد السكريد الشحمي لبكتريا *Proteus mirabilis* في الوقاية من خمج المسالك البولية في الأنموذج الحيواني ، رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة بغداد .

**محمود ، زيد شاكر ناجي و خليل، محمد عبد الجليل.(2010).** تأثير المستخلصات المائية الكحولية لنبات الهيل*Elettaria cardamomum* في نمو البكتريا المعزولة من التهابات الأذن الوسطى،مجلة أبن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية،المجلد (23)، العدد(1).

**المسلماوي ، ذكرى عدنان جواد.(2007).** دراسة بعض الصفات الكيموحيوية و الحياتية و الامراضية لعديد السكريد الشحمي المستخلص منه جرثومة *Citrobacter freundii* ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم – جامعة بغداد.

**وحيد ، ليلى عبد الكريم.(2008).**أطلس علم البكتريا الطبي ،وزارة الصحة ، دائرة مدينة الطب، مديرية المختبرات التعليمية .

# المصادر الأجنبية

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

**AbduJabbar, T.N.(2008)**.Comparative Studies of the Chemical Constituents of GreenTea.Msc.Thesis. King Abdul Aziz University – Jeddah.

**Abraham, T. ; Schooling, S. R. ; Nieh, M. ; Kucˇerka,N. ; Beveridge,T.J.and Katsaras, J.(2007).**NeutronDiffraction Study of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide BilayersJ.Phys.Chem. B . 111:2477-2483.

**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.

**Adak, M. and Gabar, M. A. (2011).**Green tea as a functional food for better health:Abrief review. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2(2):645-664.

**Adebayo, A. H. ; Abolaji, A. O. ; Opata ,T. K. and Adegbenro, I. K.(2010)**. Effects of ethanolic leaf extract of *Chrysophyllum albidum* G. on biochemical and haematologicalparameters of albino Wistar rats.African Journal of Biotechnology Vol. 9(14): 2145-2150 .

**Al-Dughaym , A. M. and Homeida , A. M.(2008).** Some Immuno-suppressive trends : Effects of Endotoxinon Camels (*Camelus dromedarius*). Saudi Journal of Biological Sciences .15 (1): 87-90.

**Ahmed,I.;Mhmood,Z. and Mohammad,F.(1998).**Screening of some Indian Medicinal Plants for their Antimicrobial Properties.J.Ethanopharmacol.62:183-193.

**Anon.(2000).***Pseudomonas aeruginosa*.Information Bulletin.

**Anon.(2002**).Green Tea (*Camellia sinensis*).Alternative Medicine Review Monographs.

**Anon.(2003).**Tea, Black/Green.The ABC Clinical Guide to Herbs

**Anon.(2008).** *Pseudomonas aeruginosa* - Wikipedia, the free encyclopedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa.

**Arai, K.; Matsuki,N.; Ikegaya,Y. and Nishiyama, N.(2001).** Deterioration of Spatial Learning Performances in Lipopolysaccharide –Treated Mice. Jpn. Pharmacol. 87;195 – 201.

**Atlas, R. M. (1995)**. Principles of Microbiology. Mosb-Year Book, Inc. U.S.A.

**Axelrod, M.; Berkowitz,S.; Dhir,R.; Gould,V.; Gupta,A.; Li,E.;Park,J.;Shah,A.; Shi,A.; Tan,C.; Tran,M .(2010)**. The inhibitory effects of green tea (*Camellia sinensis*) on the growth and proliferation of oral bacteria .3:1-19.

**Babitha ,N .; Swamya, D.N. and Chakrapania ,S. (2009).**Role of Green Tea as an Antioxidant in Periodontal Disease.Jr.of Orofac. Sci. 1(2) :39-42.

**Baltch, A.L.; Franke, M.; Smith, R.P.; Asperilla, M.; Griffin, P.; Michelsen, P. and Lutz, F. (1996).** Serum antibody concentrations of cytotoxin , exotoxin A , lipopolysaccharide, protease and elastase and survival of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Clin. Infect.Dis.23: 1109-16.

**Bode, C.E. ; Brabetz, W. and Brade, H.(1998).**Cloning and Characterization of 3-Deoxy-D-Manno-Octalusonic Acid (Kdo). Transferase Genes (Kdta) From A cinetobacter

Baumanni and A cinetobacter Hemolyticus. Eur. J. Biochem. 254: 404-12.

**Bradford, M.M.(1976).**A Rapid and Senstive Method for Quntita tion of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein- Dye Binding .Analytical Biochemistry.72 : 248-254.

**Bradshaw,L.J.(1973)**.Laboratory of Microbiology. 2nd edition. W.B.Saunders Company.

**Brannon ,C.( 2008 )**.Green Tea: New Benefits From an Old Favorite. Nutirition Dimension .Inc.1-26.

**Braude, A.I.; Davis, C.E. and Fierer, J. (1981)**. Medical microbe ology and infectious disease. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 365-378.

