جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

دور أشباح بكتيريا *Salmonella Typhimurium* في التعديل المناعي لسرطان القولون والمستقيم المستحدث في ذكور الجرذان البيض

اطروحة مقدمة إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة - علم الحيوان

كتبت بواسطة :

رنا عبد الحمزة عبد الزهرة عبد زيد الكرعاوي

بكالوريوس علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء 2003
ماجستير علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء 2014

بإشراف :

أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد

كانون الثاني 2025 م

رجب 1446هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا ﴾

صَدَقَ اللهُ العَلِيُّ العَظِيم

سورة طه: من الآية (١١٤)

الإهـداء

إلى مدينة العلم وبابها .. إلى سفينة النجاة وركابها .. رسول الرحمة محمد وآله ألأطهار (عليهم السلام)

إلى من فقده جرح لا يندمل .. إلى الغائب الحاضر الذي ترفرف روحه حولي .. ها أنا ذا أعاود كتابتها بغصة ..... (والدي الحبيب رحمه الله)

إلى ينبوع الحنان وبلسم الشفاء .. إلى ملاكي في الحياة .. إلى من كان دعاؤها سر نجاحي وتوفيقي .. إلى من لا تمل العين من رؤية وجهها ضياءً ..... (والدتي الحبيبة)

إلى معنى الحب والتفاني .. إلى من أشدُّ بهم أزري .. سندي وقوتي وفخري وملاذي بعد الله.. إلى الشموع الساطعة في حياتي ..... (أخوتي وأخواتي حفظهم الله)

إلى كل العقول النيرة والأقلام النابضة بالحياة ... وإلى كل مريض يعاني من هذا المرض .... اليكم أهدي ثمرة هذا الجهد

رنـا

شكر وتقدير

الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا ان هدانا الله الذي جعل الحمد مفتاحاُ لذكره ، والصلاة والسلام على اشرف الانبياء والمرسلين الحبيب المصطفى محمد وعلى آله الطيبين وصحبه المخلصين ومن سار على دربه واهتدى بهداه الى يوم الدين .

يطيب لي وأنا اضع مسك الختام لهذه الاطروحة أن أقدم خالص شكري وتقديري الى رئاسة جامعة كربلاء والى عمادتي كلية العلوم وكلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي وتسهيل متطلبات إكمال دراسة الدكتوراه .

كما أتوجه بعظيم شكري وفائق تقديري الى استاذتي الفاضلة الدكتورة **(هيام عبد الرضا العواد)** لاقتراحها موضوع البحث وإشرافها المباشر عليه وإغنائه بالتوصيات والإرشادات القيمة خلال مدة البحث وكتابة الاطروحة ، وكانت بعد الله (تعالى) المعين الاول لي على اتمامه ، أسال الله لها وافر الصحة والعافية ، وزادها الله علماً ورفعة ، وجعلها ذخراً لكل طالب علم .

وعرفانا مني بالجميل ، فان الواجب يقتضي ان اتقدم بالشكر الجزيل الى كل من الدكتور احمد جاسم نعمة في كلية الطب البيطري/جامعة القادسية لإبدائه النصح والمساعدة العلمية الكبيرة في انجاز هذا العمل ، والى الدكتورة سيناء جبوري محمد في كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة كربلاء لما قدمته من استشاره علمية قيمة وسديدة ، والى كل من ساعدني من قول او فعل وبالأخص الدكتوره ساره كاظم ابراهيم والست زينب ناصر محمد رضا في كلية العلوم /جامعة كربلاء ، فجزاهم الله عني خير جزاء المحسنين .

والله ولي التوفيق.....

رنا

إقرار المشرف على الاطروحة

أشهد أن إعداد هذه الاطروحة الموسومة بـ (**دور أشباح بكتيريا** ***Salmonella Typhimurium*** **في التعديل المناعي لسرطان القولون والمستقيم المستحدث في ذكور الجرذان البيض**) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة / علم الحيوان.

التوقيع:

الاسم: د. هيام عبد الرضا كريم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل :جامعة كربلاء /كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 12 / 1 / 2025

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة الى التوصية أعلاه من قبل الاستاذ المشرف ، أُحيل هذه الاطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاسم : د. علاء حسين مهدي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل :جامعة كربلاء /كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 12 / 1 / 2025

إقـــــرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الاطروحة الموسومة بـ (دور أشباح بكتيريا ***Salmonella Typhimurium*** **في التعديل المناعي لسرطان القولون والمستقيم المستحدث في ذكور الجرذان البيض**) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية ، وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم: د. مسلم مالك الاسدي

المرتبة العلمية : أستاذ

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية العلوم الاسلامية

التاريخ : / / 2025

إقرار لجنة المناقشة

نشهدُ بأننا رئيس وأعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على الاطروحة الموسومة بـ (**دور أشباح بكتيريا *Salmonella Typhimurium* في التعديل المناعي لسرطان القولون والمستقيم المستحدث في ذكور الجرذان البيض**) من قبل الطالبة ((**رنا عبد الحمزة عبد الزهرة**)) وبعد إجراء المناقشة العلمية في محتوياتها وكل ما يتعلق بها ، وجدنا انها جديرة بالقبول بتقدير (**امتياز**) لنيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة / علم الحيوان .

رئيس اللجنة

التوقيع :
الاسم : د.حيدر علي محمد
المرتبة العلمية : أستاذ
مكان العمل : جامعة كربلاء – كلية الطب البيطري
التاريخ : 23 / 3 / 2025

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. احمد جاسم نعمة
المرتبة العلمية : أستاذ
مكان العمل: جامعة القادسية – كلية التقانات الاحيائية
التاريخ : 20 / 3 / 2025

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. سيناء جبوري محمد
المرتبة العلمية : أستاذ
مكان العمل : جامعة كربلاء- كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : 23 / 3 / 2025

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د.علاء عبد الحسين كريم
المرتبة العلمية : أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء- كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : 19 / 3 / 2025

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. قيصر عبد السجاد محمد
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
مكان العمل : جامعة كربلاء- كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : 23 / 3 / 2025

عضواً ومشرفاً

التوقيع :
الاسم : د.هيام عبد الرضا كريم
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : 23 / 3 / 2025

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة كربلاء

أصادق على ما جاء في إقرار اللجنة اعلاه

التوقيع :
الاسم : د. حميدة عيدان سلمان
المرتبة العلمية : استاذ
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : 27 / 3 / 2025

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى التحري عن الدور المناعي المُحفز للقاح أشباح بكتيريا *Salmonella Typhimurium* ghosts (STGs) للحد من تأثير سرطان القولون والمستقيم المستحدث بمادة الازوكسيميثان Azoxymethan (AOM) في ذكور الجرذان البيض *Rattus rattus* التي استخدمت كنموذج لتحقيق اختبارات الدراسة الحالية والتي أُجريت في مختبرات قسم علوم الحياة في كل من كلية التربية للعلوم الصرفة وكلية العلوم / جامعة كربلاء ، وفي البيت الحيواني التابع لكلية الصيدلة / جامعة كربلاء ، وفي المركز التدريبي للشركة العراقية للتقانات الاحيائية في محافظة القادسية للمدة من بداية شهر شباط 2023 إلى بداية شهر تشرين الثاني 2023 .

تضمنت الدراسة استخدام (41) ذكر من الجرذان البيض ، وشملت محورين ، المحور الاول تمثل بالتقييم الأولي لسلامة اللقاح المحضر محلياً ولقدرته التمنيعية Immunogenicity بوساطة دراسة الاستجابة المناعية للجرذان الملقحة ومقارنتها مع الجرذان غير الملقحة وكذلك إختبار البرنامج الكامل للتلقيح ، أما المحور الثاني فشمل التحري عن النشاط المُعدّل للمناعة Immunomodulatory activity للقاح المحضر على الجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والمستقيم قبل وخلال وبعد المعاملة بالبرنامج الكامل للتلقيح بالـ (STGs) عن طريق قياس مستوى التعبير لبعض المعايير المناعية المتمثلة بـ Toll like receptor - 4 (TLR-4) و Programmed cell death ligand -1(PDL-1) و Tumor necrosis factor- alpha(TNF-α) فضلا عن دراسة بعض التغيرات في المعايير النسجية والدموية .

تم تحضير أشباح الـ *S. Typhimurium* من العزلة البكتيرية المنشطة المزودة من مركز الأمين للأبحاث والتقانات الأحيائية المتقدمة /النجف الاشرف ، باستخدام بروتوكول المختزل شبيه الإسفنج Sponge Like Reduced Protocol(SLRP) كلقاح ولتقييم كفاءته في تحفيز أو تعديل الاستجابة المناعية للجرذان المختبرية (خُصص للتجربة 6 جرذان بمتوسط أوزان 150غرام)، إذ تم إجراء اختبار القابلية التلازنية (Agglutination ability) لخلايا جرثومة *S. Typhimurium* والـ STGs باستخدام مصول مضادة قياسية ، بينت النتائج أن التلازن ظهر جلياً بوساطة وجود التجمع الحبيبي على الشريحة الزجاجية عند استخدام الاضداد القياسية مع خلايا جرثومة *S. Typhimurium* والـ STGs المحضرة ، بينما انعدمت القدرة التلازنية في مجموعة السيطرة السالبة . كما كشفت نتائج التصوير بالمجهر الالكتروني الماسح بأن هذه الخلايا الشبحية الحاوية على الثقوب الدقيقة تتميز بامتلاكها أغلفة خارجية سليمة وذات جودة عالية .

تم اختبار البرنامج الكامل للتلقيح (42 يوم) وتضمنت التجربة استخدام (15) جرذ بمتوسط أوزان 150غرام ، تم تقسيمها إلى 3 مجاميع لكل مجموعة (5) جرذان شملت (مجموعة السيطرة و مجموعة التلقيح فموياً Orally و مجموعة الحقن تحت الجلد Subcutaneous) وتم استخدام لقاح STGs مع

مساعد فروينـد (1:1) بجرعة 100 مايكروليتر/ جرذ ، إذ جُمع المصل من كل حيوان قبل كل جرعة لقاح وبعد انتهاء برنامج التلقيح (14 و28 و 42) يوم ، ثم قيست قدرة الأجسام المضادة الموجودة في المصل على التفاعل مع مستضد *S. Typhimurium* الحية باستخدام اختبار القدرة التلازنية ، وظهرت نتيجة التلازن الموجبة على الشريحة الزجاجية بوساطة وجود التضبب الحبيبي الحليبي اللون الذي شمل مجموعة التلقيح تحت الجلد التي أعطت تكتلاً واضحاً(خلال دقيقة واحدة) لتفاعل الجسم المضاد مع المستضد بعد المعاملة بلقاح STGs بالمقارنة مع اختبارات مجموعة التلقيح الفموي .

عند دراسة تأثير اللقاح STGs المحضر على بعض المعايير النسجية والدموية والمناعية للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والمستقيم، تضمنت التجربة استخدام (20) من ذكور الجرذ الأبيض ذات أوزان تتراوح بين (50-75) غرام وأعمارها (4-5) أسابيع ، تم تقسيمها الى أربع مجاميع وبواقع (5) جرذان لكل مجموعة وعُدّت المجموعة الأولى مجموعة السيطرة السالبة ، والمجموعة الثانية مجموعة السيطرة الموجبة التي تم حقنها بمادة (AOM) وبمعدل (15) ملغم/كغم من وزن الحيوان مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتاليين ، المجموعة الثالثة مجموعة الحيوانات التي تم حقنها بجرعة واحدة تحت الجلد Subcutaneous بأحجام متساوية (1:1) من STGs + مساعد فروينـد Freund's adjuvant بجرعة (100) مايكروليتر/ جرذ بعد (20) أسبوع من تاريخ الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة ثم استمر برنامج التلقيح الكامل(14 و28 و 42) يوم ، أما المجموعة الرابعة مثلت مجموعة الحيوانات المعاملة بالمادة (AOM) المسرطنة والتي تم اخضاعها للتداخل بالبكتيريا الحية عن طريق الحقن تحت الجلد بـ (1) مليلتر من العالق الجرثومي لبكتريا *S. Typhimurium* الحية وبتركيز (1×10^8 خلية /مليلتر) لمرة واحدة وذلك بعد انتهاء برنامج التلقيح الكامل ، جُمعت عينات الدم خلال التجربة وجُمعت الأنسجة بعد التضحية بالحيوانات عند نهاية التجربة لتقييم المعايير المطلوبة .

لوحظت تغيرات عيانية في نسيج قولون مجموعة السيطرة الموجبة تمثلت بفقدانه لمظهره الطبيعي فضلاً عن ظهور كتلًا متعددة من السلائل Polyps ولوحظ في المقاطع النسجية ظهور ارتشاح شديد للخلايا الالتهابية بين الخبايا مع فرط تنسجي Hyperplasia ملحوظ في البؤر الغدية للطبقة المخاطية مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ، أما المجموعة الثالثة اظهرت تغيرات نسيجية لمخاطية القولون وفرط تنسج كبير في الأنسجة الليمفاوية مع ارتشاح الخلايا الإلتهابية و تضرر في خبايا الطبقة المخاطية Mucosa ، وتبين من المقطع المستعرض لنسيج الكبد للمجموعة الرابعة وجود احتقان دموي جيبي بسيط وتحلل لبعض الخلايا الكبدية وعدم انتظام الجيبانيات المصحوب بارتشاح لبعض الخلايا الإلتهابية في المنطقة البوابية مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة ، كذلك أظهر المقطع المستعرض لنسيج طحال المجموعة الرابعة وجود تجمعات صغيرة للخلايا اللمفاوية للب الأبيض المتناثرة عبر اللب الاحمر يرافقه ارتشاح طفيف للخلايا الإلتهابية مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .

أظهرت مقاييس الإستجابة المناعية في الدم وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في العدد الكلي لخلايا الدم البيض بين مجموعات الدراسة الأربعة إذ بلغت أعلى قيمة لها في مجموعة السيطرة الموجبة بمعدل وخطأ قياسي (17.52±0.28خلية/ملم^3 دم) ، أما خلايا الدم الحبيبية Granulocyte فقد أظهرت ارتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) في المعدل والخطأ القياسي لها بلغ (7.9±1.92 خلية/ملم^3 دم) في المجموعة الرابعة عند مقارنتها مع مجموعات التجربة فضلاً عن وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في قيمة المعدل والخطأ القياسي للخلايا احادية النواة Monocyte في ذات المجموعة عند مقارنتها مع مجموعات التجربة ، في حين أظهرت كريات الدم الحمر ارتفاع غير معنوي ($P>0.05$) في كل مجموعات التجربة الأربعة وسجلت قيمة احتمالية بين المجموعات بلغت (0.28).

عند تقدير قيم مستويات التعبير عن المعايير المناعية (TLR-4 و PDL-1 و TNF-α) ، بينت النتائج عدم وجود دلالة احصائية عند مستوى معنوية ($P>0.05$) بين المجاميع الاربعة في معظم الاوقات فيما يخص دراسة تأثير اللقاح على مستويات التعبير للمعيار المناعي TLR-4 في مصل مجاميع الجرذان بإستثناء ان المتوسطات في المجاميع (المستحثة - الملقحة) كانت تميل للارتفاع مع مرور الوقت مقارنة مع السيطرة السالبة لكنها لم تكن كافية لتحقيق دلالة احصائية ، و بينت النتائج أن مستوى تعبير PDL-1 قد ارتفعت قيمهُ حسب التسلسل الزمني للتلقيح وكانت هنالك فروق معنوية بين المجاميع وفي جميع الاوقات عند مستوى معنوية ($P<0.05$) وأظهرت المجموعة الثالثة مستويات مرتفعة خلال البرنامج الكامل للتلقيح مقارنة بالمجموعات الأخرى مما يشير أيضًا إلى ارتفاع معنوي واضح ($P<0.05$) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة التي اشارت إلى وجود فروقات غير معنوية($P>0.05$) ، في حين سجلت النتائج تباينًا واضحًا في مستويات TNF-α بين المجموعات المختلفة على مدى فترة التلقيح ، فلم تُظهر مجموعة السيطرة السالبة وجود فرق معنوي في الاستجابة المناعية ($P>0.05$)، أما مجموعة السيطرة الموجبة فقد أظهرت دلالة إحصائية واضحة عند مستوى معنوية (0.05) في الإستجابة الإلتهابية ، الأكثر بروزًا هو المجموعتان الثالثة والرابعة اللاتي أظهرتا تأثير ذو دلالة إحصائية على الاستجابة المناعية .

نستنتج مما تقدم أن التلقيح تحت الجلد باستخدام لقاح شبح (STGs) *S. Typhimurium* في الجرذان يمكن أن يولد استجابة مناعية خلوية قوية للحد من الاستعمار البكتيري في الجرذان المصابة ، ويوفر أيضاً حماية كاملة ضد البكتيريا العترة الحية وبذلك يمكن الافادة من هذه الأشباح البكتيرية المستحثة كيميائياً لأن تكون كلقاح واعد ، كذلك نستنتج أن استحداث سرطان القولون والمستقيم في ذكور الجرذان البيض عن طريق حقنها تحت الصفاق بمادة (AOM) يمكن أن يؤدي إلى حدوث تغيرات في بعض المعايير النسجية والدموية والمناعية عند حقنها تحت الجلد بلقاح شبح *S. Typhimurium* وكان له تأثير تحفيزي مناعي مع سرطان القولون والمستقيم .

قائـمـــــــة المحتـــــويـــــات LIST OF CONTENTS

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
I	الخلاصة	I
II	قائمة المحتويات LIST OF CONTENTS	IV
III	قائمة الجداول LIST OF TABLES	X
IV	قائمة الاشكال LIST OF FIGURES	XI
V	قائمة الصور LIST OF IMAGES	XII
VI	قائمة الملاحق LIST OF APPENDICES	XIII
VII	قائمة المختصرات LIST OF ABBREVIATIONS	XIV
.1	**الفصـــل الأول : المقـــــــدمـــــــــة Introduction**	**4-1**
.2	**الفصـــل الثاني : استعـــــــراض المـــــــراجع Literature review**	**40-5**
1.2	تعريف السرطان Definition of cancer	5
2.2	سرطان القولون Colon cancer	5
3.2	امراضية ومراحل سرطان القولون والمستقيم	8
1.3.2	امراضية سرطان القولون	8
2.3.2	مراحل سرطان القولون	9
4.2	عوامل الخطورة Risk Factors	12
1.4.2	الجنس Sex	12
2.4.2	العمر Age	13
3.4.2	الوراثة Genetics	13
4.4.2	مستويات الحديد في الامعاء Iron levels in the intestines	15
5.2	العلاج Treatment	16

6.2	علاج السرطان بواسطة البكتيريا (BMCT)Bacteria-mediated cancer therapy	17
1.6.2	العلاج بواسطة الـ *Salmonella*	21
1.1.6.2	التوصيف Description	21
2.1.6.2	تصنيف الجرثومة Classification	21
3.1.6.2	الامراضية Pathogenesis	22
4.1.6.2	عوامل الضراوة Virulence Factors	24
5.1.6.2	توصيف النمط المصلي *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium	25
2.6.2	تأثير السالمونيلا المضاد للسرطان The anti - cancer effect of *Salmonella*	26
1.2.6.2	تأثيرات السالمونيلا تيفيموريوم في علاج سرطان القولون *S. Typhimurium* effects in Colon cancer therapy	27
2.2.6.2	التأثيرات المناعية لـ *S. Typhimurium* في علاج السرطان	29
3.2.6.2	الآليات التي تتبعها *S. Typhimurium* لعلاج السرطان Mechanisms followed by *S. Typhimurium* for cancer therapy	31
7.2	لقاحات الشبح البكتيرية Bacterial Ghost (BG) vaccines	32
1.7.2	طرائق تحضير الاشباح البكتيرية Methods for Bacterial Ghosts (BGs) Preparation	34
1-1.7.2	طريقة الهندسة الوراثية Genetic Engineering(E-lysis gene method)	34
2-1.7.2	الطريقة الكيميائية الحرجة Critical chemical method	34
2.7.2	مزايا الاشباح البكتيرية Advantages of bacterial ghost	36
3.7.2	تطبيقات الاشباح البكتيرية Applications of bacterial ghost	37
8.2	المعايير المناعية Immunological parameters	37
1.8.2	بروتين مستقبل الموت المبرمج-1 Programmed death ligand -1(PDL-1)	38
2.8.2	عامل النخر الورمي – الفا Tumor necrosis factor – α (TNF- α)	39
3.8.2	المستقبل الشبيه بالتول -4 Toll like receptor -4 (TLR -4)	39
.3	**الفصل الثالث : المــواد وطرائق العمــل Materials and Methods**	**65-41**
1.3	الاجهزة والأدوات والمواد المستخدمة Apparatuses , tools and materials	41

1.1.3	الاجهزة المستعملة	41
2.1.3	الادوات المستعملة	42
3.1.3	المواد الكيمياوية والبايولوجية Chemical and Biological materials	42
4.1.3	الأوساط الزرعية Culture Media	43
5.1.3	الصبغات Stains	44
6.1.3	العدد التشخيصية Kits	44
7.1.3	المحاليل المستخدمة في تحضير اللقاح البكتيري Solutions Used for preparation of Bacterial Ghost	45
2.3	طرائق العمل Methods	45
1.2.3	تصميم التجربة Experiment design	46
2.2.3	العزلة البكتيرية Bacterial isolate	47
3.2.3	تحضير الاوساط الزرعية Culture media preparation	47
1.3.2.3	الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Made Culture media	47
2.3.2.3	الوسط الزرعي التحضيري – وسط الحفظ والإدامة Maintenance medium	47
4.2.3	تحضير المحاليل Preparation of Solutions	47
1.4.2.3	محلول ثابت العكرة القياسي McFarland standard Solution No. 0.5	47
2.4.2.3	المحلول الملحي الفسلجي Normal saline (%0.85)	48
3.4.2.3	محاليل التقطيع النسيجي Cutting Solutions	48
5.2.3	الفحوصات التأكيدية Confirmative diagnosis	48
1.5.2.3	تشخيص البكتريا باستعمال جهاز الفايتك Bacterial Identification Using Vitek-2 Compact System	48
6.2.3	تحضير أشباح البكتريا *S. Typhimurium* Preparation of bacterial ghost (STGs)	49
1.6.2.3	تحضير المحلول الخزين Stock solution preparation	49
2.6.2.3	تحضير وجمع الكتلة الحيوية البكتيرية Bacterial biomass preparation and collection	49
3.6.2.3	تحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز الادنى للنمو MGC للمواد NaOH وSDS و H_2O_2 و $CaCO_3$	50
4.6.2.3	استخدام بروتوكول شبيه الإسفنج المختزل لتحضير اشباح بكتيريا *S. yphimurium*	50