**Brooks,G.F.;Butel.I.S.,and,Moese,S.A.(1998)**.Jawetz,Melnik, and A delberg's Medical.21st ed.Middle East ed; Appleton Larg.

**Burvenich , C. ; Spiegeleer,B.D.; Peelman,L. and Paape,M.J.(2008).** Innate immunobiology of the bovine mammary gland and E. coli infections.

**Campbell, A.P.; Wong, W.Y.; Houston, Jr.M.; Schweizer, F.; Cachia, P.J.; Irvin, R.T.; Hindsgaul, O.; Hodges, R.S. and Sykes, B. (2004).** Interaction of the receptor binding domains of *Pseudomonas aeruginosa* pili strains PAK, PAO, KB 7 and P1 to a cross-reactive antibody and receptor analog:implications for synthetic vaccine design.J.Mol.Biol. 267: 382-402.

**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 Experi mental Microbiology and Immunology (JEMI). 2:144-156.

**Chang, K. and Yabuki, N. (2003)**. Tea Commodity Notes: Production declined in 2002.Food and Agriculture Organization of the United Nations.

**Chapman. Trans. N.Y. (1946)**. Acad. Science. 9:52.

**Chopra,H.L.(1985)** . A text book of medical microiology .1s ed. Seema publications , Delhi.

**Ciornei1, C. D. ; Novikov, A. ; Beloin, C. ; Fitting , C. Caroff, M. ;Ghigo,J. ; Cavaillon, J. and Adib-Conquy, M.(2009).**Biofilm-Forming *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria Undergo Lipopolysaccharide Structural Modifications and Induce Enhanced Inflammatory Cytokine Response In Human Monocytes. Innate Immunity.1-1.

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

**Collee, J.G.;Fraser,A.G.;Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996).**"Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology".14th ed., Churchill Livingstone , New York,pp. 413-423.

**Cooper,E.(1978).** *The Camellia -A Condensed History*. American Camellia Yearbook. P:98-105.

**Corazza,M.;Carla,E.;Rossi,M.R.; Pedna,M.F. and Virgili,A (2003).** Face and body sponges : beauty aids or potential microbiological reservoir. Eur. J.Dermatol . 13: 571–3.

**Corporation,K.(2007).**Generally Recognized As SafeStatus of Green Tea Catechin.Morgan Lewi Counselos at Law.1- 153.

**Cotton,L. A. ; Graham, R. J. and. Lee, R. J.(2009).**The Role of Alginate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin.Journal of Experimental Microbiology and Immunology(JEMI). 13:58-62.

**Davidsohn,I.(2001).**Clinical Diagnosis By Laboratory Methods. 15ed.Saunders Company. London. Toronto.

**Dentener, M.A.;Vreugdenhil ,A.C.; Hoet, P.H.; Vernooy ,J.H.; Nieman, F.H.; Heumann, D.; Janssen, Y.M.;Buurman,W.A. and Wouters ,E.F. (2000).**Production ofthe acute-phase protein Lipopolysaccharide - binding protein by respiratory type II epithelial cells :implications for local defense to bacterial endotoxins. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.23:146-153.

**Devenish J.A. and Barnum, D.A.(1986).**Evaluation of the API 20E System for the Identification of Gram-Negative Nonfermenters from Animal Origin. Can.J.comp.Med. 46:80-84 .

**Dimitracopoulos, G. and Bartell ,R .F. (1980).**Slime glycolipoproteins and the pathogenicity of various strains of *Pseudomonas aeruginosa* in experimental .Infection and Immunity.30:402-408.

**Drury, R.A. And Wallington, E.A. (1980).**Calton's Histological Techniques, 5th ed. Oxford Univ . Press.

**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.

**Dyke, J. W and Berk, R. S. (1973).** *Z. Allg. Mikrobiol.* 13: 307-313.

**El-kott,a.f. and Bin-meferij.(2008)**.Influence of green tea on haematological and lung histological disorders induced by malathion in rats. research journal of environmental toxicology. 2(2):85-91.

**Feng, J. ;Shi, J. and Liu, Y. (2003).**The effect of lipopolysaccharide on the expression of CD14 and TLR4 in rat Kupffer cells . HBPD .Int. 2:265-269.

**Fenton, MJ. Golenbock ,DT. (1998).** LPS-binding proteins and receptors. J Leukoc Biol;64:25-32.

**Feuk-Lagerstedt, E. (2010).** Parallel Comparison of Accuracy in Vitek2 Auto analyzer and API 20 E / API 20 NE Microsystems. MSc. Thesis. School of Engineering ,University College of Borås.

**Fisher, T. (2008).**Synopsis of Causation .Otitis Externa.Ministry of Defence.1-11.

**Fitzwater, J. Purdue, G.F. Hunt, J.L. and O'Keefe, G.E. (2003).** "The risk factors and time course of sepsis andorgan dysfunction after burn trauma." J Trauma 54 (5) :956-966.

**Fleiszing, S.M.J.; Wiener-Kronish, J.P.; Miyazaki, H.; Vallas, V.; Mostov, K.E.; Kanada, D.; Sawa, T.; Yen, T.S.B. and Frank, D.W. (1997).***Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. Infect. Immun. 65(2): 579-586.