1.4.6.2.3	طريقة عمل البروتوكول Protocol Procedure	51
5.6.2.3	تحديد تركيز الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين والبروتين Determination of the DNA and protein concentrations	51
6.6.2.3	تقييم جودة اشباح بكتيريا *S. Typhimurium* (STGs) باستخدام المجهر الضوئي Evaluation STGS quality using Light Microscope	52
7.6.2.3	تقييم جودة اشباح بكتيريا *S. Typhimurium* (STGs) باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح Evaluation STGs quality using Scanning Electron Microscope	52
8.6.2.3	مسح سطح اشباح بكتيريا *S. Typhimurium* (STGs) Scanning of *S. Typhimurium* Gs (STGs) Surface	52
9.6.2.3	فحص العقامة Sterility Test (Viability)	52
10.6.2.3	فحص السلامة Safety test	52
11.6.2.3	فحص التلازن (التراص) لتفاعل المستضد السطحي للـ STGs مع الأجسام المضادة	53
7.2.3	الحيوانات المستعملة في التجربة	53
1.7.2.3	مجاميع الدراسة	54
A-1.1.7.2.3	البروتوكول التجريبي للتلقيح بـ STGs Experimental protocol for vaccination with STGs	54
B-1.1.7.2.3	دراسة تأثير اللقاح على القابلية الاجتياحية لجرثومة *S. Typhimurium* (تجربة التحدي)	54
C-1.1.7.2.3	تحديد الفعالية الضد بكتيرية في المصل Determination of serum bactericidal activity	55
D-1.1.7.2.3	تحضير العالق البكتيري Preparation of bacterial suspension	55
E-1.1.7.2.3	استحداث سرطان القولون Induction of colorectal cancer	55
2.1.7.2.3	دراسة التداخل بين التلقيح بـ STGs والخلايا الحية لجرثومة *S. Typhimurium* ومادة (AOM) المسرطنة في الجرذان المختبرية	55
8.2.3	جمع العينات Samples collection	56
1.8.2.3	عينات الدم The Blood ' samples	56
2.8.2.3	عينات الانسجة Tissue samples	57
9.2.3	الدراسة النسجية Histological Study	57
1.9.2.3	التحضيرات النسجية Histological preparations	57
2.9.2.3	فحص بؤر الخبئ الشاذ في قولون الحيوانات المختبرية Aberrant Crypt Foci (ACF)	58

10.2.3	الفحوصات الدموية : اختبار تعداد الدم الشامل (CBC) Complete Blood Count وحساب النسبة المئوية للخلايا المحببة The granulocytes' percentage calculation	59
11.2.3	الدراسات المناعية Immunological Studies	59
1.11.2.3	تعبير المعايير المناعية TLR-4 و PDL-1 و TNF-α في مصل جرذان مجاميع الدراسة Estimation the expression of immunological markers of TLR-4, PDL-1 & TNF-α in the serum of rats of the study groups	59
1.1.11.2.3	مبدأ الاختبار Test Principle	59
2.1.11.2.3	محتويات عدة الفحص ELISA Kit Contents	60
3.1.11.2.3	تحضير المحاليل Reagents Preparation	60
4.1.11.2.3	خطوات العمل Assay Procedure	63
5.1.11.2.3	حساب النتائج Calculation Of Result	64
3-3	الموافقة الاخلاقية Ethical Approval	65
4-3	التحليل الإحصائيStatistical analysis	65
.4	**الفصل الرابع : النتائـــــــج والمنـاقشـــــــــة Results and Discussion**	**108-66**
1.4	إنتاج وتوصيف لقاح أشباح *S. Typhimurium* المُعدَّة حسب بروتوكول شبيه الاسفنج المختزل	66
1.1.4	تحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز الادنى للنمو MGC	66
2.1.4	تقييم جودة اشباح الـ STGs STGs quality evaluation	66
3.1.4	اختبارات الكشف وتقييم جودة اشباح الـ STGs	69
1.3.1.4	المجهر الضوئي Light microscope	69
2.3.1.4	المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron microscope (SEM)	69
4.1.4	تقدير السلامة والأمان Safety assessment	70
1.4.1.4	فحص العقامة Sterility (Viability) test	70
2.4.1.4	فحص السلامة Safety test	71
5.1.4	فحص التلازن Agglutination test	71
6.1.4	مجاميع الدراسة	72

1.6.1.4	البروتوكول التجريبي للتلقيح بـ STGs Experimental protocol for vaccination with STGs	72
2.6.1.4	تأثير اللقاح على القابلية الاجتياحية لجرثومة *S. Typhimurium* (تجربة التحدي البكتيري)	74
3.6.1.4	تحديد الفعالية الضد بكتيرية في المصل Determination of serum bactericidal activity	78
2.4	تأثير اختبارات التداخل بين التلقيح بـ STGs والخلايا الحية لجرثومة *S. Typhimurium* على سرطان القولون المستحث في الجرذ الابيض باستخدام مادة الـ AOM	80
1.2.4	التغيرات العيانية والنسجية Gross & Histological changes	80
1.1.2.4	التغيرات في نسيج القولون والمستقيم Changes in colorectal tissue	80
2.1.2.4	التغيرات في نسيج الكبد والطحال Changes in liver and spleen tissue	89
2.2.4	تأثير التلقيح ب STGs على مقاييس الاستجابة المناعية (في العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض)	94
3.2.4	الفحوصات المناعية Immunological tests	96
1.3.2.4	قياس مستوى مستقبل الشبيه بالتول الرابع TLR-4 TLR-4 level measurement	96
2.3.2.4	قياس مستوى بروتين مستقبل الموت المبرمج PDL-1 PDL-1 level measurement	99
3.3.2.4	قياس مستوى عامل النخر الورمي –الفا Measurement of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) levels	102
4.3.2.4	التغيرات في مستوى المعايير المناعية TNF-αو PDL-1 و TLR-4 لتجربة التحدي البكتيري	106
	الاستنتـــــــاجات والتوصيـــــــات	**110-109**
	الاستنتاجات Conclusions	109
	التوصيات Recommendations	110
	المصـــــــــــــــــــــــادر References	**146-111**
	المصادر العربية	111
	المصادر الاجنبية	112
	الملاحق Appendices	**150-147**
	الخلاصة باللغة الانكليزية	I

قائمة الجداول LIST OF TABLES

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
1-3	الأجهزة المستعملة تبعاً لاسم الشركة وبلد المنشأ	41
2-3	الأدوات المستعملة تبعاً لاسم الشركة وبلد المنشأ	42
3-3	المواد الكيمياوية والبايولوجية المستعملة	42
4-3	الاوساط الزرعية المستعملة	43
5-3	الصبغات المستعملة	44
6-3	العدد المستعملة	44
7-3	المحاليل المستعملة في تحضير اشباح البكتيريا	45
8-3	تحضير الاشباح البكتيرية باستخدام بروتوكول شبيه الاسفنج المختزل وحسب النظام الاحصائي Plackett- Burman	50
9-3	محتويات العدد التشخيصية	60
1-4	تحديد تركيز الحمض النووي والبروتين عند كل خطوة في تحضير اشباح *S. Typhimurium*	67
2-4	نتائج اختبار التلازن لمجاميع الامصال المعاملة مع جرثومة *S. Typhimurium* الحية قبل وخلال برنامج التلقيح بلقاح STGs	73
3-4	الحمل الجرثومي لجرثومة *S. Typhimurium* في متجانس الكبد والطحال للجرذان الملقحة بين المجاميع المختلفة	76
4-4	الفعالية الضد بكتيرية في مصل الجرذان الممنعة بلقاح STG بعد 42 يوم من التجربة	79
5-4	تأثير التلقيح ب STGs في العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض وكريات الدم الحمر في الجرذان البيض	95
6-4	قياس مستوى المعيار المناعي TLR-4(ml/ng) في مصل الدم للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والملقحة بلقاح STGs مقارنة مع مجموعة السيطرة وحسب التسلسل الزمني للتلقيح	97
7-4	قياس مستوى المعيار المناعي PDL-1 (ml/Pg) في مصل الدم للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والملقحة بلقاح STGs مقارنة مع مجموعة السيطرة وحسب التسلسل الزمني للتلقيح	101
8-4	قياس مستوى المعيار المناعي TNF-α (ml/Pg) في مصل الدم للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والملقحة بلقاح STGs مقارنة مع مجموعة السيطرة وحسب التسلسل الزمني للتلقيح	104
9-4	قياس مستوى المعايير المناعية TNF-α و PDL-1 و TLR-4 في مصل الدم للجرذان المستحث فيها سرطان القولون -الملقحة بلقاح STGs والمعاملة بالبكتيريا الحية مقارنة مع الجرذان المستحثة بسرطان القولون –الملقحة و جرذان مجموعة	107

	السيطرة الموجبة (حسب قيمة الاحتمالية بين مجاميع الدراسة)	

قائمة الاشكال LIST OF FIGURES

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
1-2	وبائية سرطان القولون حسب الجنس عالمياً	6
2-2	نسب اعلى عشرة انواع للسرطان تم تشخيصها لدى السكان العراقيين لعام 2022	7
3-2	العوامل الجينية وعلاقتها بتطور سرطان القولون	15
4-2	تنظيم الخلايا المناعية داخل البيئة الدقيقة للورم يتمثل باستخدام البكتيريا او مكوناتها ومشتقاتها البكتيرية ، يشمل القتل المباشر للخلايا السرطانية وتعديل البيئة المثبطة مناعياً عن طريق تنشيط الخلايا المناعية لإطلاق العوامل المناعية	19
5-2	تأثير العلاج البكتيري المضاد لسرطان القولون	20
6-2	رسم تخطيطي لهيكل السالمونيلا	21
7-2	المزايا الرئيسية لعلاج السرطان باستخدام *S. Typhimurium*	30
8-2	أمثلة على الآليات المختلفة التي تتبعها *S. Typhimurium* لعلاج السرطان	32
9-2	رسم تخطيطي لتحضير BGs باستخدام المعالجة الكيميائية وتأثير BGs على التفاعل المناعي	35
10-2	صورة بالمجهر الالكتروني للثقب الموجود في الغشاء الخلوي لخلايا السالمونيلا ، الأسهم تشير إلى الثقوب السطحية	36
1-3	تصميم التجربة	46
2-3	التخفيف التسلسلي للمحلول القياسي للـTLR4	61
3-3	التخفيف التسلسلي للمحلول القياسي للـPDL-1	62
4-3	التخفيف التسلسلي للمحلول القياسي للـ TNF-α	62
5-3	المنحنى القياسي لـ TLR-4	64
6-3	المنحنى القياسي لـ TNF-α	64
7-3	المنحنى القياسي لـPDL-1	65
1-4	النسبة المئوية للجرذان الحية بين المجاميع الملقحة وغير الملقحة وفق تجربة التحدي	75

2-4	عدد خلايا جرثومة *S. Typhimurium* الحية في براز الجرذان بين المجاميع الملقحة المختلفة	75

قائمة الصور LIST OF IMAGES

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
1-4	الخلايا الحية لـ *S. Typhimurium* (A) ، وأشباح *S. Typhimurium* (B) تحت المجهر الضوئي تظهر فيها احتفاظها ببنيتها ثلاثية الابعاد السليمة	69
2-4	المجهر الالكتروني الماسح للخلايا الحية لجرثومة *S. Typhimurium* (A) ، وأشباح STGs (B) توضح الاسهم الصفراء الانفاق عبر الغشائية trans-membrane tunnels في الـ STGs	70
3-4	تفاعل التلازن لـ BGs المحضرة من *S. Typhimurium* (A) ، السيطرة السالبة (B)	72
4-4	اختبار التلازن في المصل للبروتوكول التجريبي للتلقيح بلقاح STGs (A) السيطرة السالبة ،(B) التلقيح تحت الجلد SC ، (C) التلقيح الفموي Orally	73
5-4	نسيج القولون والمستقيم للجرذ مفتوح طولياً يظهر فيه (A) القولون الطبيعي لمجموعة السيطرة السالبة ، (B) مجموعة السيطرة الموجبة المستحث فيها سرطان القولون	80
6-4	مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة السالبة تظهر فيه البنية النسجية ذات الخبايا الطبيعية (السهم الاسود) مع الصفيحة المخصوصة (السهم الابيض)(صبغة MB قوة التكبير 10X).	81
7-4	مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة الموجبة تظهر فيه: A- تغيرات البنية النسجية للخبايا وتكوين خبايا شاذة(السهم الابيض) مع بطانة ظهارية سميكة (السهم الاسود)(صبغة MB قوة التكبير 20X). B- تغيرات البنية النسجية للخبايا وتكوين انوية داكنة في ظهارة الخبيء(السهم الاسود) مع بطانة ظهارية سميكة (السهم الابيض)(صبغة MB قوة التكبير 40X).	82
8-4	مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة الجرذان المستحثة بسرطان القولون والمعاملة بلقاح STGs تظهر فيه تبدلات نسيجية شديدة وفرط تنسج كبير في الأنسجة الليمفاوية (السهم الأسود) مع ارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأبيض) (صبغة MB قوة التكبير 20X).	83
9-4	مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة السالبة تظهر فيه البنية النسجية ذات الخبايا الطبيعية المستديرة الشكل وبتجويف مميز (السهم الاسود) مع الصفيحة المخصوصة (السهم الابيض) وخلايا كأسية طبيعية(السهم الاحمر) (صبغة E&H قوة التكبير 10X).	84
10-4	مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة الموجبة تظهر فيه: A- تلف شديد في الغشاء المخاطي للخبايا يتجلى في تآكل كبير في البطانة الظهارية (السهم الأحمر) مع توسع ملحوظ في التجويف (السهم الأسود) وارتشاح شديد للخلايا الالتهابية في الصفيحة المخصوصة (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 10X). B- تلف كبير في مخاطية الخبايا(السهم الأبيض) مع زيادة المسافات بين الخبايا (السهم	85

	الأسود)(صبغة H&E قوة التكبير 4X).	
11-4	مقطع في مخاطية نسيج القولون لمجموعة الجرذان المستحثة بسرطان القولون والمعاملة بلقاح STGs تظهر فيه: A-فرط تنسج الأنسجة الليمفاوية (السهم الأسود)، مع ارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 20X، مقطع عرضي). B- تلف الظهارة وتقشرها (السهم الأسود) تضرر الخبايا تحت المخاطية (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 20X ، مقطع طولي).	86
12-4	مقطع مستعرض في نسيج كبد مجموعة السيطرة السالبة موضحاً فيه الخلايا الكبدية المرتبة في حبال (السهم الأبيض) حول الوريد المركزي (السهم الأسود) والجيبانيات , (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).	89
13-4	مقطع مستعرض في نسيج كبد مجموعة السيطرة الموجبة تظهر توسعاً كبيرًا في الوريد المركزي (السهم الأبيض) وتجمع ملحوظ لارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأسود) واحتقان في الوريد البابي (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).	90
14-4	مقطع مستعرض في نسيج كبد المجموعة الرابعة تظهر احتقان الوريد المركزي (السهم الأصفر) وارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأبيض) واختلالًا في الحبال والخلايا الكبدية (السهم الأسود) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).	90
15-4	مقطع مستعرض لنسيج طحال السيطرة السالبة يظهر فيها اللب الابيض (الجريب اللمفاوي الطبيعي) (السهم الأسود) مع الشريان المركزي (السهم الأبيض) واللب الأحمر (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).	91
16-4	مقطع مستعرض لنسيج طحال مجموعة السيطرة الموجبة يظهر فيها حدوث استنزاف Exhaustionواضح وارتشاح الخلايا الالتهابية في اللب الأبيض (السهم الأسود) مع سماكة العضلات المحيطة بالشرايين (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).	92
17-4	مقطع مستعرض لنسيج طحال المجموعة الرابعة يظهر فيها حدوث تجمعات صغيرة من اللب الأبيض متناثرة عبر اللب الأحمر (السهم الأسود) مع تليّف Fibrosis (السهم الأبيض) وارتشاح خفيف للخلايا الالتهابية (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).	92

قائمة الملاحق LIST OF APPENDICES

رقم الملحق	العنوان	رقم الصفحة
1	تأثير التلقيح ب STGs في العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض وكريات الدم الحمر في الجرذان البيض	147
2	مستوى المعيار المناعي TLR-4 في مصل جرذان مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح	147

3	مستوى المعيار المناعي PDL-1 في مصل جرذان مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح	148
4	مستوى المعيار المناعي TNF-α في مصل جرذان مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح	148
5	مستوى المعايير المناعية TNF-α و PDL-1 و TLR-4 في مصل الدم للجرذان المستحث فيها سرطان القولون -الملقحة بلقاح STGs والمعاملة بالبكتيريا الحية مقارنة مع الجرذان المستحثة بسرطان القولون –الملقحة و جرذان مجموعة السيطرة الموجبة (حسب قيمة الاحتمالية بين مجاميع الدراسة)	149
6	تقرير الفايتك للعزلة البكتيرية	150

قائمـــــــة المختصـــــرات LIST OF ABBREVIATIONS

الاختصار	المصطلح
%	Percentage
±	Plus or Minus
16SrRNA	16 S (sedimentation rate) ribosomal ribonucleic acid
ACF	Aberrant crypt foci
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Protein kinase B or AKT
ANOVA	Analysis of Variance
AOM	Azoxymethane
APC	Adenomatous polyposis coli gene
ARG-1	Arginase-1
BGQ	Bacterial Ghost Quality
BGs	Bacterial Ghosts
BHA	Brain Heart Agar
bp	Base pair
CC	Confirm colonic cancer
CD	Cluster of differentiation

CEA	Carcinoembryonic antigen
CFU	Colony forming units
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
CRC	Colorectal cancer
CT	Computed tomography
Cx43	Connexin 43
DC	Dendritic cell
DDS	Drug delivery system
DVT	Deep vein thrombosis
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EO-CRC	Early-onset colorectal cancer
FAP	Familial adenomatous polyposis
FIT	Fecal immunochemical test
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
gFOBT	Guaiac-based fecal occult blood test
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HNPPC	Hereditary non‑polyposis colorectal cancer
IBD	Inflammatory Bowel disease
ICIs	Immune checkpoint inhibitors
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
iFOBT	Immunochemical-based fecal occult blood test
IL	Interleukin

iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IPAF	Interstitial pneumonia with autoimmune features
KRAS	KRAS proto-oncogene GTPase
LPS	Lipopolysacchariede
M1	M1-like macrophage
M2	M2-like macrophage
MGC	Minimum Growth Concentration
$MgCl_2$	Magnesium chloride
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
MMR	Mismatch repair gene
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MSI	Microsatellite instability
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF-κB	Nuclear factor κB
NK	Natural killer
NLRP	Nod – like receptor protein
NTS	Non-typhoidal *Salmonella*
p70S6K	P70 ribosomal S6 kinase
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase chain reaction
PDL-1	Programmed death ligand 1

PRRs	Pattern Recognition Receptors
RES	Reticuloendothelial system
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SEM	Scanning Electronic Microscope
SPIs	*Salmonella* pathogenicity islands
STGs	*Salmonella Typhimurium* Ghosts
T3SS	Type-III secretion system
TAM	Tumor-associated macrophages
TE	Tris-EDTA buffer
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes
TLRs	Toll-like receptors
TME	Tumor Microenvironment
TNM	Tumor, node, metastasis
TP53	Tumor protein 53
Treg	Regulatory T cells
UICC	Union for International Cancer Control

الفصل الاول

المقـــــدمة

Introduction

1.المقدمة Introduction

السرطان Cancer مرض يبدأ عندما تهرب الخلية من تنظيم إنقسامها الخلوي ، ويعزى إلى مجموعة من الاضطرابات التي تتشارك فيما بينها بنمو خلوي غير مضبوط ، تنجم عن التبدلات في الجينات التي تنظم الدورة الخلوية خلال الانقسام الفتيلي فتنقسم الخلية باستمرار مشكِّلة الورم Tumor الذي هو كتلة من الأنسجة ليس لها وظيفة واضحة في الجسم وقد يكون حميداً Benign tumors لا ينتشر أو خبيثاً Malignant tumors ينتشر الى الانسجة والأعضاء الاخرى من الجسم تسمى النقائل (الانبثاث) Metastasis ، وهذه الاورام الخبيثة المختلفة تشكل السرطانات المختلفة ، وقد يصيب أي جزء من جسم الانسان وفي أي مرحلة عمرية ، وتعزى الاسباب التي تؤدي إلى حدوث المرض الى طفرات جينية وراثية أو اضطراب في الحمض النووي ، إذ تشترك طفرات عديدة في إحداث التسرطن مما يؤدي إلى اثار تراكمية تزيد في حدة المرض وتشتمل الطفرات (الموروثة والمكتسبة) على ثلاثة أنماط من الجينات : الكاظمات الورمية Tumor repressors والجينات الورمية Oncogenes والجينات المعنية بآليات اصلاح الدنا DNA-Repair genes ، ويعنى النمطان الاول والثاني عادة بالسيطرة على التكاثر والنمو الخلويين وإن تخريب آلية هذه السيطرة هو السمة الدالة على نشوء السرطان ، وهناك بعض العوامل التي تساعد على نشوء المرض من بينها العمر والغذاء و العامل البيئي كالتعرض للمواد الكيمياوية والمواد المشعة والعدوى الفايروسية قبل أو بعد الولادة وكذلك عامل الاستعداد الوراثي للمرض لدى الفرد (الحلبي وجماعته ،2018 ؛ مصطفى ، 2020).

تمثل علاجات السرطان التقليدية كالعلاج الكيميائي والجراحة والعلاج الإشعاعي الخيار الاساسي للعلاج ، ومع ذلك فأنها تُظهر آثاراً جانبية هائلة و قيود دوائية عديدة منها مشاكل افتقارها للصفة الانتقائية للورم ونفوذها المحدود لداخل نسيجه ، وظهور المقاومة الدوائية المتعددة من قبل الخلايا السرطانية ، بالإضافة إلى ذلك ، فإن المرضى الذين يتلقون علاجات تقليدية تظهر لديهم نسبة عالية من تكرار الورم (Rommasi , 2022) ، وبزيادة معدل الإصابات بمختلف أنواع الأورام السرطانية في جميع انحاء العالم ، لا تزال هناك حاجة ماسة لاكتشاف وتطوير علاجات جديدة تتميز بفعاليتها الحيوية ضد السرطان، فضلاً عن قابليتها على تقليل الآثار الجانبية التي تسببها العلاجات التقليدية ، اذ تم التعرف على علاج السرطان بوساطة البكتيريا(BMCT) Bacteria - mediated cancer therapy في القرن التاسع عشر عندما لاحظ كل من William B. Coley و Busch أن مرضى السرطان المصابين بالمكورات العقدية يظهرون تراجعاً واضحاً في نمو الورم (Forbes *et al.* , 2018) . أساس العلاج البكتيري للسرطان هو الدور المباشر لقتل الخلايا السرطانية و/أو الدور غير المباشر لتحفيز الاستجابات المناعية الفطرية والمكتسبة مع البكتيريا (Goldszmid and Gorjifard, 2016).