**Forbes,B.A.,Sahm,D.F.,andWeissfeld,A.S.(1998)**.DiagnosticMicrobiology. 10th edition.Mosby.448-460.

**Forkner, C.E. (1960)**. *Pseudomonas aeruginosa* infections. In Modern medical monographs No. 22, ed. I. S. Wright. Grune and Stratton, New York and London.

**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. 51–7.

**Galloway ,D.R.(1991).***P.aeruginosa* elastase and elastolysis revisted:vecent development.Mol Microbiol., 5:2315-21.

**Gao,C.; Kennedy,S. and Ponder, 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.

**Garbe,J. ; Wesche,A. ; Bunk, B. ; Kazmierczak, M. ; Selezska, K. ; Rohde ,C. ; Sikorski,J. ; Rohde, M. ;**

**Jahn,D. ; Schobert, M.(2010).**Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions.Garbe *et al*. BMC Microbiology. 10:301.

**Garcia-Verdugo,I. ; Sanchez-Barbero, F. ; Soldau , K. ; Tobiasp, S. and Casals, C. (2005).**Interaction of SP-A (surfactant protein A)with bacterial rough lipopolysaccharide (Re-LPS), and effects of SP-A on the binding of Re-LPS to CD14 and LPS-binding protein.Biochem. J. 391:115–124.

**George, M. G.;Julia,A. B. and Timothy, G. L.(2004**).Bergy's manual of systemic bacteriology.2nd ed.New York . 24-95.

**Grandis, J. R. ; Branstetter IV ,B. F. and Yu, V. L.(2004).**The changing face of malignant (necrotising) external otitis: clinical, radiological, and anatomic correlations.*Lancet Infect* Dis . 4:34–39.

**Groeneveld, P. H. P. ; Claassen, E. ; Kuper, C. F. and Van Rooijen, N.(1988).**The role of macrophages in LPS-induced lethality and tissue injury.Immunology.63:521-527.

**Gruenwald,J.;Brendler,T. and Jaenicke,C.(1998).** PDR for Herbal Medicines.1stEdition.Medical Economics Company. Montvale,New Jersey.

**Gupta, J. ; Siddique,Y. H. ; Beg,T.; Ara ,G. and Afzal,M Afzal,M.(2009)**. Protective role of green tea extract against genotoxic damage induced by anabolic steroids in cultured human lymphocytes.Biology and Medicine,Vol 1(2): 87-99.

**Gupta,V.Bansa,P.;Niazi,J.and Kumar,S.(2010).**Phytochemistry and pharmacology of *Camilla sinensis* - Review.Scholars Research Library Annals of Biological Research.1(2):91-102.

**Hadi,U.;Chaar,M.;Jaafar,R.F.andMatar,G.M.(2004).**Comparative Analysis of Hospital-Acquired and Communit Acquired *Pseudomonas aeruginosa* Strains in a Tertiary Care

Medical Center. The Journal of Applied Research 7(3) :233-237.

**Harley, J.P. and Prescott, L.M. (1996).** Laboratory Exercises in Microbiology. 3rd ed., McGraw-Hill, Comp. Inc., London.

**Hashimoto,M.C.E.;Toffolia,D.J.;Pratesa,R. A. ; Courrol,L.C. and Ribeiro, M. S.(2009).**Photodynamic inactivation of antibiotic resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa in vivo*.Proc. of SPIE. 7380:1-7.

**Hassett, D.J.; Sokol, P.A.; Howell, M.L.; Ju-Fang, M.A.; Schweizer, H.T. ; Ochsner, U. and Vasil, M.L. (1996).** Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderphore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activitis. J. Bacteriol., 178(14): 3996-4003.

**Hauser, A. R. ; Cobb, E. ; Bodí, M. ; Mariscal, D. ; Vallés,J. ; Joanne Engel, N. ; Rello, J. (2002).**Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med .30(3) :521-528.

**Hernandez , M. ; Lopez , R. ; Abanas , R. M. ; Paris , V. and Arias , A. (1994)** .Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* Leafextracts . J.Ethnopharmacology . 41 : 115-119 .

**Highsmith,A. ; Le, P. N. ; Khabbaz, R and Munn,V.(1985).** Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Whirlpools and Bathers. Infection Control 6:407-412.

**Holt, J. G.; Kreig, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, T.T. and Williams, S.T. (1994)**. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9th ed., Williams and Wilkins,Baltimore, pp. 151-157.

**Huang,C. R. ; Lu, C. H. ; Chuang, Y. C. ; Tasi, N. W. ; Chang, C. C. ; Chen, S. F. ; Wang, H. E. ; Chien, C. C. and Chang, W. N. (2007).** Adult *Pseudomonas aeruginosa* . Meningitis:Hight

Incidence of Underlying Medical and/or Postneurosurgical Conditions and Hight Mortality Rate . Jpn. J. Infect. Dis. 60: 397-399.

**Humason , C.L. (1972).**Animal Tissue Technique .3rd ed. W.H. Freeman Company, P.641.

**Hussein, J. ; Abo El-Matty, D. and El-Khayat, Z.(2011).**The protective effect of some polyphenolic compounds on lipopolysaccharide -induced hepatitis in Dgalactosamine sensitized rats . Journal of Medicinal Plants Research . 5(2) : 191-199.

**Iglewski,B.H.(1980)**. *Pseudomonas*. Journal of Infectious Disease.124: 538.

**Japoni, A.; Farshad, S .; Alborzi, A .(2009)** . *Pseudomonas aeruginosa*: Burn Infection , Treatment and Antibacterial Resistance.Iranian Red Crescent Medical Journal.11(3):244-253.

**Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. (2001)**. Medical microbiology. 20th edition. McGraw - Hill companies. N.Y, U.S.A.

**Jazani,N,H.;Shahabi,S. and Ali, A.A.(2007).**Antibacterial Effect of Water Soluble Green Tea Extracts On Multi-Antibiotic Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* .Pakistan Journal of Biological Siences.10(9):1544-1446.

**Jean-Baptiste, E. (2007).** Cellular Mechanisms in Sepsis. Journal of Intensive Care Medicine 22(2):63-72.

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

**Juhi,T. ; Bibhabati,M. ; Archana,T. ; Poonam,L. and Vinita,D. (2009).***Pseudomonas aeruginosa* meningitis in post neurosurgical patients.Neurology Asia 14(2) : 95 – 100.

**Junqueira,L.C. and Carneiro,J.(2003).**Basic Histology :Text & Atlas.Eleventh Edition. Mcgraw-Hill. London. 274-323.

**Kanga,J. S. ; Jeonb, Y. J. ; Parka, S. ; Yang,K. and Kim, H .K. (2003).**Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1b and prostaglandin E2 synthesis by silymarin.Biochemical Pharmacology.67: 175–181.

**Kayser, F. H.. Bienz, K. A. Eckert, J.. Zinkernagel, R. M. (2005) .** Medical Microbiology . Thieme Stuttgart . New York.

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

**Khalil, M.Y. ; Moustafa, A.A. and Naguib, N.Y.(2007).** Growth, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants Grown under Organic Farming Condition.World Journal of Agricultural Scinences . 3(4):451-457.

**Kim, J. S. ; Jang, S. ; Kim,U. and Cho, K. (2007).**AFM Studies of Inhibition Effect in Binding of Antimicrobial Peptide and Immune Proteins. Langmuir . 23:10438-10440.

**Kim, S.W. ; Peck, K. R.; Jung, S.; Kim, Y. ; Kim, S. ; Lee, N.Y. ; and J Song,J. (2001)**.*Pseudomonas aeruginosa* As A Potential Cause of Antibiotic-Associated Diarrhea.J Korean Med. Sci . 16 : 742-4 .

**Kimura,A.; Naka,T. ;Muta,T. ;Takeuchi,O.; Akira,S.; Kawase,I.; And Kishimoto,T.(2005).** Suppressor Of Cytokine Signaling-1 Selectively Inhibits Lps-Induced Il-6 Production By Regulating Jak–Stat.Pnas .Vol. 102 (47) :17089–17094.

**King Chong 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.

**King,A.; and Phillips ,L.(1978)**.The identification of *pseudomonas* and related bacteria in aclinical laboratory J .Med. Microbiology ., 11: 165-176.

**Kipnis , E. ; Sawa, T. ; and Wiener-Kronish , J.(2006).**Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*pathogenesis. Médecine et maladies infectieuses . 36 :78–91.

**Kirkland,T.N.;Virca,G.D.;Reichel,K.T.Multer,F.K.;Kim,S.Y.; Ulvitch,R.J. and Tobias,P.S.(1990).**Identification of lipopolysaccharide binding protein in 7073 cells by photoaffinity-cross linking. G. Boil.Chem.256:9520-5.

**Knirel, Y.A. ; Kocharova, N. A. ; Bystrova, O. V. ;Katzenellenbogen, E. and Gamian, A. (2002).** Strecture and serology of the O-specific polysaccharide of bacteria of the genus *Citrobacter* .Arch. Immune. Ther.Experim. 50 :379-91.

**Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C. (1997).** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.5th ed., J.B. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A., pp. 253-274.

**Krakauer,T.;Buckley,M.J and Fisher,D.(2010).**Proinflammatory Mediators of Toxic Shock and Their Correlation to Lethality. Hindawi Publishing CorporationMediators of Inflammation.p:1-7.

**Krieg, N. R. and Holt, J.G. (2001).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Vol. 2. Ed. Williams and Wilkins Publishers, Baltimore.

**Kuc˘erka, 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.

**Lapornik, B.; Prošek, M. and Wondra, A.G. (2005)**. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. J. Food Eng. 71. 214-222.

**Lau,P. C. Y. ; Lindhout,T. ; Beveridge, T. J. ; Dutcher, J. R. and Lam, J. S. (2009).**Differential Lipopolysaccharide Core Capping Leads to Quantitative and Correlated Modifications of Mechanical and Structural Properties In *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms . Ournal Of Bacteriology. 191(21) : 6618–6631.