لقد اتجه العديد من الباحثين إلى استخدام الأنواع البكتيرية كطرق علاجية بديلة والتي يمكن أن تكون لها تأثيرات فعالة في العلاج المناعي البكتيري المضاد للورم ، مثل البكتيريا العصوية *Bacillus* (Piao *et al*., 2022) ، بكتيريا الـ *Clostridium* (Agrawal *et al*., 2004) ، بكتيريا الـ *Listeria* (Kim *et al*., 2009) ، بكتيريا الـ *Salmonella typhimurium* (Felgner *et al*., 2016) ، بكتيريا الـ *Bifidobacterium* (Zhu *et al*., 2011) و بكتيريا *Escherichia coli* (Kocijancic *et al*., 2016) ، كما ركزت العديد من الابحاث على الاستراتيجيات المختلفة لقابلية البكتيريا في تدمير الخلايا السرطانية فبينت أن استخدام البكتيريا ومنتجاتها ليس لها سمية منخفضة فحسب ، بل لها أيضاً آثار جانبية محدودة على الخلايا الطبيعية والسليمة ، إذ تم استخدام بعض الأنواع البكتيرية في أشكالها المختلفة التي يمكنها التحمل والتقدم في حالات نقص الأكسجة Hypoxic و يمكنها التكاثر بشكل انتقائي فتحيط بالورم وتقيد نموه مما يسبب تدميره ، أو استخدام نواتجها الأيضية (بما في ذلك البروتينات ، الببتيدات ، السموم والـ Bacteriocins) لعلاج مرضى السرطان (Roberts *et al*., 2014)، أو باستخدام سبورات البكتيريا اللاهوائية التي يمكنها الاستفادة من الأنسجة المتنخرة ناقصة التأكسج ، فتكون قادرة على الإنبات والتكاثر وممارسة وظيفتها في تصنيع وإنتاج عوامل مضادة للسرطان (Janku *et al*., 2020) ، فضلاً عن ذلك يتم استخدام البكتيريا كحاملات لتوصيل الجينات أو الادوية أو غيرها من المكونات النشطة المعروفة في علاج السرطان إلى أنسجة الورم (Ebrahimzadeh, *et al*. , 2021) ، وفي طرق العلاج المناعي المضاد للسرطان المعتمدة على البكتيريا ، يمكن أن تستخدم البكتيريا الموجودة في ظروف المعيشة الطبيعية كخلية كاملة أو تكون موهنة أو في الصورة المعدلة وراثيا ، ومن الممكن استخدام البكتيريا كنوع من اللقاح لتحفيز جهاز المناعة لدى الإنسان لمقاومة الاورام السرطانية بنفس المبدأ الذي يتم فيه أخذ المطاعيم لمقاومة الأمراض الفيروسية أو البكتيرية (Ling *et al*., 2023) ، إذ تحضر اللقاحات أما من كائنات حية معدلة Modified أو مضعفة Attenuated أو كائنات مقتولة معطلة Inactivated مثل البكتيريا أو الفايروسات أو من السموم Toxoids أو مزيج من هذه الكائنات ، بحيث تنشط الجهاز المناعي و تسبب مناعة خلطيه و/أو خلوية (Ali *et al*.,2023) .

إن الحفاظ على فاعلية وسلامة اللقاحات المحضرة من البكتيريا المقتولة وإلى جانب الحفاظ على قابليتها المستضدية يعود إلى خطوات التحضير المعتدلة والتي يمكن تطويرها باستخدام تقنيات تحضير الـ Ghost ، ليكون بديلاً واعداً للعلاج المناعي (Batah and Ahmad, 2020) .

الأشباح البكتيرية Bacterial ghosts(BGs) هي أغشية خلوية بكتيرية فاقدة لمعظم محتوياتها الجينية والبروتينية ولكنها احتفظت بخصائصها السطحية ، وقد تم مؤخرًا استخدام الأشباح البكتيرية في مجموعة متنوعة من التطبيقات الطبية الحيوية (Rabea *et al*., 2022) . تمتلك الـ BGs هيكلية الخلية الكاملة ، والأهم من ذلك المستضدات ، بما في ذلك السكريات المتعددة الدهنية والبروتينات الدهنية وطبقة الببتيدوغليكان وبروتينات الغشاء الخارجي ، بحيث يكون لها وظيفة الاستجابة المناعية المطابقة للبكتيريا ،

وكذلك توفر BGs بديلاً آمنًا عن استخدام البكتيريا السامة ، علاوة على ذلك ، استنادًا إلى مساحتها الداخلية الكبيرة وجدرانها الخارجية الكاملة فيمكن للـ BGs ان تُحمّل بمجموعة متنوعة من العقاقير مثل Doxorubicin و Ciprofloxacin ، وعلى الرغم من أن معظم BGs تفقد سوطها ، إلا أن تأثيرها التحفيزي المناعي القوي يظل قائمًا بسبب وجود متعدد السكريد الدهني ومكونات جدار الخلية الأخرى (Sheweita *et al.*,2019; Salem-Bekhit *et al.*,2021) .

يتميز أفراد جنس السالمونيلا بالقدرة على استعمار أشكال الأورام جميعها وانتشارها بكفاءة أكبر بكثير من البكتيريا الأخرى ويحتوي هذا الجنس على أكثر من 2500 ضرب مصلي serovars من ضمنها *Salmonella Typhimurium* ، وهي سلالة غير تيفوئيدية، والأكثر دراسة على نطاق واسع لنشاطها المضاد للسرطان و تتمتع بخاصية جوهرية تتمثل بقدرتها على استعمار الأورام الصلبة وانتشارها بشكل انتقائي (Enejiyon *et al.*,2020).

تتصف بكتيريا *S . Typhimurium* بكونها عصيات سالبة لملون غرام لا هوائية اختيارية متحركة تسبب التهاب المعدة والأمعاء Self-limiting gastroenteritis عند البشر ، وتمتاز بالمرونة العالية على استحداث التلاعب الجيني ولذلك تم تصميم وهندسة هذا النوع لاستخدامه في علاجات السرطان بطرق متعددة مثل أنظمة الشبح البكتيرية Bacterial ghost systems وأنظمة إفراز البروتين Protein secretion systems وأنظمة التوجه نحو الهدف والتحلل Target-oriented and Lysis systems وأنظمة استشعار النصابQuorum sensing systems ، ويمكن استخدامها مع علاجات أخرى مثل العلاج الكيميائي أو العلاج الإشعاعي بهدف التعديل التآزري للبيئة الدقيقة للورم (Badie *et al.* ,2021 ; Aganja *et al.* , 2022) .

يمكن للسالمونيلا أن تتعامل مع المكونات المناعية الموجودة في الورم والمقيدة لمناعة المنطقة عن طريق تحويل البيئة الدقيقة للورم من حالة الكبح Immunosuppressive إلى التفعيل المناعي Immunogenic ، وتتضمن هذه العملية تحويرات في كل من مكونات الجهاز المناعي الخلوية والمواد الذائبة والتي بدورها تؤثر على الخصائص المظهرية والوظيفية للخلايا المناعية ، وسجلت الابحاث من أن عدوى السالمونيلا تزيد من تسلل الخلايا البلعمية (Kaimala *et al.*, 2018) ، والخلايا القاتلة الطبيعية (NK) ، والخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ ، والخلايا التائية $CD8^+$ السامة للخلايا (Grille *et al.*, 2014) .

اتجه العديد من الباحثين إلى انتاج شبح السالمونيلا (STG) *S. Typhimurium* bacterial ghost غير الحية باستخدام الطريقة المستحثة كيميائيًا بالاعتماد على التركيز المثبط الادنى (MIC) لهيدروكسيد الصوديوم (NaOH) اذ تم إجراء دراسات تجريبية باستخدام أنظمة النماذج التجريبية في المختبر *in vitro* وفي الجسم الحي *in vivo* لتوصيف تأثيرات STG كمرشح للقاح لقدرتها على إثارة استجابات مناعية خلطية وخلوية ضد التهابات محددة في حيوانات التجارب بوساطة تحفيز السايتوكينات قبل الالتهابية Pro-inflammatory cytokine كعامل نخر الورم TNF-α والسايتوكينات المضادة للإلتهاب Anti-

inflammatory cytokine وتحفيز خلايا البلعم الكبير Macrophage (Vinod *et al.* ,2017) . كما أن الدراسات العلمية أيدت مفهوم أن تكون الخصائص المناعية للـ STG منصة واعدة لإنتاج لقاح فعال للتحصين ضد مجموعة متنوعة من الإلتهابات البكتيرية وللقضاء على الفوعة في براز وكبد حيوانات التجارب (Rabea *et al.*, 2022) .

أحدثت تقنية Bacterial Ghost ثورة في مجال التقنيات الحيوية وتركزت بشكل خاص على تطبيقات العلاج المناعي ، ويمكن عدَها حالة متوسطة في التطور إذ يمكنها التغلب على العديد من عيوب اللقاحات المقتولة ، وقد حققت هذه التكنولوجيا حتى الآن نجاحاً كبديل للقاحات المقتولة والمغلفة والمؤتلفة وكذلك لقاحات DNA ghost-vaccines واللقاحات الخلوية (Batah and Ahmad, 2020) .

الهدف من الدراسة Aim of the study

التحري عن إمكانية استخدام أشباح *S. Typhimurium* ghost (STG) كلقاح بديل وتقييم كفاءتها في تحفيز الإستجابة المناعية في الجرذان البيض والذي يتحقق عن طريق المحاور التالية :

1- استخدام بروتوكول Sponge-like reduced protocol لإعداد أشباح *S. Typhimurium* ghost (STG)

2- تجربة إختبار القابلية الإجتياحية لجرثومة *S. Typhimurium* الحية النقية الممرضة مع اللقاح المحضر (تجربة التحدي البكتيري).

3- إستحداث سرطان القولون والمستقيم في ذكور الجرذان البيض باستخدام المادة المسرطنة (AOM) .

4- دراسة كفاءة STGs في تحفيز الاستجابة المناعية بوساطة قياس التأثير في بعض المعايير المناعية المدروسة المتمثلة بـ بروتين موت الخلية المبرمج -1(PDL-1) ، عامل النخر الورمي الفا (TNF-α) ، (TLR-4) باستخدام تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (ELISA) في الجرذان البيض المستحثة بسرطان القولون .

5- معرفة دور الـ STG على بعض المعايير الدموية والنسجية كوسيلة علاج مناعي لسرطان القولون والمستقيم المستحدث في ذكور الجرذان البيض .

الفصل الثاني

استعـراض المراجـع

Literatures Review

2.استعراض المراجع Literatures review

1.2 تعريف السرطان Definition of cancer

يعرف السرطان بأنه عبارة عن نمو غير طبيعي لخلايا الجسم ، والخلية هي وحدة تكوين الأجسام الحية والجسم البشري ، ولها وظيفتان :التكاثر ووظيفة أخرى تخصصية تختلف باختلاف نوع الخلية ، فقد تكون هذه الوظيفة التخصصية حركة كما في العضلات ، أو غير ذلك من الوظائف الحيوية ، وفي الجسم البشري المكتمل النمو تكون الوظيفة التخصصية هي الأساس ، بينما يقتصر التكاثر على عدد قليل من الخلايا (كرسوع ,2012) . والذي يحدث عند تشكل الورم السرطاني هو أن الخلايا السرطانية تتكاثر في الجسم بسرعة وبشكل غير منتظم ودون اتخاذ وظيفة معينة ، وكلما تقدم المرض أصبحت الخلايا أكثر شذوذا من حيث الشكل والبنية والوظيفة ، بحيث لا تستقبل الإشارة الطبيعية لوقف هذا التكاثر مما يساعد في انتشارها بشكل أكبر (الحسن ، 2019) .

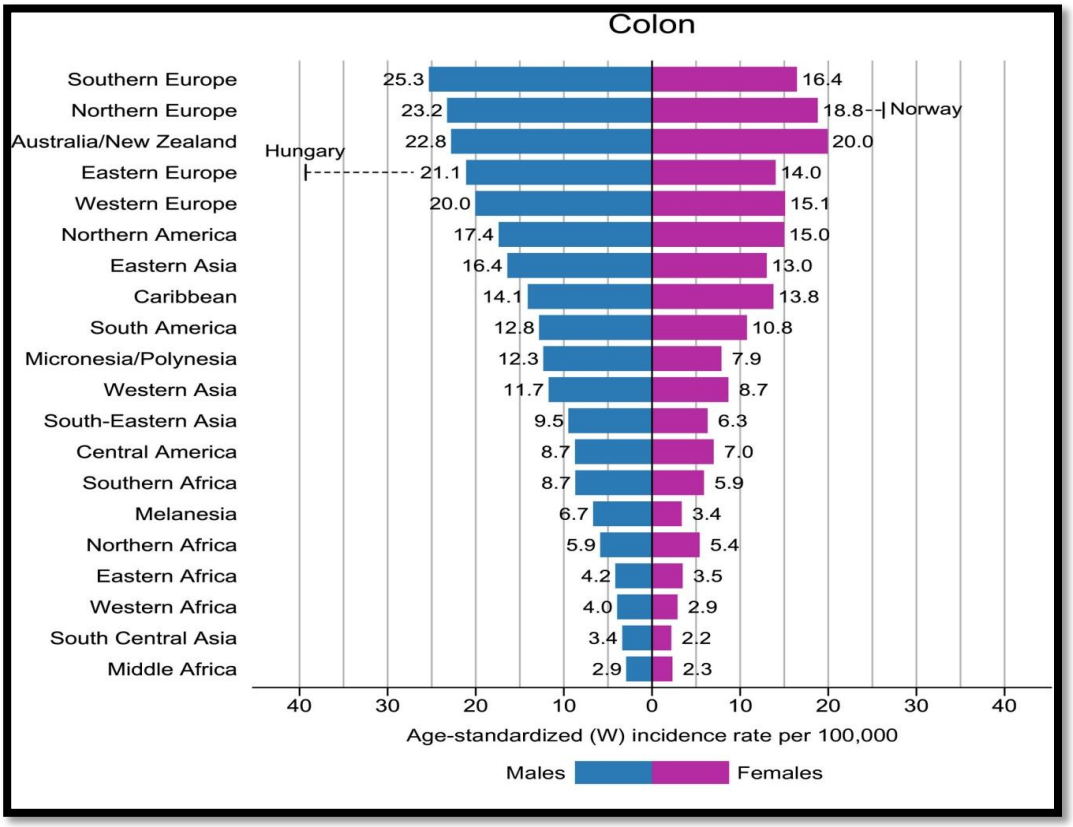
يعد السرطان أحد الأسباب الرئيسية لارتفاع معدل الوفيات على مستوى العالم ، إذ يعاني الآلاف من الأشخاص من الأورام الخبيثة كل عام ، ومن بين الأنواع المختلفة من السرطانات ، يظهر المرضى الذين يعانون من سرطان القولون والمستقيم وسرطان الكبد وسرطان الرئة وسرطان الثدي معدلات وفيات عالية (Siegel *et al.* , 2022) . ووفقاً لمنظمة الصحة العالمية WHO ، فإن السرطان هو السبب الأول أو الثاني على الأقل للوفاة لدى الأشخاص الذين تقل أعمارهم عن 70 عاماً في 112 من أصل 183 دولة . (WHO , 2021)

تشير التقديرات إلى حصول تزايد بمعدل الإصابة بالسرطان خلال السنوات الخمس عشرة القادمة سيتم تسجيلها في منطقة الشرق الاوسط لأسباب تعزى أغلبها بتغير نمط المعيشة ، النمو السكاني ، الشيخوخة ، التحضر ، التعرض للمواد المسرطنة (Pourghazian *et al.* , 2019) . فضلا عن تأثير العوامل البيئية ، الاستعداد الوراثي ، تطور التكنولوجيا المعتمدة في التشخيص ومراجعة وحدات الرعاية الصحية (Dekker . *et al.* , 2019)

2.2 سرطان القولون Colon cancer

تختلف أنواع السرطانات وأعباءها باختلاف بلدان المنطقة وغالباً ما يوجد تباين جغرافي في وبائية سرطان القولون والمستقيم بشكل ملحوظ بين دول العالم المختلفة ، إذ ارتفع معدل الإصابة بشكل واضح على مدى العقدين الماضيين نتيجة التغيرات الكبيرة في مختلف جوانب نمط الحياة والتنمية الاقتصادية ويشير ذلك إلى حدوث تطور لعوامل الخطر التي تساهم في ارتفاع معدل الاصابة منها السمنة وسوء التغذية والتدخين وتناول الكحول وانخفاض النشاط البدني (Phipps *et al*., 2021; Al Alwan ,2022) . فعلى الرغم من اكتشاف أهم العوامل المواتية لحدوثه والعمل على تجنبها ،لا تزال نسب الاصابة في تزايد لكثير من مناطق العالم (الابرص ، 2020) ، وهو أكثر شيوعاً في البلدان المتقدمة منه في البلدان المنخفضة والمتوسطة

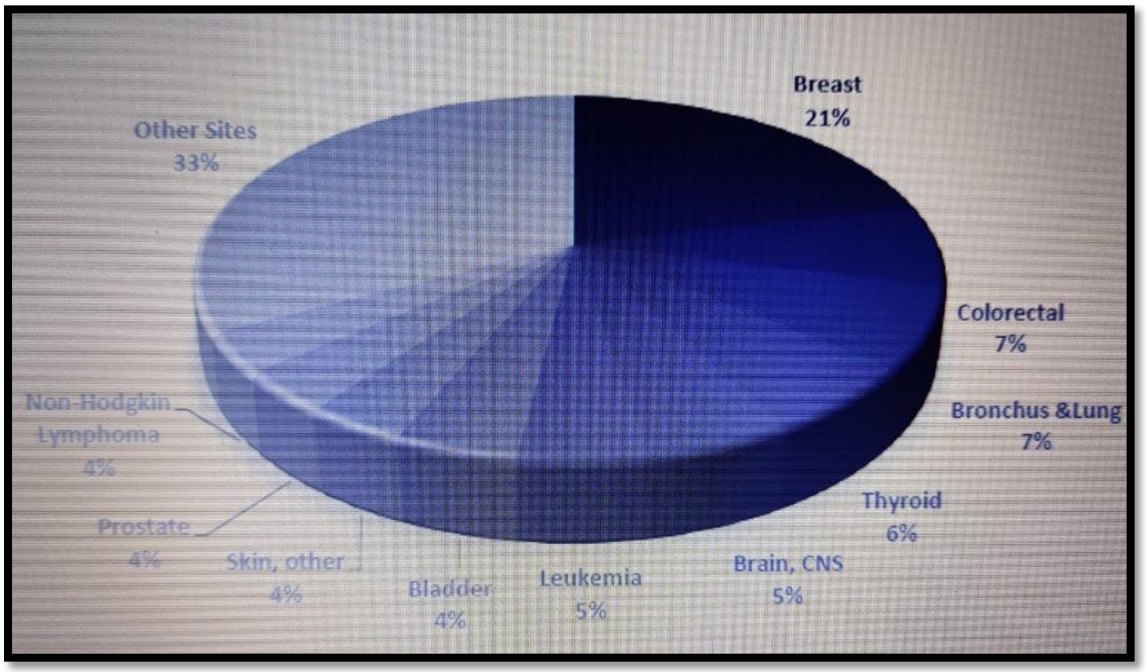
الدخل ، ومع ذلك فإن معدل الإصابة يتزايد في البلدان النامية بسبب تغيرات عديدة في العوامل البيئية ، ومن المتوقع أن يرتفع بنسبة 60 ٪ بحلول عام 2030 (Ahmad *et al.*, 2021) . ويوضح الشكل (2-1) وبائية سرطان القولون عالمياً .



الشكل (2-1) وبائية سرطان القولون حسب الجنس عالمياً (Sung *et al.*, 2021) .

يعد سرطان القولون والمستقيم ثالث أكثر أنواع الأورام الخبيثة انتشاراً على مستوى العالم وثاني سبب رئيسي للوفيات المرتبطة بالسرطان في جميع أنحاء العالم (Xi *et al.* , 2021) . وفي العراق ، لا يزال سرطان القولون يشكل مرضًا خطير يصيب كبار السن من كلا الجنسين ويتزايد معدل الإصابة والوفيات في جميع الفئات العمرية (Ibrahem *et al.* , 2022) . وبحسب إحصائيات السرطان في العراق المعتمدة على التقرير السنوي لتسجيل السرطانات Cancer Registry of Iraq report في العام 2022 ، ومن بين اكثر عشر أنواع للسرطان اهمية بمعدل الاصابة في كلا الجنسين ، احتل سرطان القولون المرتبة الثانية (7.3%, 100,000/6.8فرد) بعد سرطان الثدي ، ففي الذكور احتل المرتبة الثانية (9.2%, 100,000/7.1 فرد من فئة الذكور) بعد سرطان الرئة ، أما في الأناث كان بالمرتبة الثالثة (6%, 100,000/ 6.5فرد من فئة الأناث) بعد سرطان الثدي والغدة الدرقية ، وبلغ معدل الوفيات بسرطان القولون للعام 2022 في الذكور 437 (7.5%) إذ احتل المرتبة الرابعة من بين اخطر عشر أنواع للسرطان ، بينما لدى الأناث سجل

365 (6.5%) وبنفس المرتبة . الشكل (2-2) يوضح نسب أعلى عشرة مواضع للسرطان تم تشخيصها بين السكان العراقيين لعام 2022 .



الشكل (2-2) نسب اعلى عشرة انواع للسرطان تم تشخيصها لدى السكان العراقيين لعام 2022 . (Cancer Registry of Iraq Report, 2022)

تبدأ اغلب سرطانات القولون والمستقيم بمختلف أنواعها عندما يتغير نمو خلايا بطانة القولون أو المستقيم السليمة خارج نطاق السيطرة إذ تحدث اخطاء في إنقسام الخلايا المخاطية بشكل متكرر، فتنقسم بشكل غير طبيعي وبدون تحكم مكونة كتلة ورمية داخل القولون والتي يمكن أن تتمايز إلى الورم السرطاني أو الورم الحميد ، قد ينمو الورم الخبيث ويغزو طبقات أخرى من الأمعاء كالطبقة تحت المخاطية والعضلية وينتشر إلى أجزاء أخرى في الجسم ، بينما ينمو الورم الحميد في مكان محدد ، لكنه لن يتمكن من الانتشار في الجسم (Kuipers *et al.* , 2013) ، في الغالب تستغرق هذه التغييرات سنوات لتتطور ، وتساهم كل من العوامل الوراثية والبيئية في ذلك ، وبناء على هذين العاملين ، تختلف حالات الإصابة بسرطان القولون بشكل كبير (Meryud *et al.* , 2022) .