**Lawson, A.J. ; Chart, H. ;Dassma, M.U. and Threfall, Te. J. (2002).** Heterogeneity In Expression of Lipopolysaccharide by Strain of Salmonella Enterica Serotypetyphimurium Definitive Phagetype 104 And Related Phage Types.Lett. Appl. Microbial. 34 : 428-32.

**Levinson, W. and Jawetz, E. (2000**). "Medical Microbiology and Immunology Examination and Board Review". 6th ed., Lange Medical Books, McGraw-Hill, New York.

**Liao,C.H. and Mccallus,D.E.(1998).**Biochemical and Genetic Characterization of an Extracellular Protease From *Pseudomonas fluorescens* CY091.App.Environ.Microbial.64:1 4-921.

**Lin,Y.; Tsai,Y.; Tsay,J. and Lin,J.(2003)**.Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffein in Tea Leaves.J. Agric. Food Chem. 51:1864-1873.

**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.

**Macfaddin, J.F. (1981).** "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria". 2nd ed., Waverly Press, Inc., Baltimore, U.S.A.

**Macfaddin, J.F. (2000).**Biochemical Tests For Identificationof Medical Bacteria.3rded .Lippincott Williams and Wilkins,USA.

**Mahmood,T. ; Akhtar,N. and Khan,B.A.(2010).**The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis*' tea. Journal of Medicinal Plants Research. 4(19) : 2028-2033.

**Mansoor,T.; Musani , M. A. ; Khalid, G. and Kamal , M.(2009).***Pseudomonas Aeruginosa* In Chronic Suppurative Otitis Media:Sensitivity Spectrum Agains Various Antibiotics In Karachi.J Ayub Med Coll Abbottabad. 21(2): 120-123.

**Månsson,L. A. ; Kja, P. ; Pellett, S. ; Nagy,G. ; Welch,R.A. ; Ba¨Ckhed,F. Frisan,T. ; and Richter-Dahlfors, A. (2007).**Role of the Lipopolysaccharide-CD14 Complex for the Activity of Hemolysin from Uropathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity.75(2):P. 997–1004.

**Maruyama ,T. ; Tomofuji , T. ; Endo ,Y.; Irie , K.; Azuma ,T. ; Ekuni ,D. ; Tamaki , N. ; Yamamoto ,T. and Morita ,M.(2011).** Supplementation of Green Tea Catechins in Dentifrices Suppresses Gingival Oxidative Stress and Periodontal Inflammation. Archives of oral biology.56:48 – 53.

**Masaadeh, H. A. and Jaran, A. S. (2009)**. Incident of *Pseudomonas aeruginosa* in Post-Operative Wound Infection.American Journal of Infectious Diseases.5(1):1-6.

**Meki,A.M.A.; Hamed,E.A. and Ezam,K. A.(2009).** Effect of Green Tea Extract and Vitamin C on Oxidant or Antioxidant Status of Rheumatoid Arthritis Rat Model. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 24 (3) :280-287.

**Michel, G.; Ball, G.; Goldberg, J.B. and Lazdunski, A. (2000).** Alteration of the lipopolysaccharide structure affects of the functioning of the Xcp secretory system in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 182(3): 696-703.

**Mittal ,R. ; Aggarwalc, S. ; Sharmab, S. ; Chhibberb, S. and Harjaib, K.(2009).** Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview.Journal of Infection and Public Health . 2: 101-111.

**Mittal,R. ; Kaur,A. ; Joshi,K. ; Nada,R.; Chhibber,S. ; Harjai, K. and Sharma,S.(2008).** Experimental Non-obstructive Chronic Renal Infection Model with Planktonic and Biofilm Cells of *Pseudomonas aeruginosa*.Am. J. Biomed. Sci.1(2) : 103-114.

**Moore, B. and Forman, A. (1966).** An outbreak of urinary *Pseudomonas aeruginosa* infection acquired during urological operations.Lancet,29:929-931.

**Moore,D.M.(1997).***Pseudomonas* and the laboratory animal. Journal of Infectious Disease.131:688-691.

**Moreno,E.; Berman,D.T. and Boettcher,L.A.(1981).** Biological Activities of Brucella Abortus Lipopolysaccharides. Infection and Immunity .31(1): 362-370.

**Morihara, K. (1964).** Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 88(3): 745-757.

**Mousa, H. (1997).** Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. J Hosp Infect;37:317–23.

**Nakagawa,Y. and Shiraishi,T.; (1993).**Review of disinfectant suscebility of bacteria isolatedin hospital to commonly used disinfectants .Post gard.Med. J.69(Suppl .3.).S 70-77.

**Nazik, H. ;Öngen, B. ; Erturan, Z. and Şalcioğlu, M. (2007).** Genotype and Antibiotic Susptibility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophili* Isolated From Cystic Fibrosis Patients. Jpn. J. Infect. Dis. 60 : 82-86.

**Neher, A. ; Nagl, M. ; Appenroth, E. ; Gstöttner, M. ; Wischatta, M. ; Reisigl, F. ; Schindler, M. ; Ulmer,H. and Stephan,K.(2004).**Acute Otitis Externa: Efficacy and Tolerability of N-Chlorotaurine, a Novel Endogenous Antiseptic Agent. Laryngoscope .114:850-854.

**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-$\alpha$ production and leukopenia via endogenous adenosine in mice.the journal of pharmacology and experimental therapeutics . 300(1) :200-205.

**Obiogbolu,C. H. ; Okonko,I. O. ; Anyamere, C. O. ; Adedeji, A. O. ; Akanbi , A. O. ; Ogun, A. A. ; Ejembi, J. and Faleye, T. O. C.(2009).**Incidence of Urinary Tract Infections (UTIs) among pregnant women in Akwa metropolis, Southeastern Nigeria.Scientific Research and Essay. 4 (8) : 820-824.

**Odom,D.(2007).**Camellia sinensis.The Tea Plant. The Camellia Journal.P:18-20.

**Ogle,N.(2009).**Green tea *Camellia sinensis* . Australian Journal of Medical Herbalism .21(2) : 44-48.

**Panjwani, N. ;Zhao,Z. ; Raizman,M. B. and F Jungalwala, F.(1996).**Pathogenesis of Corneal Infection: Binding of

*Pseudomonas aeruginosa* to Specific Phospholipids .Infection and Immunity. 64 (5) :1819–1825 .

**Pavlovskis,O.R.; Voelker,F.A. and Shackelord,A.H.(1976).** *Pseudomonas Aeruginosa* Exotoxin In Mice :Histopathology and Serum Enzyme Changes. The Journal of Infection Diseases.133(3):253-259.

**Peavy, D.L .; Baughn, R.E. ; and Musher,D.M.(1978).** Mitogenic Activity of Bacterial Lipopolysaccharides In Vivo:Morphological and Functional Characterization of Responding Cells. Infection and Immunity.19(1):P. 71-78.

**Perdomo,R. and Montero,V.(2006).**Purification of e.coli 055:b5 lipopolysaccharide by size exclusion chromatography. Biotecnología Aplicada *.* 23:124-129.

**Pérez-Casanova, J.C., Hamoutene, D., Volkoff, H., Mabrouk, G., Samuelson, S., and Burt, K. (2010).** Effect of injection of lipopolysaccharides from *Aeromonas salmonicida* on some aspects of cod (*Gadus morhua*) immunity and appetite hormones. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2878:v+11 p.

**Pier,G.B. ; Sidberry, H.F. Zolyomi, S. and Sadoff,J.(1978).**Isolated and Charachterization of High-Molecular Weight Polysaccharide From The Slime of *Psedumonas aeruginosa* .Infect. Immune.22(3).908-18.

**Prescott, L.M.; Harley, J.P. and Klien, D.A. (1993).** Microbiology. 2nd ed., Wm. C. Brown Communication, Inc., England.

**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 endotoxic shock. Journal of Neuroimmunology 115: 36 –45.

**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.

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

**Reid , T. M. S. and. Porter I. A.(1981).**An outbreak of otitis externa in competitive swimmers due to *Pseudomonas aeruginosa*.J. Hyg., Camb. 86 . 357-362.

**Rietschel,E.T. and O.Westphal. (1999)**. Endotoxin: Historical perspectives. *In* Endotoxin in Health and Disease. H.Brade, S.M.Opal, S.N.Vogel, and D.C.Morrison, editors. Marcel Dekker, Inc., New York. 1-30.

**Rietschel,E.T., Brade, L. Lindner, B. and Zahringer, U. (1992**). Molecular biochemistry of lipopolysaccharides. In Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides. D.C.Morrison and J.L.Ryan, editors. CRC Press, Boca Raton,FL. 3-42.

**Rose,J.R. ; Christ,W.J.; Bristol,J.R.; Kawata,T. and Rossignol, D.P. (1995).**Agonistic and Antagonistic Activitiesof Bacterially Derived *Rhodobacter sphaeroides* Lipid A: Comparison with Activities of Synthetic Material of the Proposed Structure and Analogs. Infection and Immunity. 63(3) : P. 833–839.

**Rosenfeld, R. M. ; Brown,L. ; Cannon,C.R. ; Dolor,R. J. ; Ganiats,T. G. ; Hannley,M. ; Kokemueller, P. ; Marcy,S. M. ; Roland,P. S. ; Shiffman,R. N. ; Stinnett, S. S. and Witsell, D. L.(2006).**Clinical practice guideline: Acute otitis externa.Otolaryngology–Head and Neck Surgery . 134 :S S23 .

**Sahley,B.J. and Birkner,K.(2006).**Green Tea Healing Mirecal.The Green Tea Report Includes Latest Research On Cancer,Heart Disease,Arthritis,And More.Pain And Stress Publication,San Antonio ,Texas.