يرتبط خطر الإصابة بسرطان القولون بالعديد من عوامل الخطر ، والتي يمكن تقسيمها إلى عوامل قابلة للتعديل (العادات الغذائية ونمط الحياة والأمراض الالتهابية المعوية) وغير قابلة للتعديل (العمر ، الجنس ، الانتماء العرقي والعوامل الوراثية) تحدث في أغلب الأحيان وتتفاعل لتسبب سرطان القولون والمستقيم (Dekker *et al.* , 2019) .

قد لا تظهر أي أعراض لسرطان القولون ، لذا فإن علامات وأعراض الأورام القولونية الخبيثة تكون غالباً غير محددة وعادة ما تعتمد على موقع الورم ونوعه وحجمه ، وتتمثل الأعراض الأكثر شيوعاً بآلام

البطن ، فقدان الوزن، فقر الدم ، نزيف المستقيم وتغير في حركة الأمعاء ، بينما قد تظهر أعراض أخرى عند بعض الاشخاص المصابين مثل ظهور كتلة نامية في البطن ، الإمساك ، انسداد الأمعاء ، الاستسقاء ، اليرقان وتضخم الكبد (Alrubaie *et al.* , 2019 ; Elzouki *et al.* , 2014) ، و في عدد من الحالات تبدأ أورام القولون على شكل زوائد لحمية (سلائل) Polyps صغيرة جدًا تنمو على الجدار الداخلي للأمعاء ، إذ لا يعاني المرضى من أي أعراض في المراحل المبكرة من المرض ، ويختلف ظهور الأعراض اعتماداً على موقع الورم ، شمول العقدة الليمفاوية ، وانتشاره إلى الأعضاء الأخرى (Aljarshawi *et al.* , 2020) .

من حيث السمات السريرية ، تظهر حالات سرطان القولون والمستقيم المبكرة بشكل شائع في المستقيم 35-37%، يليه القولون النازل 25% والقولون الصاعد 23% ، و حوالي ما يقارب من 29% و27% و29% من الحالات التي تم تشخيصها لدى الأفراد الذين تزيد أعمارهم عن الخمسين عام تحدث في المستقيم والقولون النازل والقولون الصاعد على التوالي (Archambault *et al.* ,2020) .

إن السرطان بشكل عام وسرطان القولون والمستقيم بشكل خاص مرض معقد للغاية يتطلب اتخاذ التدابير اللازمة للكشف المبكر عن الحالات بشكل سريع بوساطة اعتماد طرق التشخيص الصحيحة والتقنيات الجراحية الجديدة من أجل الوصول إلى نتائج افضل تساعد بارتفاع معدل البقاء على قيد الحياة ، وهو أمر حيوي مهم بسبب قدرة المرض على تهربه من الجهاز المناعي فضلاً عن قدرته على البقاء والاستمرار في انقسام خلاياه إلى ما لا نهاية (Koc *et al.* 2019) . وقد يعزى سبب الوصول الى المرحلة المتقدمة من المرض إلى تأخر مراجعة المرضى أو تغير التاريخ الطبيعي للمرض من الناحية المرضية (Kim *et al.* , 2013) .

3.2 امراضية ومراحل سرطان القولون والمستقيم Colorectal cancer pathogenesis & staging

1.3.2 امراضية سرطان القولون

إن تسلسل الأحداث لتطور سرطان القولون التدريجي يبدأ من تكاثر الخبايا الشاذة Aberrant crypt أو تضخمها Hyperplasia إلى الأورام الغدية Adenomas الحميدة ، ثم إلى السرطان Carcinoma الموضعي *in situ* ، وأخيراً إلى السرطان النقيلي Metastatic carcinoma، والذي يحدث غالبًا على مدار سنوات عديدة (Chakrabarti *et al.* , 2020).

ذكر Seker-Polat وآخرون ، (2022) إن امراضية سرطان القولون تبدأ بتغير ظهارة الأمعاء إلى اللحميات Polyps التي يمكن أن تتحول إلى الوضع الخبيث ، و تُحدد بؤر الخبيئات الشاذة Aberant Crypt Foci (ACF) باعتبارها نمو غير طبيعي ما قبل البوليب Prepolyp على أنها بواديء

لأورام القولون والمستقيم تظهر في كل من الإنسان و الحيوانات المختبرية المعرضة للمواد الكيميائية المحرضة للتسرطن كمادة الـ Azoxymethane(AOM) . وحُددت هذه الآفات القولونية مجهرياً على أنها خبايا ذات غشاء مخاطي كبير الحجم يتكون من مناطق ظهارية سميكة لامعة ويمكن ملاحظتها بسهولة (Jabbar *et al.* , 2023) . وذكرت دراسة علمية اخرى أن ظهور تلك البؤر الشاذة يحدث بشكل متفاوت في أعمار تتراوح بين 40 و 45 عام إذ تم ملاحظة بؤرة واحدة غالبا ، ليزداد عدد البؤر بسرعة بعد 45 عام ويصل إلى مرحلة الاستقرار Plateau عند عمر 60 عام ، ليحدث تراجع بطيء بعد ذلك (Kowalczyk *et al.* , 2016) .

ينشأ أكثر من 95٪ من سرطانات القولون والمستقيم من الأورام الغدية Adenomas المتقدمة والتي تمثل الآفات الأولية لهذه السرطانات ، و تشمل مقاييس نشوء الورم الحميد المتقدم وجود لحميات يبلغ حجمها 10 ملم أو أكثر ، أو لحميات تُظهر خلل تنسجي Dysplasia شديد بغض النظر عن الحجم ، أو لحميات ذات بنية أنبوبية زغبية بغض النظر عن الحجم ، وأن إزالة الأورام الغدية من القولون تقلل بشكل كبير من خطر الإصابة بسرطان القولون والمستقيم (WHO, 2017). ويمثل السرطان الغدي Adenocarcinoma الورم الخبيث الذي ينشأ من الخلايا الظهارية الغدية في القولون والمستقيم ، في حين أن الغالبية العظمى من سرطانات القولون والمستقيم تشمل الأنواع الأخرى غير الشائعة كسرطان الخلايا الحرشفية Squamous cell carcinoma ، والسرطان الغدي الحرشفي Adenosquamous carcinoma (Fleming *et al.* , 2012) .

2.3.2 مراحل سرطان القولون

يعتمد معدل بقاء مرضى سرطان القولون والمستقيم على قيد الحياة إلى حد كبير على المرحلة التي يتم فيها تشخيص الورم لأول مرة والذي يختلف بين المراحل ، وله اهمية بالغة لتحديد العلاج المناسب لكل مرحلة ، وهي تمثل وصف لمدى انتشار السرطان في وقت التشخيص (Duong & Nguyen , 2018). ووفقًا لنظرية Vogelstein، يتطور سرطان القولون عبر ثلاث مراحل شديدة الارتباط : البدء Initiation وفيها تُحور الرسالة الجزيئية للخلية الطبيعية ، التعزيز Promotion حيث يتم فيها تغيير شلالات نقل الإشارة ، والتقدم Progression الذي يشمل بزوغ خلايا متحولة ومتغيرة مظهريا (Sena *et al.* , 2019).

توجد عدة طرق لتصنيف وتحديد مرحلة السرطان ، ولكن النظام الذي لاقى قبول واسع عالمياً لبساطته وسهولته وفائدته هو نظام (الورم ، العقدة ، النقيلة) Tumor, Node, Metastasis (TNM) الذي تم اقتراحه بشكل تعاوني من قبل اللجنة الأمريكية المشتركة لمكافحة السرطان American Joint Committee on Cancer(AJCC) والاتحاد الدولي لمكافحة السرطان Union for International Cancer Control(UICC) كنظام تدرج سريري تصنيفي مُعتمد لتشخيص مرحلة سرطان القولون وتوجيه الخيارات العلاجية النهائية لكل مرحلة، ويتم تحديثه بشكل دوري كل 6-8 سنوات ويرفع بشكل

اصدارات مختلفة و الاصدار الثامن هو الاخير (Odze *et al.* , 2019) ، يؤخذ على هذا النظام بكونه يقدم معلومات تنبؤية محدودة ولا يأخذ بعين الاعتبار استجابات المرضى للعلاج ، فقد يُظهر مرضى سرطان القولون ممن لديهم اعراض نسجية- مرضية متماثلة تقدم في المرحلة واختلاف في النتائج اعتمادا على خلفيتهم الجينية (Duong & Nguyen, 2018 ; Kudo *et al.* , 2021).

ووفق قاعدة البيانات السكانية Surveillance, Epidemiology, and End Results(SEER) لمرضى السرطان ، يعتمد نظام TNM على فحص عينات الاستئصال الجراحي المرضية ليتم عندها تصنيف السرطانات ومنها سرطان القولون والمستقيم بالإعتماد على ثلاثة نقاط : حجم الورم وعمق غزوه وامتداده الموضعي ضمن النسيج والنسج المجاورة ويرمز له (T) وتتدرج من (T0- T4) وقد تحوي تصنيفات فرعية لبعض الأورام مثل (T2a وT2b) ، وإصابة العقد اللمفاوية بالخباثة أو سلامتها (أي امتداد الورم إلى العقد اللمفاوية المجاورة والجهاز اللمفاوي) وعدد ومستوى العقد المصابة ويرمز لها (N) وتتدرج من (N0- N3) ، في حين يشير الحرف(M) إلى انتقال الورم إلى أماكن اخرى من الجسم أو أعضاء بعيدة من عدمه ويتدرج لدرجتين فقط (M0 ، M1) (Mahmoud,2022) ، واعتماداً على البيانات السريرية والمرضية التي يتم الحصول عليها ، تُجمع النقاط الثلاثة للحصول على مرحلة الورم Stage وهي أربع درجات يتم كتابتها بالأرقام اللاتينية (I، II ، III ، IV) (Amin *et al.*,2017) .

وأشار Meryud وآخرون ،(2022) في دراسة له عن وبائية سرطان القولون في مدينة بغداد بوجود نظام Dukes staging الخاص لتصنيف سرطان القولون والمستقيم من ضمن التصنيفات الأخرى المعمول بها والمعتمدة على وسائل شعاعية وجراحية ومختبرية وسريرية لوضعها ، إذ تقسم مراحل سرطان القولون وفق هذا النظام إلى ستة مراحل وهي كالآتي :

1- المرحلة A : الورم محصور ضمن الطبقة المخاطية Mucosa .

2- المرحلة B1 : امتداد الورم الى الطبقة العضلية المخاطية Muscularis mucosa بدون انتشاره خلالها ولايصل الى العقد .

3- المرحلة B2 : انتشار الورم ونفوذه خلال طبقة Muscularis mucosa ، لا يصل إلى العقد .

4 - المرحلة C1 : امتداد الورم إلى الطبقة Muscularis mucosa بدون انتشاره خلالها ، يصل وينتشر إلى العقد.

5- المرحلة C2 : انتشار الورم ونفوذه خلال طبقة Muscularis mucosa ، يصل وينتشر إلى العقد .

6 - المرحلة D : انتشار الورم إلى الأعضاء الأخرى البعيدة من الجسم ويدعى بالسرطان النقيلي Metastatic cancer ، وتمثل هذه المرحلة اخطر مراحل سرطان القولون والمستقيم .

وهناك تصنيفات نسجية مرضية Histopathology للأورام توضع من قبل طبيب التشريح المرضي المختص تكمن أهميتها في اقتراح خطة علاجية وتنبؤية للمرض وتحدد منها درجة تطور المرض بالاعتماد على درجة تمايز خلايا الورم ، حيث كلما كانت الخلايا اكثر تمايز وقريبة إلى خلايا النسيج الطبيعي المتولدة

منه كلما كان الورم أقل عدوانية وأسهل للعلاج ، في حين تمثل الخلايا الورمية غير المتمايزة بشكل نهائي هي أكثر عدوانية وقدرة على الغزو والانتشار ضمن الأنسجة (الابرص ،2020).

ذكر Jurescu وآخرون،(2023) في دراسة علمية بوجود تقييم من منظمة الصحة العالمية (WHO) لدرجة السرطانات الغدية معتمد على النسبة المئوية لتكوين الغدة من منطقة الورم على النحو التالي : G1، G2، G3- تشكل البنية الغدية في اكثر من 95٪ ، 50- 95٪ ، 0- 49٪ على التوالي ، و G4- لا يوجد تكوين غدة أو أي تمايز مخاطي آخر أو سمات حرشفية أو غدد صماء عصبية .

ولغرض العمل بأنظمة تصنيف مراحل سرطان القولون ، يخضع مرضى سرطان القولون بإتباع سلسلة برامج فحص طبية مختلفة ، كالتصوير بالموجات فوق الصوتية ، والتصوير المقطعي المحوسب Computed Tomography (CT) ، والتصوير بالرنين المغناطيسي Magnetic Resonance Imaging (MRI) ، وتنظير القولون ، الفحص المجهري للمقاطع النسجية المرضية Histopathological examination لأنسجة القولون ، وحقنة الباريوم الشرجية ، وفحص تأكيد سرطان القولون Confirm Colonic cancer(CC) ، ويفيد التصوير المقطعي للبطن والحوض في تحديد وجود البؤر الثانوية (النقائل) Metastatic (Meryud *et al.* , 2022) . كما أشار Lázaro-Gorines وآخرون ، (2019) أنه يمكن اجراء تحليل المستضد السرطاني الجنيني Carcino Embryonic Antigen (CEA) وهو أحد الواسمات الورمية الذي اكتشف لأول مرة في سرطان القولون كمواد تفرزها الخلايا الخبيثة ويمكن التحري عنها في المصل لغرض معرفة حجم الورم وطبيعته قبل بدء العلاج ومراقبته بعد العلاج إذ يمتاز بسهولة اجراءه وتوفره . لكنه يمتلك حساسية ونوعية منخفضة لكونه اختبار غير متخصص non-specific ولذا لا يعتمد عليه بمفرده (Zi-Yang *et al.* , 2020) .

يوصى بإجراء فحوصات مبكرة دورية Screening كتنظير القولون الكلي Colonoscopy كل 10سنوات بدءاً من سن الخمسين عاماً للشخص الذي ليس له أقارب مصابين بسرطان القولون أو ليس له أعراض ، أو يتم اجراء فحص التنظير الداخلي كالتنظير السيني Sigmoidoscopy المرن كل 5 سنوات للأشخاص بعمر أقل من 40 سنة وظهرت لديهم علامات أولية للمرض (الابرص ، 2020) ، ومن اختبارات الكشف المبكر ايضاً اختبار الدم الخفي في البراز المعتمد على الغاياك Guaiac-based fecal occult blood test(gFOBT) واختبار الكيمياء المناعية في البراز fecal immunochemical test (FIT) /اختبار الدم الخفي في البراز القائم على الكيمياء المناعية immunochemical-based fecal occult blood test (iFOBT) والذي يكتشف البؤر الورمية بشكل غير مباشر عن طريق الكشف عن الدم الخفي في البراز (WHO , 2017). وعند الاشتباه بسرطان القولون ، يكون التنظير الكلي للقولون (منظار بطني سفلي)هو المعيار الذهبي للتشخيص وللعلاج عن طريق استئصال الزوائد اللحمية (Bretthauer *et al.*, 2016) ، فهو يسمح بالتصوير المباشر للغشاء المخاطي للقولون بأكمله ، ويسمح بأخذ خزعة من آفة القولون وإستئصال اللحميات الحميدة والخبيثة في المرحلة المبكرة ، ويعد بمثابة التشخيص التأكيدي بعد

فحص التنظير السيني الموجب ، وارتبط إستخدامه بإنخفاض معدل الوفيات بسرطان القولون والمستقيم بنسبة 31- 65٪ (Zauber *et al.*,2012) .

4.2 عوامل الخطورة Risk Factors

يتأثر خطر الإصابة بسرطان القولون والمستقيم بالعوامل الوراثية والبيئية والـ Epigenetic ، إذ تشمل عوامل الخطر الوراثية مرض السكري النوع الثاني ، تاريخ مرض التهاب الأمعاء Inflammatory Bowel Disease (IBD) ، القولون التقرحي أو ما يدعى بمرض كرونك ، التاريخ العائلي لسرطان القولون (Rehman *et al.* , 2017) ، من عوامل الخطر الأخرى : جنس الفرد ، العمر ، الاستهلاك المرتفع لـ اللحوم الحمراء والمصنعة ، شرب الكحول ، فقدان الوزن بمقدار اكثر أو يساوي 5 كيلوغرام (خلال فترة الخمس سنوات السابقة لتنظير القولون)، والمتغيرات الجينية المؤهلة للمرض (Keum *et al.* , 2019) . ارتبط نمط الحياة المستقر (الذي يتم قياسه بمدة مشاهدة التلفاز) والسمنة بإرتفاع معدل الإصابة المبكرة (Nguyen *et al.* , 2018) . إلى جانب ذلك ، يمكن للكائنات الحية المجهرية الممرضة أن تلعب دوراً مهماً في تطور المرض (Eyvazi *et al.* , 2020) .

في حين ارتبطت عوامل الوقاية المتمثلة باستخدام الأسبرين ، وارتفاع فيتامين د الجهازي ، والإكثار من تناول الخضروات ، الحمضيات ، الأسماك ، بيتا كاروتين ، فيتامين سي ، فيتامين إي ، وحمض الفوليك بانخفاض خطر الإصابة بالبداية المبكرة لسرطان القولون (Low *et al.* , 2020) .

1.4.2 الجنس Sex

تزايدت حالات الإصابة بسرطان القولون والمستقيم المبكر لدى الرجال والنساء في العقود الأخيرة في العديد من البلدان (Meester *et al.* , 2019)، فضلاً عن أن حالات المرض أكثر شيوعاً عند الذكور منها عند الإناث والذين تتراوح أعمارهم بين 50 و 60 عاماً حيث أن الذكور أكثر تأثراً بالعوامل البيئية (Keum *et al.* , 2019) . وفي العراق ، اشار Ibrahem وآخرون ،(2022) إن حالات الإصابة عند الذكور شكلت (54.7٪) مقارنة بالإناث (45.3٪) ، و 68.2٪ من جميع الحالات كانت في سن 50 عاماً فما فوق بينما كان 31.8٪ أصغر من 50 عامًا . يعزى هذا الاختلاف بين الجنسين إلى تباين الجنس بخصوص الاستجابة البيولوجية للمكونات الغذائية (Kim *et al.* , 2015) ، وأكدت الدراسة Witold وآخرون، (2018) التي أجريت في إطار برنامج فحص سرطان القولون والمستقيم على دور جنس الفرد ونمط الحياة المرتبط بالتعرض العالي لعوامل الخطر التي تشجع على تكوين الأورام الغدية عالية الخطورة (الأورام المتقدمة) .

2.4.2 العمر Age

اشار Vuik وآخرون ، (2019) أن المتعارف عليه أن يصيب سرطان القولون والمستقيم كبار السن الذين تزيد أعمارهم عن الخمسين عاماً في أجزاء مختلفة من العالم ، لكن حدث انخفاض في معدل الإصابة لدى هذه الفئة العمرية وارتفع معدل الإصابة بنسبة 1 - 3٪ للأشخاص الذين تقل أعمارهم عن الخمسين سنة لكل عام سنوياً ، وأطلق عليه اسم سرطان القولون والمستقيم المبكر Early-onset CRC (EO-CRC) (ويشمل جميع الأورام الخبيثة التي تم تشخيصها قبل سن الفحص ، وهو أقل من 50 عام) . وبينت دراسة Chen وآخرون ، (2017) أن مرضى سرطان القولون والمستقيم المبكر هم أكثر عرضة للتشخيص في المرحلة المتقدمة (المرحلة III -IV) مقارنة بالمرضى الذين يعانون من السرطان المتأخر ، ومدة ظهور الأعراض لديهم تكون أطول مقارنة بالمرضى الأكبر سناً ، فضلاً عن إرتباط المرض لديهم بحالة الأورام المتزامنة Synchronous (تشخيص الاصابة الثانية بالسرطان الأولي خلال 6 اشهر من التشخيص الأول) والأورام المتبدلة Metachronous (تشخيص الإصابة الثانية بالسرطان الأولي بعد اكثر من 6 اشهر من التشخيص الأول) .

وفي السنوات الأخيرة تم تسجيل حصول هذا النوع من الأورام لدى الأطفال ، إذ وضح Farhad وآخرون، (2023) بأنه على الرغم من أن كبار السن أكثر عرضة للإصابة بسرطان القولون والمستقيم ، إلا أنه كان لدى كل من الأفراد الأصغر والأكبر سنا أعراض وخصائص سريرية مرضية متشابهة تقريبا . وذكر Burnett-Hartman وآخرون، (2021) أنه سُجلت حالات سرطان القولون والمستقيم لدى المرضى الصغار نسبياً في العراق ، ورجح أن يكون السبب مرتبط بالانتقال من الطعام العراقي التقليدي إلى الوجبات السريعة الغربية المحملة بالدهون واللحوم المصنعة ، وارتفاع نسبة تناول الكحول والتدخين خاصة على شكل غليون الشيشة منذ عام 2003 . فضلاً عن زيادة استخدام المضادات الحيوية وخاصة في اوقات مبكرة من فترات ما قبل الولادة إلى فترات المراهقة ، مما قد تؤدي إلى حصول تغيرات جينية و مسرطنة في الخلايا الظهارية للقولون والمستقيم بل وقد تؤثر أيضاً على ميكروبات الأمعاء ومناعة المضيف Akimoto) (2021 , *et al.* . فضلا عن قلة الوعي في تمييز أعراض المرض و تأخر الفحص والإحجام عن طلب الرعاية الطبية (Siegel *et al.* 2020).

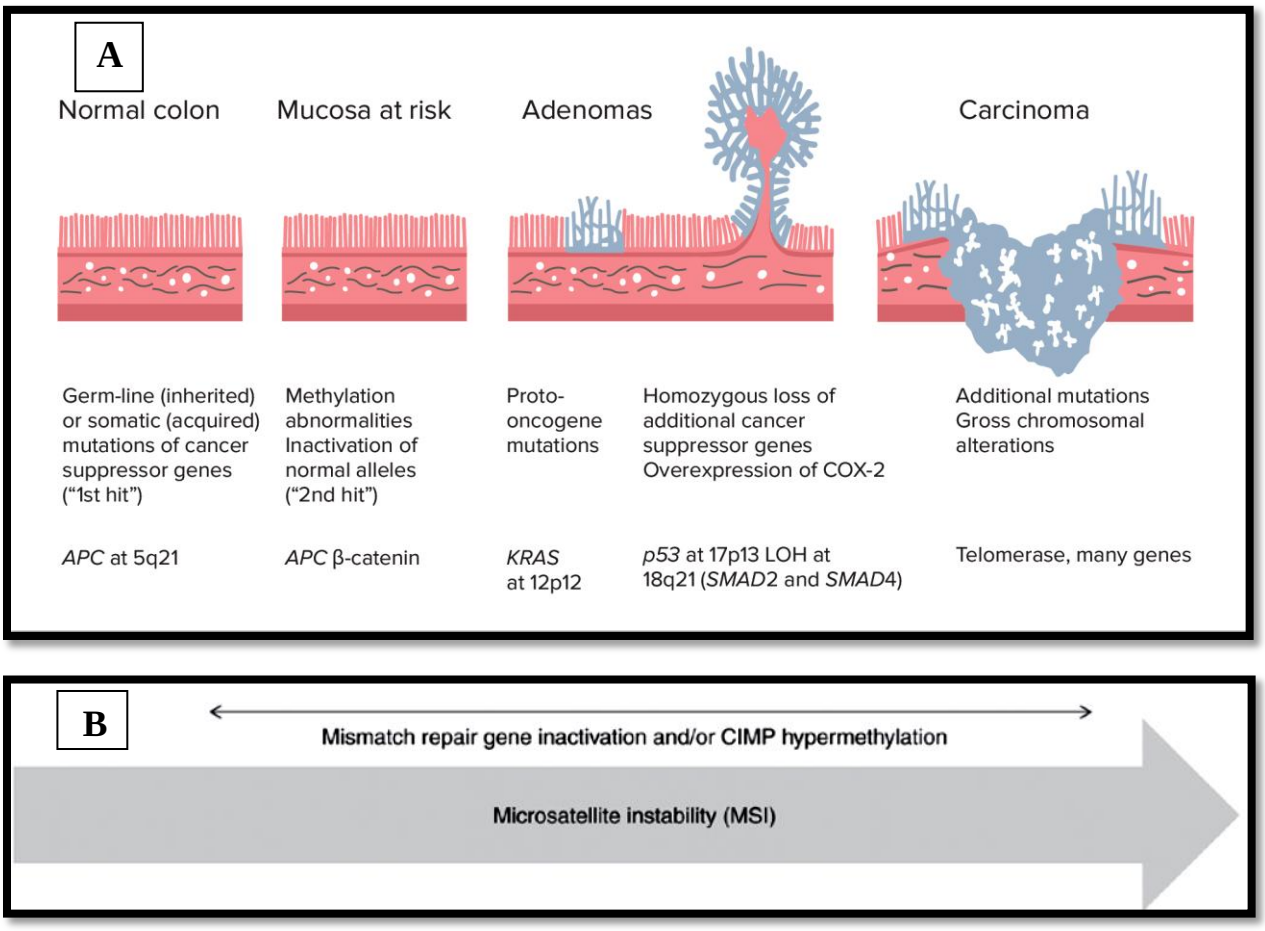
تعد الشيخوخة Aging عامل الخطر التي تمهد البداية لنشوء السرطانات وتوفر البيئة لذلك بوساطة تنشيطها للطفرات المسببة للسرطان وتخريب بنية الأنسجة وزيادة إفراز الإنزيمات الهدامة والسيتوكينات الالتهابية وعوامل النمو بواسطة الخلايا الهرمة (Krtolica *et al.* , 2001).

3.4.2 الوراثة genetics

تلعب العوامل الوراثية أيضاً دوراً رئيسياً في تطور سرطان القولون والمستقيم ، والذي يتضمن في الغالب تنشيط الجينات الورمية الأولية أو تعطيل للجينات الكابتة للورم ولجينات إصلاح الحمض النووي

(Abbood & Aziz ,2018) . واعتماداً على مصدر الطفرة ، صُنفت حالات حدوث سرطان القولون على أنها تلقائية والتي تشكل 70٪ من الحالات التي تحدث دون وجود تاريخ عائلي ، 25% عائلية بسبب وجود تاريخ عائلي ، والموروثة والتي تنخفض بنسبة 5٪ وتكون راجعة إلى حدوث متلازمات السرطان الوراثية التي يرث فيها المريض نسخ الجين الطافرة وتتخذ شكلين : داء البوليبات الغدي العائلي Familial adenomatous polyposis (FAP) التي تتميز بوجود العديد من التراكيب الغدَية في انسجة القولون والمستقيم الظهارية للأفراد الحاملي لطفرة الخط الجرثومي المرضي في جين *APC* (Keum & Giovannucci,2019) ، إذ تحدث الطفرات في هذا الجين مبكراً وغالباً ما تتبعها طفرات في جينات عائلة *RAS* ، في حين تميل تغييرات *TP53* إلى الحدوث متأخراً ، ومتلازمة Lynch أو ما تعرف بسرطان القولون الوراثي غير النقيلي Hereditary Non-Polyposis Colorectal cancer (HNPPC) التي تسببها طفرة جرثومية في جين إصلاح عدم تطابق الحمض النووي DNA Mismatch Repair gene (MMR) (Mármol *et al.* , 2017 ; Valle *et al.* , 2019) . وأشارKumar وآخرون،(2021) ان تطور السرطان القولوني الغدي يحدث عبر ثلاثة مسارات متميزة : الأول يبدأ عن طريق طفرات جين *APC* وعدم الاستقرار الكروموسومي ، والثاني عن طريق الطفرات في جينات إصلاح عدم التطابق وتعرف بظاهرة عدم استقرار التوابع الصغيرة Microsatellite instability phenomenon ، والثالث عن طريق فرط مثيلة الجينوم الكلي .

وذكرStoffel وآخرون، (2018) انه حوالي 30% من مرضى سرطان القولون لديهم تاريخ عائلي مع المرض لأحد أقارب الدرجة الأولى على الأقل . و يوضح الشكل (2-3) التغيرات الجينية المرافقة لتطور الورم من الحميد إلى سرطان القولون ، كذلك تم توضيح الترتيب المقترح للطفرات في جينات *APC* ، *K-ras* ، *p53* و DNA MMR ، على الرغم من أنه قد يكون هناك تسلسلاً زمنياً مفضلاً لهذه التغييرات ، إلا أن التأثير التراكمي للطفرات وليس ترتيب حدوثها هو الذي يبدو أكثر أهمية (Duong &Nguyen,2018;Kumar *et al.*, 2021) .



الشكل (2-3) B,A العوامل الجينية وعلاقتها بتطور سرطان القولون (Kumar *et al.*, 2021)

4.4.2 مستويات الحديد في الامعاء Iron levels in the intestines

أما دور المغذي الحيوي الدقيق (الحديد) في تطور سرطان القولون ، فقد تضاربت الأدلة في ذلك ، بعضها اشار إلى أن المرضى الذين يعانون من سرطان القولون والمستقيم غالباً ما يعانون من نقص في الحديد الضروري للوظائف المناعية ، وبذلك فإن نقصه قد يعيق المراقبة المناعية للسرطان وربما يعدل البيئة الدقيقة المناعية للورم ، وكلاهما يساعدان في تطور المرض وانخفاض في الاستجابة للعلاج مما يؤدي بشكل خاص إلى اعتلال وتدهور في الخلايا التغصنية والخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية وتعديل استقطاب البلاعم (Phipps *et al.* , 2021). بينما اشارت أدلة أخرى إلى دور الحديد المعوي الزائد داخل الجهاز الهضمي في زيادة خطر الإصابة بسرطان القولون والمستقيم من خلال تحفيزه لتكاثر الخلايا السرطانية ، مما يساهم في تلف القولون الناتج عن الإجهاد التأكسدي وتضخيم الإشارات الجينية وفي إحداث الالتهاب (Xue & Shah , 2013).

تتميز اللحوم الحمراء بارتفاع محتواها من الـ Myoglobin ذو المستويات العالية من حديد الهيم مقارنة باللحوم البيضاء ، فتساهم مكوناتها كمركبات N-nitroso قوية التطفير في استحثاث و تطور السرطان ،

ويحفز الهيم على فرط النمو القولوني بوساطة إحداث التحوير على الكائنات الحية الدقيقة المستوطنة في الأمعاء (Seiwert *et al.* , 2020; Ng , 2016) .

5.2 العلاج Treatment

إن الخطة العلاجية المناسبة تعتمد على التشخيص الصحيح وعلى تحديد مرحلة تطور المرض ، وتتنوع طرق علاج سرطان القولون بدءاً من التقليدية منها كاستئصال اللحميات بالمنظار البسيط إلى العمليات الجراحية الأوسع إلى مجموعات العلاج الكيميائي الإشعاعي وتنتهي بأنظمة العلاج الكيميائي المعقدة المتآزرة مع الأدوية ، وهي الخيارات المتاحة مع قيودها المتعددة ، فيكون العلاج الجراحي والإشعاعي محدد بالأورام الموضعية ، والعلاجات الكيميائية تمتاز بالسمية ، وتتحدد لعلاج النقائل والأورام المنتشرة ، وتفتقر إلى صفة الانتقائية للورم ، ومحدوديتها في اختراق النسيج ، وتحريض مقاومة الأدوية المضادة للسرطان وآثارها الجانبية الهائلة (Kuipers *et al.* , 2015; Enejiyon *et al.*, 2020) ، هذه التحديات لا تشمل العلاج الكيميائي فقط ، وإنما تشمل ايضا العلاجات البيولوجية ، اذ تكون جزيئات الأجسام المضادة وحيدة النسيلة والسيتوكينات مقيدة بالنقل السلبي إلى داخل الورم ، وهذا لا يحد من فعاليتها فحسب ، بل أي زيادة في الجرعة يؤدي إلى ارتفاع مخاطر التسمم (Laliani *et al.*, 2020) .

يتميز الاستئصال الجراحي الذي يتضمن الاستئصال والزرع والتكميم الآمن للحواف بكونه العلاج القياسي لسرطان القولون ،إذ يهدف إلى إزالة الورم والمخرجات اللمفاوية والحواف لدرجة كافية لضمان إزالة حمل نمو سرطان القولون بالكامل ، لكن يمكنه أن يكون فعالاً في أنواع أو مراحل معينة من تطور المرض مع احتمالية ظهور الإنتكاسة وانتشار النقائل و مضاعفات ما بعد الجراحة مثل عدوى الجرح وحصول تسرب المفاغرة Anastomosis leak ، والتهاب الصدر، والفشل الكلوي ، وتجلط الأوردة العميقة Deep vein thrombosis (DVT) ، والناسور (Meryud *et al.* , 2022 ; Keung *et al.* , 2016) .

وذكرت دراسات إن من الصفات الرئيسية للأورام التي تؤدي إلى فشل العلاج هو أن البيئة الدقيقة للأورام السرطانية تتميز باحتوائها على مناطق لبيه ناقصة التأكسج Hypoxic core بمحتوى أوكسجيني يتراوح بين 10الى 30 مليمتر زئبق ناتج عن نمو الورم السريع مع عدم كفاية الدم المجهز ، ومراكز نخرية Necrotic Centers ناتجة عن موت الخلايا الورمية بسبب نقص المغذيات والنمو الخلوي السريع غير المسيطر ، كذلك تمتاز ببيئة حامضية يتحكم بها وجود حامض اللاكتيك الناتج من الأيض اللاهوائي بسبب نقص الأوكسجين ، مما يجعل معظم علاجات السرطان غير فعالة بسبب نقص الأوكسجين وتكون الأوعية الدموية Vasculature غير الطبيعية (Jing *et al.* , 2019;Enejiyon *et al.*, 2020) .

وضح Sedighi وآخرون، (2019) انه قد تم اقتراح استخدام مجموعة من العلاجات البديلة أو التكميلية لتحسين ورفع فعالية علاجات السرطان التقليدية ، مثل العلاج الجيني ، العلاج الغذائي ، العلاج الديناميكي

الضـوئي ، هاملـت HAMLET (ألفـا لاكتـالبومين البشـري القاتـل للخلايـا السـرطانية)، عـلاج الــ Telomerase ، علاج الفرط الحراري Hyperthermia ، والعلاج الجرثومي .

فـي مجـال العـلاج المنـاعي ، يمكـن للبكتيريـا أن تعمـل كعوامـل منبهـة مناعيـة قويـة ومركبـات توصـيل مستهدفة ، إذ يمكنها أن تحلل الخلايا السرطانية مباشرة مما يولد وفرة من مستضدات الورم التي قد تسرع من الاستجابة المناعية ، فضلاً عن أنه يمكن للعوامل المشتقة من البكتيريا على سبيل المثال الأنماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs) أن تبدأ في إفراز السيتوكينات المسببة للالتهابات التي تعزز تجنيد الخلايا المناعية ، ويمكن أيضاً أن تعمل المكونات البكتيرية المختلفة ، منها بروتين السوط ومتعدد السكاريد الدهني (LPS) والسموم الخارجية كمواد مساعدة قوية في تركيبات اللقاحات النانوية (Holay *et al.*,2021) .

يتضـمن العـلاج المنـاعي للسـرطان العديـد مـن التحضـيرات Preparations التـي تـؤدي إلـى تضـخيم الاستجابات المناعية المتخصصة وغير المتخصصة Specific and non - specific للورم وتشمل : التمنيع النشط Active immunization ، العلاج السلبي بالأجسام المضادة Passive therapy with antibodies ، استخدام لقاحات بكتيرية حية أو مضعفة أو مقتولة ، استخدام السايتوكينات و نقل الخلايا المؤثرة والفعالة ، إذ يتطلب التمنيع ضد الورم إلى امتلاكه لمستضدات محددة Specific antigens وهذه المستضدات تتفاعل مناعياً مع أي لقاح محضر (Coico & Sunshine,2009) . ومثلت العلاجات الانتقائية المستهدفة محط اهتمام دراسات عديدة من ابرزها أنه على الرغم من أن البكتيريا تتسبب بعدد كبير من أنواع السرطان ، إلا أن معظمها تملك أنشطة ضد مايكروبية وضد فطرية والتي يمكن استخدامها في علاجه (Tarhriz *et al.*,2020).

6.2 علاج السرطان بواسطة البكتيريا Bacteria-mediated cancer therapy(BMCT)

تم اكتشاف علاج السرطان باستخدام البكتيريا في أواخر القرن التاسع عشر من قبل الجراح طبيب ألأورام ألامريكي William B.Coley إذ أعلن عن حصول تراجع تلقائي للأورام في المرضى المصابين بعدوى المكورات العقدية *Streptococcus* ، وبذلك وُلد العلاج البيولوجي للسرطان وتطور إلى ما يعرف اليوم بالعلاج المناعي (Guo *et al.* , 2020) ، وقاد اكتشافه إلى ظهور العديد من الدراسات التي اثبتت تحقيق نتائج مذهلة عند استخدام الانواع البكتيرية المختلفة في قمع وكبت الأورام المتنوعة (Ebrahimzadeh *et al.*, 2021) للمرضى الذين يعانون من الأورام اللحمية Sarcomas والسرطانات Carcinomas والأورام اللمفاوية Lymphomas والأورام الميلانينية Melanomas والأورام النقوية Myelomas (Wang *et al.*, 2021) . وقد استخدمت العديد من الاستراتيجيات في أبحاث BMCT مثل

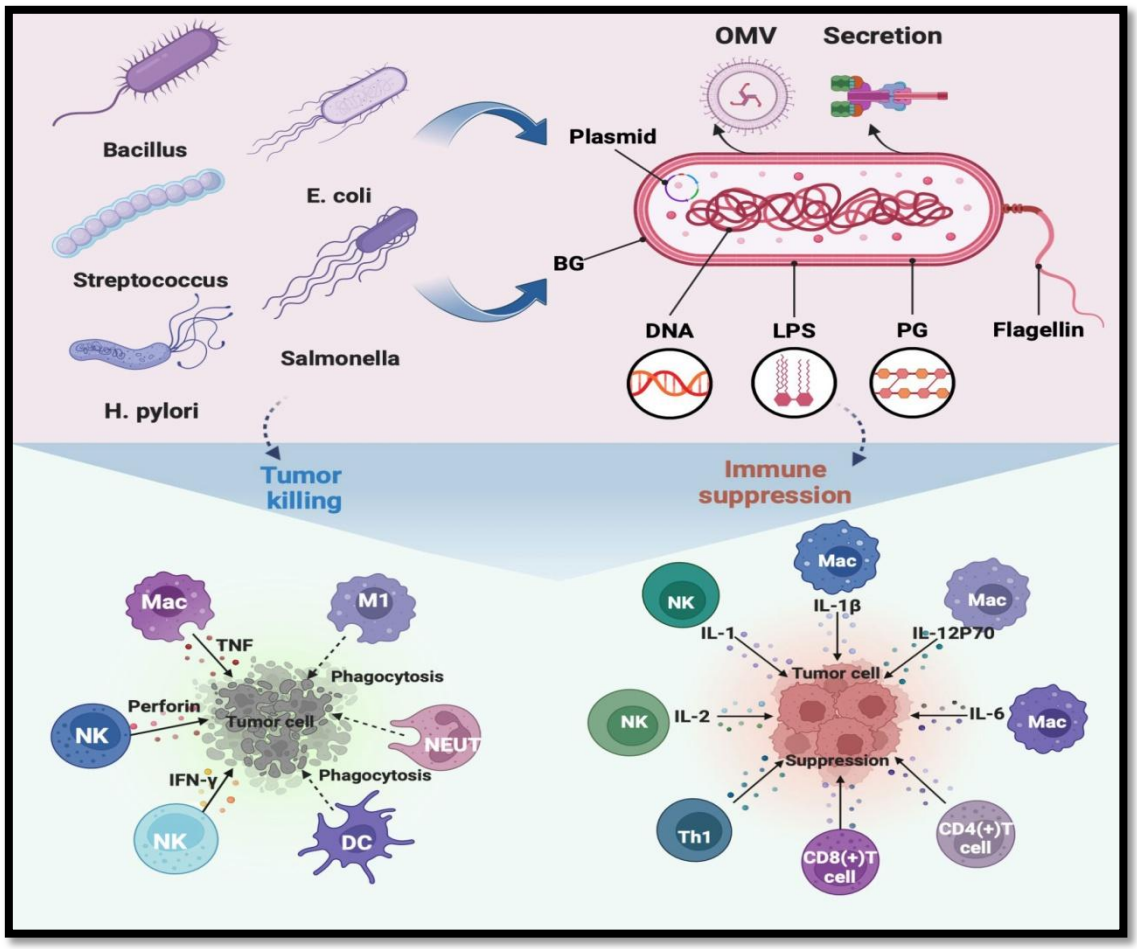
ميزة الاستهداف البكتيري للورم tumor-targeting والاختراق (النفوذية) داخل الورم ، والسمية الخلوية البكتيرية ، والتعبير عن العوامل المضادة للسرطان ، واستراتيجيات تحفيز gene-triggering لجينات المضيف ، والعلاج المناعي (Aganja *et al.*, 2022) .

وأشارSong وآخرون، (2018) أن علاج السرطان الآمن بوساطة البكتيريا يجب أن يتمتع بميزات مثل تأثيره السام للخلايا السرطانية Cytotoxicity أو قدرته على توليد المناعة (الاستمناع) Immunogenicity ، السمية المنخفضة على الخلايا السليمة ، الانتقائية للسرطان Selectivity بالإضافة إلى الاستقرار و الثبات في داخل الجسم البشري .

يعد نقص الأكسجة Hypoxia وتشوهات Abnormalities الأوعية الدموية وانخفاض درجة الحموضة pH والمناطق النخرية Necrosis من السمات الشائعة للأورام الصلبة (Kang *et al.*, 2022)، وهي من العوائق الرئيسية أمام العلاجات التقليدية ، ومع ذلك ، فإنها توفر الظروف الملائمة لإستهداف واستعمار وتكاثر بعض البكتيريا اللاهوائية الإجبارية أو الاختيارية (Chen *et al.*, 2021).

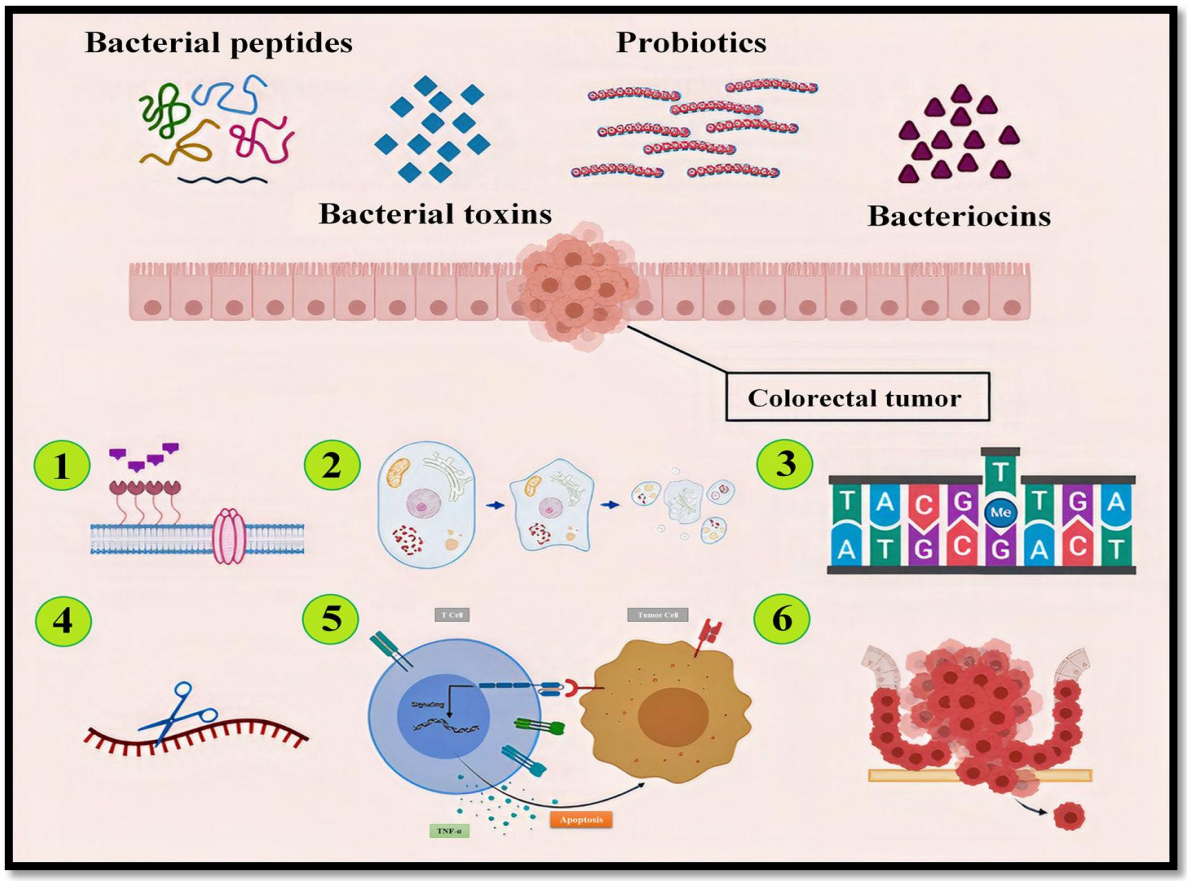
وكثيرا ما يتم ذكر الأنواع البكتيرية الشائعة كالـ *Bifidobacteria* sp., *Salmonellae* sp. و *Clostridia* sp. وتأثيراتها المضادة للسرطان في الابحاث والمراجعات العلمية وتم اختبارها في نماذج حيوانية تحمل أورامًا مختلفة كناقل Vector لتوصيل مجموعة واسعة من الجينات مثل الجينات المضادة لتكوين الأوعية الدموية Anti-Angiogenesis ، وجينات الموت المبرمج للخلايا Apoptosis ، والجينات الكابتة للورم Tumor suppressor، والمستضدات المرتبطة بالورم tumor-linked (Felgner *et al.*, 2018 ; Yang *et al.*, 2020) .