**Sarma, DN.; Barrett. ML.and Chavez, ML .(2008**). Safety of green tea extracts: a systematic review by the US Pharmacopeia. Drug Safety.;31(6):469-484.

**Sato,K.; Miyata, T. ; Tanal,I and Yonezawa,Y.(1994).** Convenient Syntheses of 3-Deoxy-D-Manno-2-Octulosonic Acid (Kdo) and 3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-2-*Nonulosonic* Acid (Kdn) Derivatives From D-Mannose. Chemistry Letters. pp. 129-132.

**Schaechter, M.; Engleberg, N.C.; Eisenstein, B.I.; Medoff, G. (1999).** "Mechanisms of Michrobial Disease". 3rd ed., Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. pp. 199-204.

**Schlegel, H. G. (1993)**. General Microbiology. 7th Edition. Cambridge University Press. U.K.

**Schneck, E. ; Papp-Szabo,E. ; Quinn,B. E. ; Konovalov, O. V. ; Beveridge, T. J.. Pink . D. A. and Tanaka, M. (2009).**Calcium ions induce collapse of charged O-side chains of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. J. R. Soc. Interface .

**Sharma, V.K.; Bhattacharya,A.; Kumar, A. and Sharma. H.K.(2007)**.Health Benefits of Tea Consumption.Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 6 (3): 785-792.

**Sharma,S. ; Kaur, R. ; Yadar, V. ; Harijai, K. ; and Joshi, K. (2004).** Contribution of Endotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* In Acute and Chronic Experimental Renal Infection . Jpn. J. Infect. Dis .57:119 – 120.

**Shooter, R. A., Faiers, Mary, Cooke, E. Mary, Breadon, Alwena L. and O Farrell, Sheila.(1971).** Isolation of *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* from Food in Hospitals, Canteens and Schools. Lancet ii, 390.

**Shu, S. C. (2007).**CamelliaLinnaeus. Flora of China 12: 367–412.

**Singleton, P.(1997).** Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicin. 4th edition.John Wiley and Sons.

**Sladek, Z. and Rysanek,D. (2008**).Expression of macrophage CD14 receptor in the course of experimental inflammatory responses induced by lipopolysaccharide and muramyl dipeptide. Veterinarni Medicina .53 (7): 347–357.

**Smith, P. B. ; Tomfohrde, K. M. ; Rhoden, D. L. and Balows, A. (1972).** API system: a multitube micromethod for identification of Enterobacteriaceae*.* Microbiol. 24:449-452.

**Soares, T.A. ; Straatsma, T. P, and Lins, R. D. (2008).**Influence of the B-Band O-Antigen Chain In The Structure and Electrostatics of the Lipopolysaccharide Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Braz. Chem. Soc*.* 19 (2) : 312-320.

**Sohn, E. J. ; Paape, M. J. ; Bannerman, D. D. ; Connor, E. E. ;Fetterer, R. H. And Peters, R. R. (2007).**Shedding of sCD14 by bovine neutrophils following activation with bacterial lipopolysaccharide results in down-regulation of IL-8. Vet. Res. 38 : 95–108.

**Talib, V.H.(1996).**Basic Fundamental Techniques P:107-116.In:A Handbook of Medical Laboratory Technology,1st Ed.,WHO India.

**Vostrugina, K.; Gudaviciene, D. and Vitkauskiene ,A. (2006).** "Bacteremia in patients with severe burn trauma."Med Kaunas 42(7): 576-579 .

**Tanaka, E.; Kawamoto, S.; Fukushima, J.; Hamajima, K.; ONishi, H.; Miyagi, Y.; Iami, S.; Morihara, K. and Okuda, K. (1991).** Detection of elastase production in *Escherichia coli* with the etastase structural gene from several non-elastase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*.J. Bacteriol., 173(19): 6153-6158.

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

**Todar ,K. (2004) .** Text Book of Bacteriology . University of Wisconson –Madison , Department of Bacteriology .U.S.A.

**Tortora, G.J.; Funke, B.R. and Case, C.L. (1998).** "Microbiology An Introduction". 5th ed., Benjamin Cummings Publishin Company, California, pp. 422-438, 531-554.

**Turkmen,N. ;Velioglu,Y.S. ; Sari , F. and Polat,G.(2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea.Molecules .12, 484-496.

**Vives-Flórez,M. and Garnica,D.(2006).**Comparison of Virulence between Clinical and Environmental *Pseudomonas aeruginosa* Isolates.International Microbiology . 9:247-252.

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

**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.

**Washington, J. A.; Yu, P. K. W. and Martin, W. J. (1971**). Evaluation of accuracy of multitest micromethod system for identification of Enterobacteriaceae. Microbiol. 22**:**267-269 .

**Webb, S. (2002).** The Role of Mediators in Sepsis Resolution. Advances In Sepsis . 2(1 ) : 8-14.

**Węglarz,L. ; Parfiniewicz, B. ; Mertas, A. ; Kondera-Anasz, Z. ;M. Jaworska-Kik, M. And Dzierżewicz, Z. (2008).**Effect of Inositol Hexaphosphate on Lipopolysaccharide-Stimulated Release of TNF-α from Human Mononuclear Cells.Polish J.of Environ. Stud. 17( 2): 283-290.