أخذ العلاج البكتيري للسرطان حيز كبير بسبب تأثيره العالي المحفز للمناعة (Ling *et al* .,2023) والموضح بالشكل (2-4) ، إذ يؤدي إلى تحفيز استجابة مناعية محددة لدى المرضى للسماح لأنواع مختلفة من خلايا المضيف المناعية بمهاجمة الخلايا السرطانية ، بمجرد تنشيط هذه الخلايا المناعية (بشكل أساسي الخلايا الليمفاوية $CD8^+$ و $CD4^+$ الخاصة بمستضد الورم المنشطة والمحفزة) يمكنها التعرف على الخلايا السرطانية وتدميرها (Sedighi *et al.*, 2019) .



الشكل (2-4) تنظيم الخلايا المناعية داخل البيئة الدقيقة للورم يتمثل باستخدام البكتيريا أو مكوناتها ومشتقاتها البكتيرية ، يشمل القتل المباشر للخلايا السرطانية وتعديل البيئة المثبطة مناعياً عن طريق تنشيط الخلايا المناعية لإطلاق العوامل المناعية (Zhou *et al.* , 2023)

واظهر استخدام البكتيريا لعلاج سرطان القولون والمستقيم فاعلية كبيرة أشار لها العديد من الباحثين وتم التعرف على اهم الآليات لدورها في العلاج كما هو موضح بالشكل (2-5) ، كإفرازها للسموم و البيتيدات البكتيرية ، مواد تفرزها البكتيريا تستخدم كناقل دوائي لضمان وصول العلاج إلى الخلايا السرطانية المستهدفة التي تُظهر مقاومة لتلك العقاقير (Lu *et al.*, 2024) ، فضلاً عن دورها كعلاج تكميلي Probiotics للوقاية من خطر سرطان القولون (Hendler & Zhang , 2018; Ebrahimzadeh *et al.*,2021) .



الشكل (2-5) تأثير العلاج البكتيري المضاد لسرطان القولون يتحقق من خلال الاليات التالية : 1) تكوين الثقوب Pores في غشاء الخلية ، 2) تحريض الموت الخلوي المبرمج ، 3) إضافة مجموعة الكيل Alkylation للحمض النووي ، 4) نشاط انزيمات الـ RNase ، 5) إنتاج عامل النخر الورمي الفا TNF-α ، 6) تثبيط تكون النقائل Metastasis (Ebrahimzadeh *et al.*,2021)

يحتوي سطح خلايا سرطان القولون والمستقيم على العديد من المستضدات الخاصة بالورم Tumor-specific antigens ويعمل معظمها كمستقبلات ، إذ تنشط العديد من السموم البكتيرية بعد ارتباطها بهذه المستقبلات (Shafiee *et al.*, 2019) ومن ثم يكون للسموم البكتيرية تأثير مزدوج على الخلايا السرطانية بناءاً على تركيزها ، ففي المستويات العالية يمكن أن تسبب تحلل الخلايا وموتها ، بينما في التركيزات المنخفضة يمكنها أن تحور في العمليات الخلوية المسؤولة عن التكاثر وتنظيم موت الخلايا المبرمج (Masso-Welch *et al.*, 2019) .

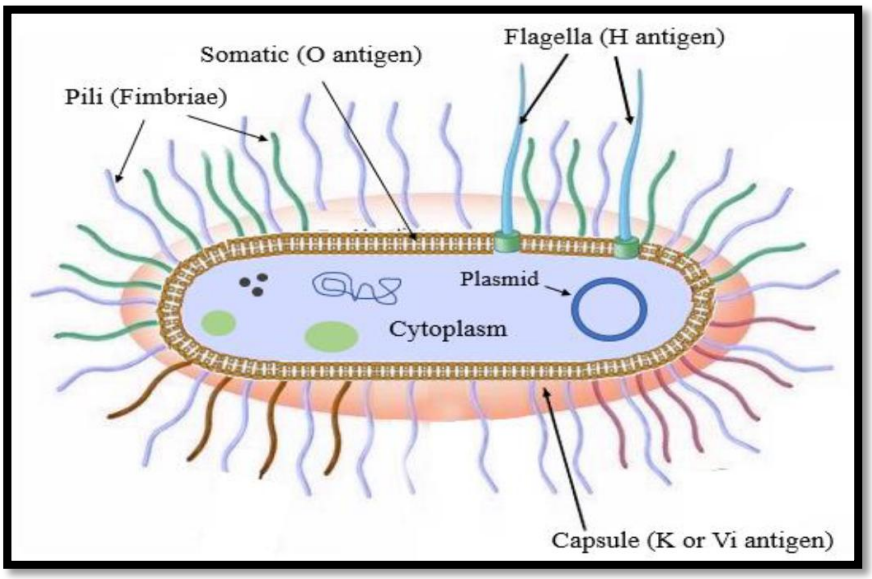
وأشار Karpiński وآخرون،(2016) أن لبعض البتيدات الضد بكتيرية Bacteriocins خصائص مضادة للسرطان ، تساعد على زوال استقطاب غشاء الخلية السرطانية (Kaur & Kaur ,2015) ، وتعزيز السمية الخلوية لبعض العلاجات الكيميائية عند استخدامها بالتآزر (Lewies *et al.*, 2018) ، فضلا عن دور البتيدات البكتيرية كمادة حيوية Biomaterial في علاج السرطان و كعامل مضاد للتكاثر Anti-proliferative لكونها تملك القابلية على تنشيط كل من الخلايا الليمفاوية والبلاعم وكذلك تحفز إنتاج عامل

النخر الورمي الفا TNF-α كمادة سامة للخلايا ، التي تنشط عن طريق الإلتهابات الميكروبية (Huang *et al.*, 2020) .

1.6.2 العلاج بواسطة الـ *Salmonella*

1.1.6.2 التوصيف Description

يعود جنس السالمونيلا *Salmonella* إلى عائلة الجراثيم المعوية Enterobacteriaceae وهي جراثيم سالبة لصبغة كرام ، تأخذ شكلاً عصوياً مستقيماً ،هوائية أو لا هوائية اختيارية ، غير مكونه للابواغ أو للمحفظة ، واغلب انواعها تتحرك بواسطة اسواط محيطية Peritrichous flagella (Noor *et al.*, 2023) ، وتملك ثلاث محددات مستضدية رئيسية : المحفظية K و السوطية H والجسمية O اعتمدت في تحديد التنميط المصلي للجرثومة حسب ما طوره Kauffman و White في مخططهما المعتمد على هذه المحددات ومن ثم تتجلى أهميته في فهم إمراضية ووبائية الجرثومة (Feasey *et al.*, 2012) . ويوضح الشكل (2-6)هيكل السالمونيلا مع المحددات المستضدية .



شكل (2-6) رسم تخطيطي لهيكل السالمونيلا (Teklemariam *et al.* 2023)

2.1.6.2 تصنيف الجرثومة Classification

تم تصنيف جنس السالمونيلا Phylogeny اعتماداً على الاختلافات في تحليل تسلسل الحمض النووي الريبي 16S rRNA إلى نوعين : السالمونيلا المعوية *Salmonella enterica* و *Salmonella bongori* ، ثم قسم النوع المعوي *S. enterica* إلى ستة أنواع فرعية Subspecies بناءاً على ارتباطها الجينومي وخصائصها البيوكيميائية (Guard , 2022) ، ويُشار إلى الأنواع الفرعية بالأرقام الرومانية وهي :

I, *S. enterica* subsp. *enteric* ; **II**, *S. enterica* subsp. *salamae* ; **IIIa**, *S. enterica* subsp. *arizonae* ; **IIIb**, *S. enterica* subsp. *diarizonae* ; **IV**, *S. enterica* subsp. *houtenae* ; **VI**, *S.enterica*subsp. *indica*.

يشمل الجنس على أكثر من 2500 نوع مصلي مميز ، 1600 نمط مصلي منها يعود الى النوع المعوي *S. enterica* (Elnekave *et al.*, 2020) .

من بين سلالات السالمونيلا جميعها ، تتواجد *S. enterica* subsp. *enterica* (I) في الغالب في الثدييات وتساهم بحوالي 99٪ من حالات عدوى السالمونيلا في البشر والحيوانات ذوات الدم الحار (Xu *et al.*, 2021) ، بينما توجد سلالات السالمونيلا الخمسة الأخرى و *S. bongori* بشكل رئيسي في البيئة وكذلك في الحيوانات ذات الدم البارد ، ومن ثم تكون نادرة في البشر (Eng *et al.*, 2015) .

اعتماداً على الاعراض والعلامات السريرية لمرض السالمونيلا Salmonellosis في الإنسان ، قُسمت سلالات السالمونيلا إلى السالمونيلا التيفوئيدية (Typhoid Salmonella) وتشمل *S.* Typhi و *S.* Paratyphi A, B , C التي تصيب الإنسان فقط ، والسالمونيلا غير التايفوئيدية Non-typhoid (Salmonella NTS) التي عادة ما تسبب اخماج المعدة والأمعاء للإنسان والحيوان ، في حالات عدوى الإنسان تظهر الأعراض السريرية المتمثلة بالحمى المعوية ، والتهاب المعدة والأمعاء ، غزو البكتيريا للدم Bacteraemia مع المضاعفات الخارجية (Sheorey & Darby, 2008) .

3.1.6.2 الامراضية Pathogenesis

تتباين شدة عدوى السالمونيلا في الإنسان اعتماداً على كل من النمط المصلي المصيب ، مقدار الجرعة اللازمة على إحداث الإصابة ، وعلى الحالة الصحية للمضيف ، فالأطفال الذين تقل أعمارهم عن الخمس سنوات و كبار السن والمرضى الذين يعانون من كبت المناعة هم أكثر عرضة لعدوى السالمونيلا من الأفراد الأصحاء (Eng *et al.*, 2015) .

تعد السالمونيلا أحد مسببات الأمراض المعوية التي تنتقل عن طريق الفم Orofecally وتسبب التهابات تتنوع من التهاب المعدة والأمعاء الموضعي Gastroenteritis إلى الحمى المعوية الجهازية (حمى التيفوئيد) (Teklemariam *et al.*, 2023) ، وتظهر علامات الالتهاب المعوي الناتج عن عدوى السالمونيلا غير التيفوئيدية على شكل إسهال قوي مع قيء ، حمى ، تشنجات بطنية ، غثيان ، صداع وسعال و يستمر المرض المحدد ذاتيا Self-limiting عادة من 4 - 7 أيام بدون علاج بالمضادات الحيوية قبل الشفاء التام اعتماداً على حالة المريض (Abudabos *et al.*, 2020) . مع ذلك ، فان مرضى الحالات الخاصة هم تحت خطر الإصابة بتجرثم الدم أو العدوى الغازية مثل التهاب كل من السحايا أونقي العظم أوالأوعية الدموية أوالتهاب المفاصل الإنتاني (CDC , 2023) ، في حين تعد سلالات السالمونيلا التيفوئيدية

مسؤولة عن حالات العدوى المنتشرة مع أعراض تشمل الحمى المستمرة من (39- 40) °م ،الصداع ، الإسهال أو الإمساك ، فقدان الشهية (Wibisono *et al.*, 2020) .

وذكر Lamichhane وآخرون ،(2024) إرتباط هذه الجرثومة بالحيوانات فتسبب التهابات للجلد بوساطة انتقالها عبر الدم من أمعاء الحيوانات المصابة ، ويرتبط خطر انتقالها إلى البشر (من المزرعة إلى المائدة farm-to-fork continuum) باستهلاك المنتجات الغذائية المشتقة من الحيوانات فتشمل الدواجن ومنتجاتها بالدرجة الاساس ، يليها لحم البقر والأسماك والأغذية غير المشتقة من الحيوانات مثل الفواكه والخضروات. كذلك ، فان عدوى السالمونيلا ترتفع في فصل الصيف عند درجات الحرارة الدافئة وبذلك تزدهر في الأطعمة المحفوظة بدرجة حرارة الغرفة (Noor *et al.*, 2023) .

إن نجاح السالمونيلا على إحداث المرض يعتمد على تحقيق ثلاث عمليات وهي : أ- قدرتها على اختراق الغشاء المخاطي المعدي المعوي ، ب- قدرتها على إحداث الإسهال ، ج- قدرتها على الإنتشار من الأمعاء وتكاثرها واستمرارها داخل الجهاز الشبكي البطاني (Chaudhary *et al.*, 2015) .

تبدأ دورة الاصابة بجرثومة السالمونيلا بعد عملية ابتلاعها ووصولها إلى المعدة وبعد أن تجتاز حموضة المعدة التي تعد الخط الدفاعي الأول ضد الإصابات المعوية ، لتصل إلى الامعاء وهنا عليها أن تجتاز الطبقة المخاطية المغطية لظهارة الامعاء الدقيقة وأن تتجنب إفرازاتها الدفاعية وكذلك إفرازات البنكرياس وكيس الصفراء ، إن افراز الكلوبيولين المناعي IgA ومخاطية الامعاء يمكن أن يلعب دوراً في تجنب اختراق السالمونيلا للخلايا المعوية (الراوي ، 2003) . بعد تحقق الإلتصاق ، يحدث الادخال البكتيري Internalization إما بوساطة التقاط البكتيريا بعملية البلعمة أو عن طريق الغزو النشط لكل من الخلايا البلعمية وغير البلعمية (Galán, 2021) وتمتلك السالمونيلا سمة مميزة أثناء غزوها للخلايا غير البلعمية في الانسان ، إذ أنها تحفز البلعمة الخاصة بها من أجل الوصول إلى خلية المضيف ، السبب الجيني وراء هذه الاستراتيجية البارعة يتمركز في جزر الامراضية للسالمونيلا *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) ، وهي مجموعة أشرطة جينية كبيرة تتموضع في الكروموسوم البكتيري وتشفر للتراكيب المساهمة بعملية الغزو (Grassl & Finlay, 2008) . بعد أن تجتاز الجرثومة الطبقة المخاطية التي تغطي ظهارة الامعاء يتم نقلها عبر حاجز الامعاء بشكل رئيسي عندما تتصل مع كل من الخلايا المعوية وكذلك خلايا M (خلايا الطيات الدقيقة المتخصصة المتمركزة في الأنسجة اللمفاوية) التي تغطي لطخات باير اللفائفية ، وباتصالها بخلايا M تدخل الجراثيم وتنتقل إلى الأنسجة اللمفية تحت المخاطية ومنها إلى جهاز الدوران ، تتكاثر الجرثومة داخل الخلية البلعمية ولطخات باير والأنسجة اللمفاوية الأخرى الموجودة داخل الطبقة تحت المخاطية للأمعاء وتبدأ بإطلاق الذيفان المعوي(Enterotoxin)، أن تجنيد الخلايا الاحادية النواة والخلايا اللمفية يؤدي إلى تضخم ملحوظ وتنخر في عقد باير بعد عدة أسابيع من الإصابة وهذه العملية تسبب الآلام البطنية المصاحبة للإصابة والتهاب الاعور الكاذب الذي يزامن احياناً الاصابة بـ *S.Typhimurium* إذ يعمل الذيفان المعوي مع البروستاكلاندين الذي تفرزه الخلايا البطانية على زيادة Adenosin

monophosphate (AMP) مما يؤدي إلى زيادة امتصاص الماء والسوائل من الدم وتجمعها داخل تجويف الامعاء ومن ثم حصول حالات الاسهال الشديدة (الراوي، 2003 ;2019 , Dillon & Lo).

وتعد قدرة سلالات السالمونيلا على البقاء في خلية المضيف أمراً بالغ الأهمية لإمراضيتها ، فبعد دخول الجراثيم إلى خلية المضيف ، يتم تطويقها في حجرة غشائية تسمى الفجوة والتي تتكون من غشاء خلية المضيف ، في ظل الظروف العادية ، فإن وجود الجسم الغريب البكتيري من شأنه أن ينشط الاستجابة المناعية مما يؤدي إلى اندماج الجسيمات الحالة Lysosomes التي تفرز الانزيمات الهاضمة لتحلل البكتيريا الداخل خلوية (Bakowski *et al.*, 2008) ، ومع ذلك ، تستخدم السالمونيلا نظام Type III secretion system(TTSS) لحقن بروتينات مؤثرة أخرى داخل الفجوة مما يتسبب في تغيير بنيتها وبالتالي تمنع الفجوة المعاد تشكيلها من اندماج الجسيمات الحالة معها وهذا يسمح ببقاء وتكاثر الجرثومة داخل الخلايا (Eng *et al.*, 2015) .

تتضمن عملية البلعمة آليات معقدة تعتمد على مشاركة مستقبلات متعددة ، من ابرزها مستقبلات تمييز النمط Pattern Recognition Receptors(PRRs) التي تضم مستقبلات Toll-like receptors (TLRs) ، والتي بدورها تتعرف على اجزاء بكتيرية معينة تسمى الأنماط الجزيئية المصاحبة لمسبب المرض Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) مثل متعدد السكريد الدهني Lipopolysacchariedl (LPS) وبروتين الفلاجلين الموجود إما على سطح الخلية أو داخل الجسيمات البلعمية (Galán, 2021) ، ويؤثر هذا التعرف على نضوج الجسيمات البلعمية ، كذلك يحفز مسار الإشارات ويحور التعبير الجيني (Kumar *et al.*, 2009) .

تشير الدراسات إلى أن التفاعل بين TLR وLPS في السلالات غير التيفوئيدية يلعب دوراً حيوياً في تطور وقوع الصدمة الإنتانية (Lamichhane *et al.*, 2024) . يعتمد غزو واستعمار السالمونيلا لخلايا المضيف على امتلاكها لعوامل فوعة عديدة .

4.1.6.2 عوامل الضراوة Virulence Factors

تعرف الفوعة (الضراوة) على أنها مقياس لدرجة إمراضية الكائن المجهري وتتمثل بالقابلية النوعية له على إحداث الخمج نظراً لامتلاكه العديد من عوامل الفوعة الواقع قسم منها ضمن التركيب الخلوي والقسم الاخر يفرز خارجياً (Mellor *et al.*, 2022) . توجد عدة عوامل ترتبط مباشرة بضراوة هذه الجرثومة تشمل : الذيفانات (Toxines) والتي تقسم الى ثلاثة انواع هي الذيفان المعوي (Enterotoxin) والذيفان الخلوي (Cytotoxin) والذيفان الداخلي (Endotoxin) (Thakur *et al.* , 2022) . فضلاً عن عوامل الإلتصاق والحركة والتي تضم النوع الهدبي الاول Type I Pili-Fimbriae وهي إمتدادات هدبية على سطح الخلية الجرثومية تعمل على تسهيل التصاق السالمونيلا بالأمعاء ومقاومة حركتها الالتوائية ، وإن الالتصاق واختراق الخلايا الظهارية للأمعاء يحتاج إلى بروتينات تخلقها هذه الجراثيم بفعالية تستحث

بواسطة التراكيب الحساسة المتواجدة على سطح الخلايا الظهارية (Kallas *et al.*, 2020) ، ومن ثم غزو الخلايا ، وتكاثرها وبقاءها حية داخل الخلايا الظهارية والبلاعم وذلك بفضل مشاركة العديد من عوامل الفوعة التي تحملها البلازميدات غالبًا (Kaur *et al.*, 2021) . وقد ذكر Fàbrega & Vila ، (2013) أن لجرثومة السالمونيلا 24 جُزر مسببة للأمراض (SPIs) تساعد على العديد من عوامل الفوعة بما في ذلك (i) أنظمة الإفراز ، تخليق السوط و الأهلاب و الكبسولة ، (ii) استعمار خلية المضيف ، (iii) آليات التهرب والبقاء ، و (iv) التحول المصلي Seroconversion . بينما اشار Fattinger وآخرون ، (2021) أنه توجد ما يقارب 21 من تلك الجُزر في النوع المصلي *S. enterica* تُرمّز للجينات المطلوبة للإمراضية ، البقاء داخل المضيف ، و ادامة جينات Housekeeping .

فضلاً عن عوامل الفوعة التي تلعب دوراً حيوياً في التهرب من دفاعات المضيف التي تشمل أنظمة افراز البروتين ، والكبسولة ، والسوط ، والاهلاب ، تكوين الغشاء الحيوي Biofilm (Teklemariam *et al.*, 2023) ، تعمل مكونات الجدار الخلوي على زيادة ضراوة الجرثومة بوساطة دور متعدد السكريد الشحمي (LPS) في مقاومة الظروف القاسية داخل الخلايا البلعمية ، فضلاً عن دوره في تكوين مستعمرات جرثومة *S. Typhimurium* في أمعاء الفئران ، كما أن قابلية هذه الجرثومة على مقاومة الظروف المضاده داخل الخلايا البلعمية يتمثل بقابليتها على انتاج انزيمي Super oxide dismutase و Catalase (Tang *et al.*, 2022) ، فضلا عن قدرتها على انتاج انزيم البروتييز الحال للبروتين الذي يعمل على تدمير أنسجة المضيف والتداخل مع آليات المضيف الدفاعية ، وانزيم الهيمولايسين الحال للدم ، وانزيم الليبيز المحلل للدهون (الاعرجي ، 2023) . لكن هناك عدة عوامل يعتقد أنها تعمل بطريقة غير مباشرة على زيادة ضراوة جرثومة السالمونيلا مثل المقاومة للمضادات الحيوية فضلاً عن بعض الخواص الكيموحيوية التي تشفر لها بلازميدات قادرة على الانتقال بوساطة عملية الإقتران مثل القابلية على تخمير سكر الرافينوز وانتاج كبريتيد الهيدروجين والقابلية على استهلاك العديد من المركبات (الراوي ، 2003).

5.1.6.2 توصيف النمط المصلي *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

تعد السالمونيلا المعوية المصلية بكتيريا ممرضة مسؤولة عن تفشي داء السالمونيلا Salmonellosis وأحد مسببات الأمراض الهامة المنقولة بالمصادر الملوثة كالغذاء وخصوصا اللحوم أو الماء ، أو الاتصال بالأشخاص المصابين أو الحيوانات وتعرف باسم السالمونيلا غير التيفوئيدية (Moghadam *et al.*, 2023; Safi *et al.*, 2022) ، لها القدرة على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون والحامض الاميني اللايسين كمصدر للنتروجين، ليس لها القدرة مطلقاً على تخمير سكر اللاكتوز أو السكروز ، سالبة لاختبار الاوكسديز، تنتج حامض وأحيانا غاز من تخميرها للكلوكوز والمانوز وغالبا تنتج غاز كبريتيد الهايدروجين H_2S ، وهي قادرة على البقاء حية لمدة طويلة في المياه الجامدة ، مقاومة لبعض المواد الكيمياوية (Brilliant green , Sodium tetrathionate , Sodium deoxycholate) المثبطة لباقي

أفراد البكتريا المعوية وبذلك تفيد هذه المركبات في إدراجها ضمن مكونات اوساط الغراء الصلب بهدف العزل الخاص لأنواع السالمونيلا من عينات البراز (Riedel *et al.*,2019) ، يمكن عزلها بسهولة من خلال نموها على وسط آكار الدم أو وسط الماكونكي الصلب ، وباستخدام الأوساط الزرعية الانتقائية لها أو التفريقية كـ Shigella Salmonella agar (SSA) و وسط Xylene lysine deoxycholate (XLD) و وسط Hekton Enteric agar (HEA) (Kadhim, 2020) .

تصنف بكتيريا *S. Typhimurium* وفق ما ورد في (Jawetz *et al.*, 2013) كالآتي :

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family :Enterobacteriace

Genes: *Salmonella*

Species*: Enterica*

Serotype :*Typhimurium*

استخدمت هذه الجرثومة في دراسات واسعة حول إمراضية الجرثومة والمناعة المتكونة لها في فئران التجارب وخلايا اللبائن التي استخدمت كنموذج لدراسة التفاعلات التي تحدث بين الطفيلي والعائل (الراوي ، 2003) .

2.6.2 تأثير السالمونيلا المضاد للسرطان *Salmonella* The anti - cancer effect of

تم اكتشاف تأثير بكتيريا السالمونيلا المضاد للأورام لأول مرة عام 1935 بوساطة تجربة الحساسية النزفية على الحيوانات المختبرية (Wang *et al.*, 2021) ، وبعد ذلك ساعد كل من الفهم العميق لبيئة الورم الدقيقة Tumor microenvironment(TME) المناعية والتطور الحاصل في علم الحياة الجزيئي وخصوصاً في مجال تحديد التسلسل الشامل للجينوم البكتيري وتنوع تقنيات هندسة الجينات إلى تعزيز مرونة استخدام البكتيريا كعوامل مضادة للأورام بشكل كبير ، وعن طريق توهين Attenuation البكتيريا الذي يقلل من سميتها بينما يرفع من قابليتها في تحفيز كل من الإستجابة المناعية الفطرية والمكتسبة المضادة للأورام داخل المضيف ، حيث يمكن للسالمونيلا أن تستهدف وتستعمر أنسجة الورم منخفضة الأوكسجين وتقتل الخلايا السرطانية بشكل مباشر ، وأن تسبب حدوث تغييرات في مناعة البيئة الدقيقة للورم (Liang *et al.* 2019; Zhou *et al.* 2018) ، ومن خلال الدراسات السريرية على تأثير العلاج البكتيري كإستراتيجية مهمة مضادة للأورام ، ولكون إن العديد من البكتيريا تمتلك القدرة على إستعمار البيئة الدقيقة للورم ، فقد اشار Panteli وآخرون ، (2020) أن إمكانية الكشف عن الأورام الصغيرة والنقائل

Metastases المنتجة للمعلمات الحيوية Biomarker المتفلورة يتم عن طريق تخليق السالمونيلا المهندسة وراثياً الفارزة للفلورسين التي تتخذ من تلك الأورام والنقائل عشاً تتراكم فيه . كذلك يمكن التحري عن مسار السالمونيلا الحاملة للبيتيد المعلم بصبغة الفلورسنت وذلك بتتبعها باستخدام التصوير متعدد الوسائط للأورام المستحثة بالفئران المختبرية (Xiong *et al.*, 2020). كما اوضح Aganja وآخرون ،(2022) إن من بين العديد من الأنواع البكتيرية ذات التأثير المضاد للسرطان ، تظل بكتيريا السالمونيلا في المقدمة نظراً لتفضيلها للإستعمار والتكاثر داخل البيئات الدقيقة النخرة والناقصة التأكسج لكل اشكال الأورام ونقائلها وغالباً ما تمنع نمو الورم.

1.2.6.2 تأثيرات الـ *S. Typhimurium* في علاج سرطان القولون *S. Typhimurium* effects in Colon cancer therapy

تعد *S. Typhimurium* واحدة من أكثر الأنواع البكتيرية الواعدة في العلاج والتي شاع استخدامها في دراسات BMCT نظراً لامتلاكها لآليات فريدة مضادة للورم منها : الإستعمار المستهدف للورم ، قدرتها الذاتية على تحليل الورم ، تنظيم الاستجابة المناعية ، مرونة التعديل الوراثي إذ تم تصميمها في دراسات عديدة كعوامل علاجية تستهدف السرطان وساعد ذلك بجعلها ناقلاً مثالياً لتوصيل الادوية والجينات (Yang *et al.*, 2023) .

فقد ذكر Jawalagatti وآخرون ، (2022a) بإمكانية استخدام الجرثومة لتوصيل السموم التي تحفز موت الخلايا السرطانية عن طريق تنشيط انزيم caspase-3 المهم في مسار موت الخلية المبرمج ، وأيضاً كأداة متخصصة للعلاج المناعي للسرطان عن طريق توصيل مستضدات الورم وتعريض بيئة الورم للجهاز المناعي في المضيف ، وأشار Al-Ramadi وآخرون ، (2008) إن نسبة الاستعمار والتراكم التفضيلي للسالمونيلا في انسجة الورم تتراوح ما بين 10^3 إلى 10^4 مرات أكثر مما هي عليه في أنسجة الجسم الطبيعية وهذا الاستعمار يحدث في غضون أيام قليلة في معظم الحالات ، إذ يعتقد بان بيئة الورم ناقصة الاكسجة وضعيفة التكوين الوعائي هي البيئة المفضلة لنموها وتكاثرها(Liang *et al.*,2019)، كما اوضح Semenov وآخرون، (2011) بقدرة السالمونيلا على النمو في كل من البيئات الهوائية واللاهوائية ، ومن ثم تمكنها من استعمار كل من الأورام غير ناقصة التأكسج وناقصة التأكسج . فضلاً عن ذلك ، تُظهر السالمونيلا الموهنة خصوصية عالية للورم وإمكانية على اختراق الأنسجة العميقة وذلك بوساطة حركتها وامتلاكها لعدة مستقبلات كيميائية كمستقبل الأسبارتات Aspartate الذي يمهد بداية الانجذاب الكيميائي نحو أنسجة الورم الحية ، ومستقبلات السيرين لحثها على اختراق الأنسجة ، ومستقبل الريبوز لتنظيم هجرتها نحو الأنسجة الميتة (Ganai *et al.*,2011) ، وقد أظهرت العديد من الدراسات أن كل من الحركة والانجذاب الكيميائي العالي للسالمونيلا نحو الريبوز والسيرين والاسبارتيت التي تنتجها الخلايا الخاملة وناقصة الاوكسجين داخل الأورام الحميدة والمنتشرة هما العاملان الرئيسيان لذلك التوجه (Anderson

(Silva-Valenzuela *et al.*,2015; *et al.*,2016) ، لكن أشارت دراسة اخرى إلى أن البيئة الدقيقة للورم (TME)، والتمثيل الغذائي البكتيري ، والجهاز الشبكي البطاني للمضيف هي التي تسبب هذه الالفة (Stritzker *et al.*,2010) .

كما ذكرت بعض التجارب العلمية السريرية الحديثة إلى امكانية استفادة مرضى سرطان القولون والمستقيم المرتد Refractive CRC من التفاعلات المعززة لمناعة الورم (DeNardo & Ruffell ,2019) ، وعلى وجه الخصوص الخلايا البلعمية المرتبطة بالورم Tumor associated microphages (TAMs) التي تحرر مواد معينة تعمل كوسائط تساعد في تكوين الاستجابة المناعية التكيفية لدى مريض السرطان (Trumpi *et al.*, 2018) ، تشمل TAMs نوعين من الأنماط المظهرية هي : M1 (المنشطة بالمسار الكلاسيكي) وM2 (تنشط بالمسار البديل) ، تشتهر البلاعم M1 بوظائفها المضادة للورم بإنتاجها للسايتوكينات المحرضة للإلتهاب ولعامل النخر الورمي – الفا(TNF-α) ، في حين تعمل البلاعم M2 على تعزيز ظهور الخلايا السرطانية وانتشارها وتولد الأوعية الدموية للورم وتطور الورم (Boutilier & Elsawa ,2021) ، وعند غزو السالمونيلا ، تستجيب البلاعم TAM باستجابة فطرية مجبرة لإنتاج السيتوكينات المحرضة للإلتهاب ، وهذا التحفيز في TAM بدوره يعيد برمجة بلاعم M2 الكابحة للمناعة إلى بلاعم M1 المنشطة للمناعة (Pangilinan *et al.*,2021) .

إن قدرة السالمونيلا على تدمير البيئة الدقيقة اللازمة لنمو الورم يمكن أن يتعدى إلى قابليتها على قتل الخلايا السرطانية عن طريق التعبير عن نظام إفراز من النوع الثالث (TTSS) أو تحفيزها للعوامل المضادة للورم ، حيث اكدت بعض الدراسات أن لكل من الأنماط الجزيئية المرتبطة بمسببات الأمراض (PAMPs) للسالمونيلا ولعديد السكريد الشحمي (LPS) وللسوط أنشطة مضادة للأورام ، والتي يؤدي استبعادها إلى فقدان الفعالية العلاجية (Felgner *et al.*, 2020) ، فتساهم العدوى الجهازية بالسالمونيلا على حث إفراز السايتوكينات المحرضة للإلتهاب وعلى ارتشاح الخلايا المناعية في المضيف استجابة للتحفيز المناعي بـLPS السالمونيلا ومكوناتها الأخرى (Lee ,2012) وعلى إفراز أوكسيد النتريك والإيكوسانويدات Eicosanoids (Abbas *et al.*,2012) ، كذلك تتأثر وتزداد استجابة الورم النوعية لخلايا $CD8^+$التائية و لـ TNF-α بوجود LPS السالمونيلا ، في حين أن فلاجيلين Flagellin السالمونيلا يمكن أن يقلل من كمية الخلايا التائية التنظيمية (Treg) في بيئة الورم الدقيقة ، وهو يؤثر كذلك على دور TLR4 وTLR5 المهم في هذه العملية (Wang *et al.*, 2021) .

واعتماداً على الخصائص الفريدة للبكتيريا الموهنة بألفتها لبيئة الورم ، تم استغلال هذه الميزة في تطبيقات اللقاحات البكتيرية المضادة للورم لحمل وتوصيل مستضدات غير متجانسة Heterogeneous تثير مناعة المضيف ، إذ يتم تضعيف البكتيريا عن طريق إدخال التحوير على الـ LPS أو على الأسواط أو على البروتينات الهيكلية (Pandey *et al.*, 2022) ، بما في ذلك أنواع السالمونيلا التي تمتاز بسهولة توهينها النسبية والتلاعب الجيني مقارنة بالأنواع البكتيرية الأخرى ، بهدف إضعاف حدة ضراوتها Virulence

لإستبعاد أي تهديد رئيسي يمكن أن يحقق العدوى الجهازية أو أية اضرار جانبية (Jawalagatti *et al.*, 2022b) .

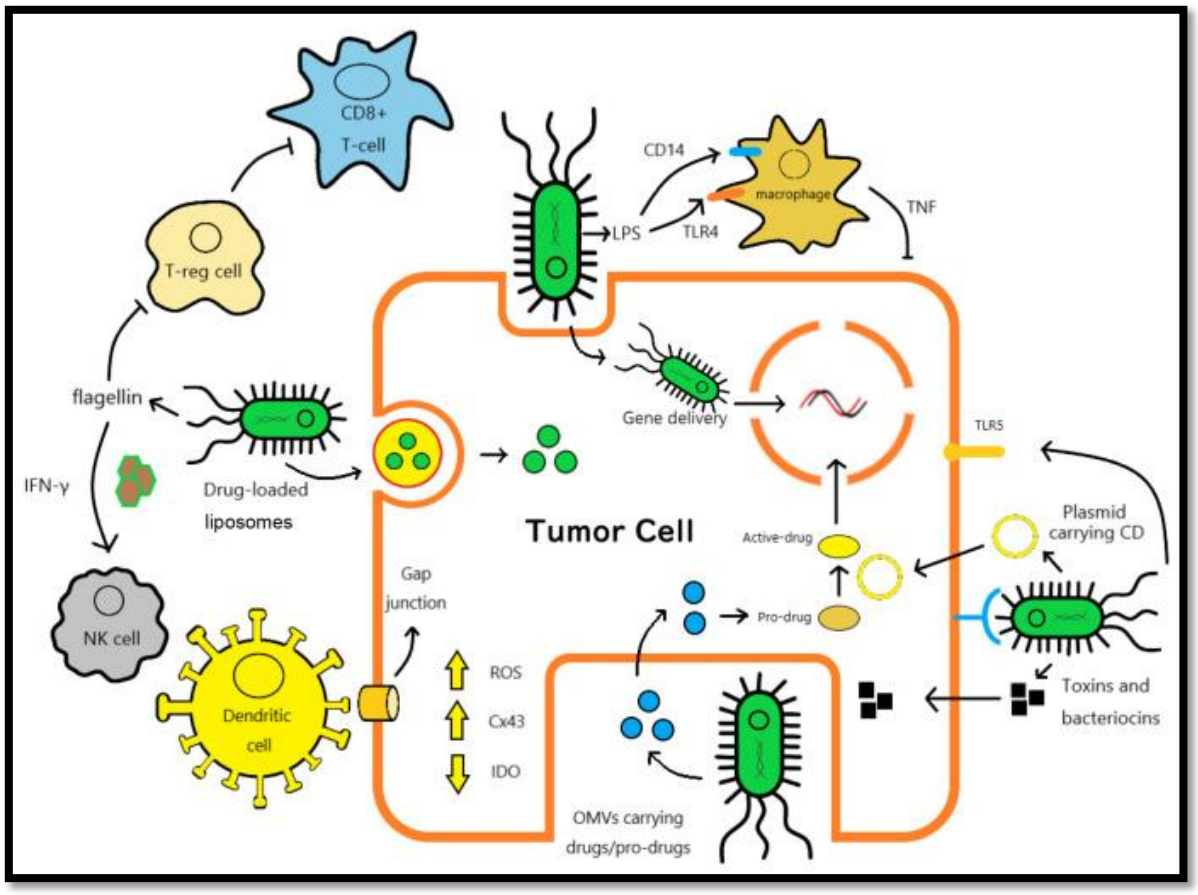
وتمتاز السالمونيلا كذلك بتعدد مضائفها لتشمل الإنسان وحيوانات الحقل ، ويمكن اعطاءها فموياً فتحفز استجابة مناعية موضعية وجهازية وتستخدم كناقل يدعم توصيل العقار مع العلاجات التقليدية وفي العلاج اللقاحي للسرطان (Aganja *et al.*, 2022) .

أثبت علاج السرطان باستخدام *S. Typhimurium* فعاليته في مجموعة متنوعة من دراسات الأورام المستحثة بالفئران المختبرية ، بما في ذلك سرطان الجلد Melanoma (Wang *et al.*, 2020) والسرطان العظمي Osteosarcoma (Igarashi *et al.*, 2018) وسرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة Non-small cell lung carcinoma (Zhao *et al.*, 2016) ، وسرطان القولون والمستقيم Colorectal cancer (Murakami *et al.*, 2015) ، وسرطان عنق الرحم Cervical carcinoma (Hiroshima *et al.*, 2015) ، وسرطان البروستاتProstate cancer (Choe *et al.*, 2014)، وسرطان الغدد الليمفاوية للخلايا التائية T-cell lymphoma (Vendrell *et al.*, 2013)، وسرطان الخلايا الجذعية Follicular dendritic cell sarcoma (Kiyuna *et al.*, 2016) .

2.2.6.2 التأثيرات المناعية المُعدلة لـ *S. Typhimurium* في علاج السرطان

Immunomodulatory effects of *S. Typhimurium* in Cancer Treatment

يمكن أن تستحث عدوى السالمونيلا سلسلة من الاستجابات المناعية المضادة للسرطان إذ تعتمد على الية التلاعب باستجابة المضيف المناعية لتثبيط الورم ، كما هو موضح بالشكل (2-7) ، و بما أن السالمونيلا تميل إلى استعمار أنسجة الورم ، فستحول البيئة الدقيقة للورم TME من حالة الكبت المناعي الى بيئة محفزة مناعياً تظهر بوساطة زيادة ارتشاح الخلايا المناعية المضادة للورم والتنظيم العالي المعبر للسايتوكينات المحرضة للإلتهاب وحث التغيرات المظهرية والوظيفية للخلايا المناعية (Aganja *et al.*, 2022 ، فذكر Neophytou وآخرون ،(2021) ان الـ TME تحتوي على خلايا مناعية وخلايا ليفية مرتبطة بالسرطان وعلى عناصر هيكلية مثل الكولاجين وحمض الهيالورونيك التي تشكل الارضية Matrix الخارج خلوية ، فهي تحيط مباشرة بأنسجة الورم مما يعزز من نمو وبقاء الورم ومن الهروب المناعي ومن انتشاره بتكوين النقائل . كما اشار Badie وآخرون، (2021) أن التغييرات الحاصلة في TME يمكن أن تؤثر على تكاثر الأورام وقدرتها النقيلية مما يحد من تطور المرض أو يعززه . حيث اظهرت دراسات عديدة أن البيئة الدقيقة للورم TME المثبطة مناعياً يمكن أن تحد من فعالية العلاجات التقليدية للسرطان ، كذلك يرتبط سوء تشخيص مرضى السرطان بنفس السبب (Jorge *et al.*, 2020 ; Labani-Motlagh *et al.*, 2020) .



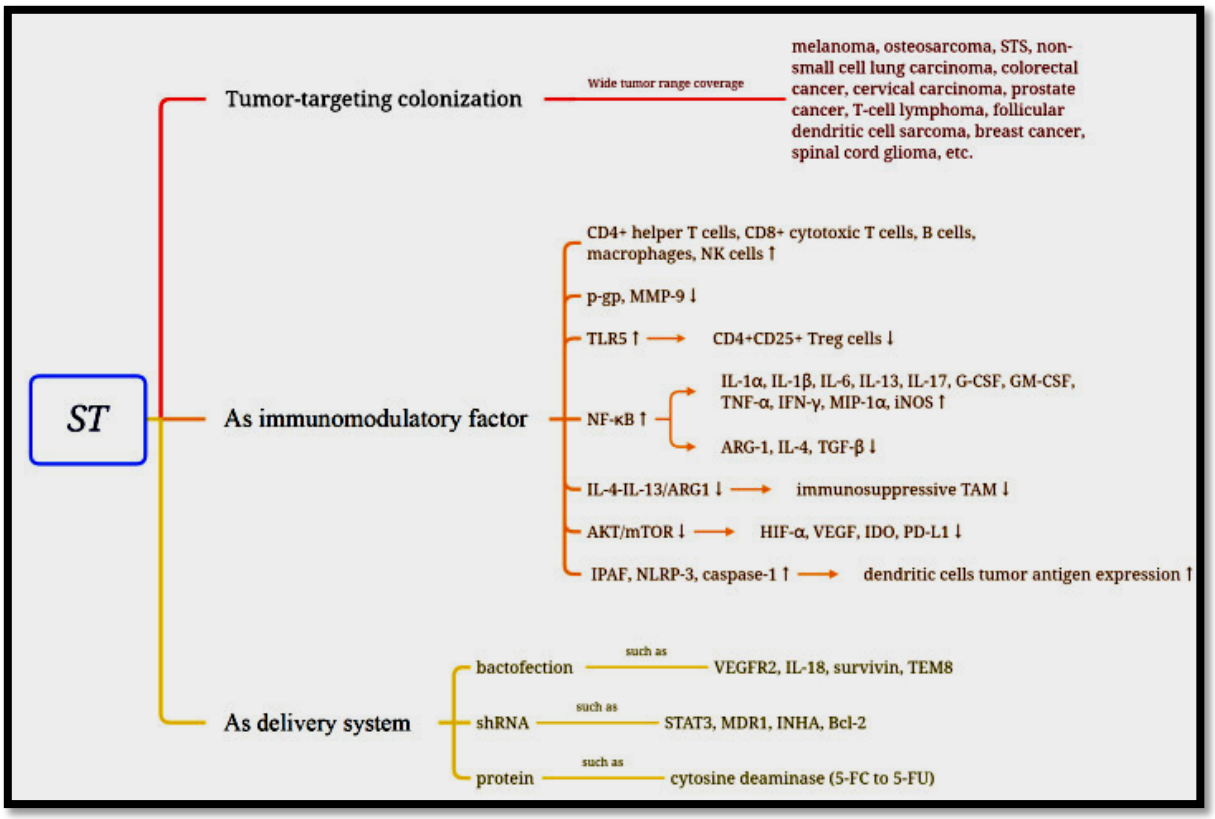
شكل (2-7) المزايا الرئيسية لعلاج السرطان باستخدام *S. Typhimurium* (Yang *et al.*, 2023)

يرتبط تأثير السالمونيلا على إحداث التحوير بالجهاز المناعي للمضيف ومن ثم تعدل من بيئة الورم المثبطة مناعياً إلى حالة التحفيز عن طريق رفع معدل انتاج الخلايا المناعية الفطرية والتكيفية المتعددة كالخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ والخلايا البلعمية (Kaimala *et al.*, 2018)، والخلايا التائية السامة للخلايا $CD8^+$ والخلايا القاتلة الطبيعية (Grille *et al.*, 2014) والخلايا البائية (Lee *et al.*, 2011) مما يعزز من الاستجابة المناعية المضادة للسرطان ، وفي ذات الوقت ، وبوساطة إشارات TLR5، يمكن لبروتين فلاجيلين السالمونيلا أن يقلل من عدد كل من خلايا CD25 و Treg داخل بيئة الورم ومن ثم يساهم بتفعيل الاضطراب في البيئة الخاملة مناعيًا(Zheng *et al.*, 2017) . كما ظهر إن تنشيط مسار NF-κB يؤدي الى تنظيم تعبير كل من السيتوكينات المحرضة للالتهاب والجاذبات الكيميائية Chemokines مثل : IL-1α و IL-1β و IL-6 و IL-13 و IL-17 و G-CSF و GM-CSF و TNF-α و IFN-γ و MIP-1α و iNOS (Chen *et al.*, 2017 ; Kaimala *et al.*, 2014) ، فضلاً عن ذلك ، ينخفض مستوى تنظيم التعبير لعوامل الكبح المناعي كعوامل ARG-1 و IL-4 و TGF-β (Hernandez-Luna &Luria,2018) . كما لوحظ حصول تنشيط لمسارات الحويصلات الالتهابية المصحوبة بزيادة مستويات

IPAF وNLRP-3 وcaspase-1 ويرافقه تعزيز التعبير لمستضدات الورم بواسطة الخلايا التغصنية (Saccheri *et al*., 2010) ، يضاف الى ذلك ، يحصل انخفاض في تعبير ونشاط مسار IDO المرتبط بإشارات p70S6K/ mTOR /AKT المثبطة (Kuan & Lee ,2016) يؤدي تثبيط هذا المسار أيضًا إلى انخفاض تنظيم التعبير عن رابطة الموت الخلوي المبرمج -1 (PDL-1) والذي هو مستقبل عبر غشائي لبروتين الموت المبرمج PD-1 ، إذ أن التعبير العالي لـ PDL-1 على سطح الورم يمنع من تنشيط الخلايا التائية المؤثرة Effector ، وإنتاج السيتوكينات ، والتكاثر المعتمد على TCR، والذي يمكن عكسه أو ابطاله باستخدام السالمونيلا (Chen *et al*., 2020) .