**Westphal, O.;Luderitz,O.;Eichenberg,E. and Keiderling, W. (1952).** Bacterial Lipopolysaccharide : Extraction With Phenol Water and Further Application of The Procedure.Mathods. Carbohydr. Chem. 5: 83-91.

**Westphal,O.and Jann,K.(1965**).Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydr.Chem. 5:83-91.

**Wilhelm, S.; Tommassen, J. and Jaeger, K.E. (1999).** A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181(22): 6977-6986.

**Wilson, R. and Dowling, R.B. (1998)**. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. Thorax. 53(3): 312-219.

**Wilson, S.G.; Miles,S.A. and Parker, M.T. (1983).**Topley and Wilsons Principles of Bacteriology,Virology and Immunology. 7th ed., Edward Arnold (Publishers), London.2 pp. 242-263.

**Wittmann,I.;SchÖnefeld,M.;Aichele,D.;Groer,G.;Gessner, A. and Schnare,M.(2008).**MurineBactericidal/ Permeability-Increasing Protein Inhibits the Endotoxic Activity Lipopolysaccharide and Gram-Negative Bacteria.The Journal of Immunology.180: 7546-7552.

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

**Yang , F. ; De Villiers,W.J.S. ; McClain,C.J. and Varillek, G.W.(1998).** Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor- production and leathality in a murine model.the journal of nutrition.128(12) :2334- 2340.

**Yang , F. ; Oz, H.S.; Barve, S.; De Villiers,W.J.S. McClain,C.J. and Varilek,G.W.(2001).**The Green Tea Polyphenol (_)-Epigallocatechin-3-Gallate Blocks Nuclear

Factor-kB Activation by Inhibiting I_B Kinase Activity in the Intestinal Epithelial Cell Line IEC-6.Mol Pharmacol . 60(3) : 528–533.

**Yang, C,S,; Chung,J.Y.; Yang,G.; Chhabra , S.K.and Lee,M.(2000)**.Symposium: Diet, Natural Products and Cancer Prevention: Progress and Promise. Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention.J.Nutr.130:472S–478S.

**Yoon,S.S. (2010).**Anaerobiosis of *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Treatments of Airway Infection . Journal of Bacteriology and Virology . 40( 2) : 59 – 66.

**York, M.K. ; Brooks, G. F.; and Fiss, E. H.(1992).** Evaluation of The Autoscan-W/A Rapid System for Identification And Susceptibility Testing of Gram-Negative Fermentative Bacilli.Journal of Clinical Microbiology.30(11): 2903-2910.

**Yuan,G. ;Gong,Z. ; Zhou, X. ;Zhang, P. ; Sun,X. and Li,X.(2006a).**Epigallocatechin-3-Gallate Ameliorates Alcohol-Induced Liver Injury in Rats. Int. J. Mol. Sci.*7* : 204-219.

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

# *Summary*

The extraction of crude lipopolysaccharide was conducted using enzymatic digestion and hot phenol from local isolate of *Pseudomonas aeruginosa* which was isolated from a patient suffering from Urinary tract infection.

Total leathal dose $LD_{100}$ and half leathal dose $LD_{50}$ for mice were determinated from the crude extracr of lipopolysaccharide which were 175 and 137.5 $\mu$g／0.5ml respectively .Histological test of liver and spleen were examined for mice infected by 125$\mu$g/0.5ml.

Pathogenicity influences represented congestion, bleeding, immegration and infilteration of inflammatary cells in liver. While in spleen ,hyperplasia in white pulp were noticed due to mitogenetic effect of lipopolysaccharide on lymphotic B cells. 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 treatment dose of lipopolysaccharide as compared with the control treatment which gave $6.55X10^3$ cell/$cm^3$ .

In order to study the possibility and reducing the pathogenicity influences using green tea *Camellia sinensis*, the extraction of hot water and ethyl alcohol were prepared and the optimum dose 5,10,15and 20mg/0.5ml from hot water extraction were given to the mice already treated with $LD_{100}$ . The optimum doses were 15 and 10 mg/0.5 ml/mouse for hot water and alcoholic extraction respectively.

The optimum doses of green tea extraction reduced the pathogenic influences of lipopolysaccharide on the mice. The alcoholic extraction at 10 mg/0.5ml/mouse was better than hot water extraction treatment with 15mg/ml/mouse . This result was obvious from histological test as well as from the number of WBC which was more or less the same with the control treatment .

# The study of green tea extract usage possibility for protecting from pathological influences of locally isolated Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*

A Thesis

Submitted to the College of Sciences University of Kerbala in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of Master of science in Biology

By

Manaar Saad Huasein Al-Kafajy

B.SC. Baghdad University

Supervised by

Prof.Dr. A.H.Alwan

Assist.Pro.Dr. Th.A.Jawad

November 2011 AD

Thee Al keada 1432 H