3.2.6.2 الآليات التي تتبعها *S. Typhimurium* لعلاج السرطان Mechanisms followed by *S. Typhimurium* for cancer therapy

تستطيع الـ *S. Typhimurium* من رفع مستوى إنتاج العديد من خلايا الجهاز المناعي الفطرية والمكتسبة مثل الخلايا $CD8^+$ T وخلايا NK والبلاعم ، بينما يمكنها أن تقلل من خلايا Treg في TME، كذلك يؤدي تنشيط وتنظيم تعبير Cx43 بواسطة السالمونيلا إلى تحسين توصيل المستضد مع الخلايا التغصنية ويسهل توصيل أدوية العلاج الكيميائي وإشارات موت الخلايا المبرمج داخل الخلايا السرطانية ، و باستخدام السلالات المعدلة جينياً ، فان كل من الجسيمات الشحمية Liposomes المحملة بالأدوية والجينات/الادوية المضادة للسرطان يمكن توصيلها مباشرة إلى أنسجة الورم بواسطة السالمونيلا ، كذلك يمكن للبلازميد الذي يحمل انزيم cytosine deaminase أن يحول العقار (5-FC) 5-fluorocytosine غير السام إلى (5-FU) 5-fluorouracil ، إذ يقلل هذا المسلك من سمية أدوية العلاج الكيميائي داخل منطقة الورم ، (Stegantseva *et al*., 2020; Yoon *et al*., 2021; Mesa-Pereira *et al*., 2015). و كما هو موضح في الشكل (2-8) .



شكل (2-8) أمثلة على الآليات المختلفة التي تتبعها *S. Typhimurium* لعلاج السرطان (Yang *et al.*, 2023)

7.2 لقاحات الشبح البكتيرية Bacterial Ghost (BG) vaccines

تعود أولى علامات تفريغ الخلايا من محتواها إلى المصريين القدماء عندما لجئوا إلى اخراج أعضاء جثث موتاهم (المومياء) من ثم تم اخلاء كامل الجسم من محتواه المائي وبإتباع تسلسل معين في مراحل التحنيط ، كذلك الجراثيم فهي تموت في بيئة يمكنها بطريقة أو بأخرى إخلائها من محتواها السيتوبلازمي و يتم إنتاج الأشباح يومياً في أجسادنا (في الداخل أو الخارج) في الرئة ، في المعدة ، على سطح الجلد ، فهي تؤدي أدواراً معينة في عملية التحصين المناعي (Amara *et al.*, 2023) .

يمكن تعريف الأشباح Ghosts على أنها قشور(اغلفة) مجوفة لمجموعة نواقل بيولوجية متنوعة ، مثل خلايا الدم الحمراء والخلايا السرطانية والبكتيرية ، والتي يمكن الحصول عليها بوساطة تقنيات الهندسة الوراثية أو بالتجزئة ، وهذه النواقل تفتقد لخصائصها الحيوية الأصلية لكنها بذات الوقت تبقى محتفظة بالخصائص البيولوجية المقابلة لها (García-Álvarez & Vallet-Regí ,2022) .

وذكر Chen وآخرون ، (2021) أن الأشباح البكتيرية (BGs) هي أظرف خلوية فارغة ذات مسام ، فاقدة لوظيفتها التكاثرية ، مشتقة من البكتيريا السالبة لصبغة كرام ، تم هندستها وراثياً أو عولجت بالطرق

الكيميائية لحثها على إطلاق محتوياتها الخلوية ، وبالتالي ، تفقد حمضها النووي و الريبوسومات و مكوناتها الأخرى ، وهكذا ، تظل محتفظة بالسلامة الهيكلية لمستضداتها السطحية .

المفهوم العام للقاحات Vaccins بأنها مواد حيوية مناعية Immunobiological substances مصممة لمنح وتوفير حماية خاصة محددة ضد المرض قبل التعرض له ، إذ تحفز الجهاز المناعي (إما الخلطي Humoral أو الخلوي Cellular أو كليهما) لتوليد حماية مناعية محددة نشطة ضد العامل الممرض المعدي (Bhatia & Ichhpujani , 2008) . ومن الاستراتيجيات الحديثة المتبعة مع اللقاح هو استخدام لقاحات الأشباح البكتيرية التي تحتفظ بمزايا اللقاحات المعطلة واللقاحات الحية المضعفة ، وتبتعد عن الكثير من عيوب اللقاحات الاخرى كضعف التحفيز المناعي ، إفتقارها للأمن والسلامة ، ومتطلبات النقل والتخزين غير الملائمة (Batah and Ahmed , 2020) .

إن تحضير اللقاحات المعطلة باستخدام طرق مثل الفورمالديهايد والمعالجة الحرارية يمكن أن يدمر الهياكل السطحية للبكتيريا (Carvalho *et al*., 2021)، وعلى العكس من ذلك ، تحتفظ الأشباح البكتيرية بجميع المستضدات الهيكلية التي تعبر عنها البكتيريا المرضية مما يؤدي إلى استجابات مناعية خلطية وخلوية قوية جداً وفعالة (Sheweita *et al*., 2019) ، إذ يحتوي هيكلها على أنماط جزيئية مرتبطة بالعوامل المسببة للأمراض (PAMPs) مثل الـ (LPS)، والبروتين الدهني (LPP)، والببتيدوغليكان (PGN)، والاهلاب fimbriae ، وهي تراكيب اساسية على جدار الخلية البكتيرية الخارجي ، و بمجرد وصولها إلى المضيف ، يتم التعرف على تلك الاشباح البكتيرية بوساطة مستقبلات تمييز الأنماط (PRR) على الخلايا المناعية ، مما يحفز إنتاج العديد من الوسطاء المناعية الذين يحفزون نضوج الخلايا المقدمة للمستضد Antigen presentic cells(APCs)، مثل الخلايا التغصنية (DCs) (Chen *et al*., 2021) .

وأشار Park , (2023) أن الأشباح البكتيرية تحفز أيضاً الاستجابات المناعية التكيفية بوساطة تنشيط الخلايا البائية والتائية ، إذ إن وجود المستضدات على السطح أو داخل هذه الأشباح يسهل عرض المستضد على الخلايا المناعية ، مما يؤدي إلى توليد أجسام مضادة خاصة بالمستضد بواسطة الخلايا البائية وتنشيط الخلايا التائية ، مما يؤدي هذا في النهاية إلى إنتاج أجسام مضادة محددة ، وخلايا الذاكرة B ، والخلايا الليمفاوية التائية السامة للخلايا ، مما يساهم في المناعة طويلة المدى .

يمتلك الجهاز المناعي القدرة على التمييز الدقيق لبوليمر المستضد البيولوجي (الدهون السكرية و/أو البروتينات) وتقديمه إلى الخلايا التائية عبر بروتينات معقدة التوافق النسيجي الرئيسية ، ولطالما اعتبرت هذه الاستجابات المناعية (التكيفية) أساس البروتينات المستضدية ، في حين تعد السكريات مستضدات غير معتمدة على الخلايا التائية ولا يتم التعرف عليها من خلال آلية التكيف التي تتطلب عمل المناعة الخلطية ، وفي العادة ، لا يتعرف الجهاز المناعي على الكربوهيدرات ، لذلك طورت البكتيريا فوعتها بتكوين كبسولة متعددة السكريات (Zhu *et al*.,2014) ، ويمثل الـ LPS المكون الرئيسي في الأشباح البكتيرية ، يتصف بسميته ويصنف من ضمن السموم الداخلية والذي يثير استجابة مناعية قوية عند تقديمه إلى المضيف

(Cobb *et al.*,2004). ووضح Ganeshpurkar وآخرون، (2014) بأن كل ما يحتويه الشبح البكتيري من مركبات كالـ LPS و بما فيها من البروتين-A والمستضدات الجسمية O وطبقة الببتيدوغليكان ، والتي تعد جزءاً من معقد غلاف الشبح البكتيري ، جميعها تعمل كمعدلات مناعية Immunogenicity modulators تحفز المناعة الخلطية والخلوية .

1.7.2 طرائق تحضير الاشباح البكتيرية Methods for Bacterial Ghosts (BGs) Preparation

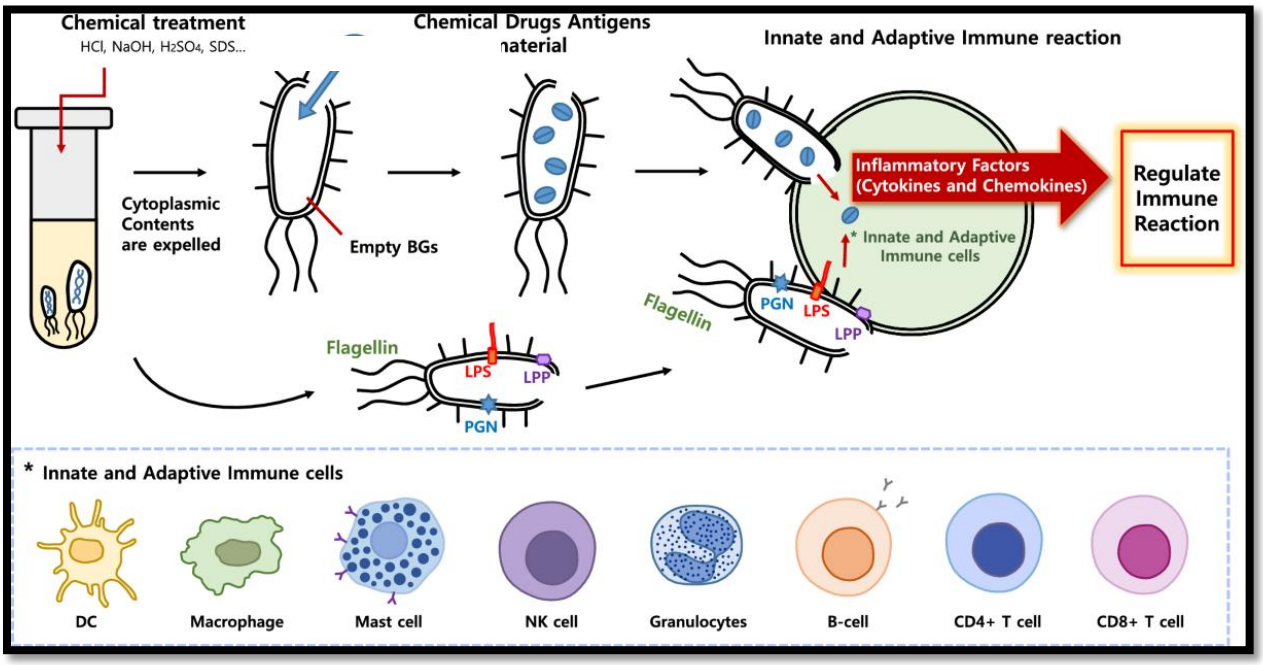
1- طريقة الهندسة الوراثية Genetic Engineering(E-lysis gene method)

يمكن إنتاج الشبح البكتيري بوساطة التحكم بمبدأ تعبير الجين E (الكلونة Clonning) من العاثيات البكتيرية لإنتاج بروتين تحلل E داخل البكتيريا السالبة لصبغة جرام وعلى وجه الخصوص بكتريا الاشيريشيا القولونية ، مما يؤدي إلى تشكل تركيب نفق التحلل ومن ثم الثقوب داخل غلاف البكتيريا الحية مسبب تفجر الخلايا البكتيرية وخروج ذرية العاثيات الجديدة (Witte *et al.*,1990) . يمارس بروتين التحلل E وظيفته الحالّة عن طريق دمج أغشية الخلايا الداخلية والخارجية (Inner membrane (IM و(Outer membrane (OM مما يشكل التركيب الخاص بالنفق عبر غشاء الخلية ويبلغ قطر أنفاق الغشاء الناتجة حوالي 40-200 نانومتر وتسمح بطرد السيتوبلازم مع الحفاظ على سلامة وشكل الغلاف الخلوي (Lubitz *et al.* 2009)، وتتيح هذه العملية إنتاج BGs ولكن هناك حاجة لتحليل بقايا الحمض النووي والبلازميد التي لا تزال موجودة اي لا تزال ملوثة للخلايا البكتيرية المفتوحة ، إذ يؤدي استخدام طريقة جين التحلل E لتحضير BGs إلى تحلل/قتل البكتيريا بشكل فعال ولكن غير كامل مما يتطلب استخدام مركبات أو عناصر بخطوات اضافية لضمان القتل الكامل للخلايا البكتيرية الحية المتبقية (Sheweita *et al.* , 2021). إن استخدام مثل هذه الجينات قد يكون له بعض عوامل الخطر في التطبيقات المتعلقة بالبشر (Amara *et al.*, 2013a) .

2- الطريقة الكيميائية الحرجة Critical chemical method

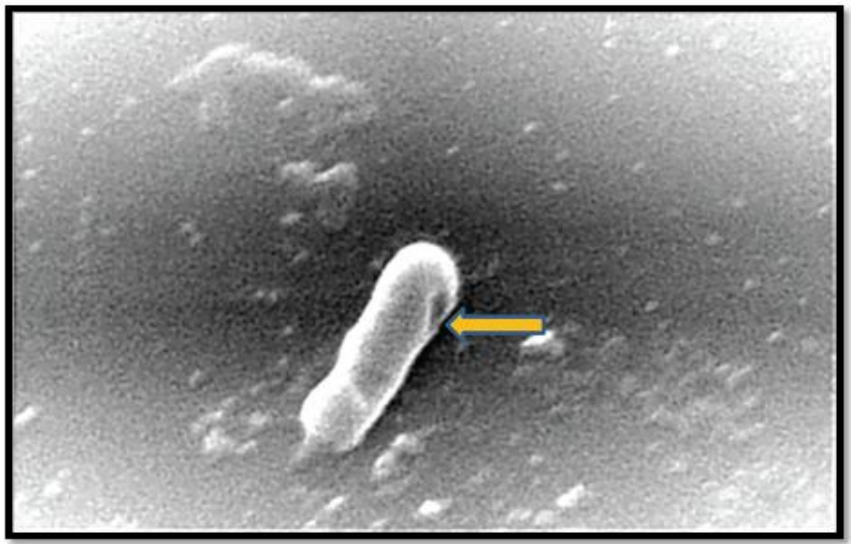
حظيت هذه الطريقة الجديدة لتحضير BGs باهتمام متزايد في السنوات الأخيرة لتطبيقاتها الطبية والصيدلانية الواعدة ، إذ يعتمد البروتوكول على استخدام بعض المركبات الكيميائية في تركيزها الأدنى المثبط للنمو(Minimum inhibitory concentration (MIC والتركيز الادنى للنمو Minimum growth concentration (MGC) ويشمل المواد كبريتات دوديسيل الصوديوم Sodium dodecyl sulphate (SDS) وهيدروكسيد الصوديوم (NaOH) وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وبيكاربونات الكالسيوم (CaCO) التي تستخدم ضمن وقت محدد بالاشتراك مع بعض العوامل الفيزيائية كالرج وبتدرج حراري معين ، ويُستخدام التصميم التجريبي لـ Plackett-Burman لرسم بروتوكول للظروف المثلى

لإنتاج الشبح البكتيري ، استعملت المجاهر الضوئية والإلكترونية لتقييم جودة وكفاءة الاشباح Bacterial ghost quality (BGQ)، فضلاً عن استخدام مقياس الطيف الضوئي لتقييم كمية البروتين والحمض النووي المتحرر، كنتيجة نهائية ، يتم الحصول على خلايا بكتيرية حاوية على ثقوب بعد ان تم طرد محتوياتها الداخلية ، وهذه الثقوب لم تؤثر على سلامة القشرة الخلوية ولم تشوهها (Amara *et al.*, 2013a ; Rabea *et al.*, 2014) . تمتاز مادتي الـ (SDS) والـ (NaOH) المستخدمة بقدرتها على التداخل في تركيب جدار الخلية البكتيرية ، بينما مادة الـ (H_2O_2) المعروفة كعامل مؤكسد بقدرتها على تحطيم الحمض النووي ، في حين تعمل مادة الـ CaCO3 على الزيادة من صلابة جدار الخلية مما يسمح بدخول المركبات المستخدمة إلى الخلية ، وقد أُطلق على الطريقة اسم البروتوكول المختزل الشبيه بالإسفنج Sponge Like Reduced Protocol (SLRP) (Amara *et al.*, 2013b) . وكما هو موضح بالشكل (2-9) الذي يمثل خطوات لتحضير BGs باستخدام المعالجة الكيميائية الحرجة . وفي دراسة علمية للباحث Amara وآخرون، (2022) وضح أنه بالإمكان استخدام هذه الطريقة ليس فقط لتحضير أشباح البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، ولكن تستخدم أيضاً مع الخمائر والخلايا الفطرية . وأشار Amara وآخرون ، (2023) في دراسة أخرى إنه يمكن إخلاء كل من الخلايا بدائية وحقيقية النواة والعتائق وكذلك الفيروسات بهذه الطريقة، إذ يتم إبطال مفعولها باستخدام التركيز الحيوي - الحرج لمادة H_2O_2 مؤدياً إلى تحلل مادة الفيروس الوراثية مما يجعله غير قادر على إصابة الخلايا أو التكاثر داخلها كما أنه يحافظ على اغلفة الخلايا أو الفيروس الناتجة بتركيبته ثلاثية الأبعاد وبأشكالها الصحيحة .



شكل (2-9) رسم تخطيطي لتحضير BGs باستخدام المعالجة الكيميائية وتأثير BGs على التفاعل المناعي (Park ,2023)

يتم إخراج محتويات السيتوبلازم بوساطة نشوء نفق عبر الغشاء الموجود في جدار الخلية المستخدمة ، أو تغيير نفاذية الغشاء البكتيري ، دون الإخلال بسلامة الغشاء ، إذ تتشارك أغلفة الأشباح البكتيرية (BGs) الفارغة الناتجة بنفس المحددات الوظيفية والمستضدية مع نظيراتها الحية ، مما يعني أن المحددات المستضدية Antigenic epitopes الموجودة في الخلية الحية محفوظة في الشبح الناتج (Walcher *et al.*,2008; Moon *et al.*,2020) ، يمثل الشكل (2-10) صورة بالمجهر الالكتروني للأشباح البكتيرية موضح للثقوب المتكونة على السطح .



شكل (2-10) صورة بالمجهر الالكتروني للثقب الموجود في الغشاء الخلوي لخلايا السالمونيلا ، الأسهم تشير إلى الثقوب السطحية (Amara *et al.*,2014)

2.7.2 مزايا الاشباح البكتيرية Advantages of bacterial ghost

الميزة الرئيسية للأشباح البكتيرية هي طابعها غير الحي ، وفي ذات الوقت تبقى محتفظة بجميع المكونات الشكلية والهيكلية والمستضدية السطحية المماثلة لنظيراتها الحية ، فتعد منصة واعدة للتكنولوجيا الحيوية إذ بإمكانها أن تساعد في تطوير اللقاحات الآمنة ، وكنواقل بيولوجية ، والتوصيل الفعال للأدوية (Bahy *et al.* , 2023) .

يمكن الحصول على الأشباح البكتيرية بإتباع طرائق معينة لها مميزات مفيدة نظراً لكونها سريعة وذات تكلفة منخفضة وبسيطة ولا تحتوي على أي مخاطر كامنة (Vinod *et al.* , 2017) . تتمتع أيضاً بتأثيراتها التحفيزية المناعية العالية بسبب هياكل غشاءها الخارجي الأصلية ، وتحتفظ جيداً بجميع صفاتها الغشائية ، وبإمكانية تمييزها من قبل البلاعم الكبيرة والخلايا التغصنية (Vinod *et al.*,2015). نظرًا لذلك ، يمكن للتقنيات المناعية مثل اختبار الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) والتألق المناعي أن تؤكد وجود مستضدات سطحية معينة وإمكانية الوصول إليها ، مما يوفر أدلة على قدرتها المناعية وقدراتها في عرض المستضد (Park ,2023).

السمة المهمة للشبح البكتيري يتعلق بسلامة استخدامه ، فعادة ما يرتبط استخدام النواقل الحية بمخاوف تتعلق بالسلامة ، خاصة عند إطلاقها في ظروف غير مسيطر عليها أو عند استخدامها من قبل الأفراد الذين يعانون من ضعف المناعة ، فتتميز هذه الأشباح عن النواقل الحية بطبيعتها غير الحية ، وقد أثبتت الدراسات أنها آمنة حتى عند تناولها بجرعات عالية ، وأنها خالية من أي تأثير سام للخلايا أو محور للجينات على أنواع مختلفة من الخلايا (Koller *et al.*,2013)، إذ ينعدم في الاشباح البكتيرية أي وجود للعوامل الخاصة بالامراضية أو لأشرطة المقاومة للمضادات الحيوية التي تملك سمة الانتقال الأفقي من بكتيريا لأخرى بوساطة آلية نقل الجينات ، اضف إلى ذلك ، ثباتية تجهيزات اللقاح المجفدة بالتجميد لفترة طويلة (سنوات) عند درجة حرارة مناسبة (Salem-Bekhit *et al.*, 2021) .

3.7.2 تطبيقات الاشباح البكتيرية Applications of bacterial ghost

إن الجهود التي بذلها الباحثون فيما يتعلق بالأشباح البكتيرية والميكروبية لم تنجح فقط في إنتاج الخلايا المفرغة التي لها قابلية التمنيع ، بل فتحت الباب أمام العديد من التطبيقات الأخرى مثل التصنيف الميكروبي (على أساس استجابات جدار الخلية المختلفة للمواد الكيميائية المستخدمة) ، السيطرة على الكائنات الممرضة للنبات ، والتحليل التركيبي (Amara *et al.*, 2023) .

وفي الآونة الأخيرة ، كشفت دراسات عديدة بإمكانية اختبار قابلية استخدام الأشباح البكتيرية كنظام متقدم لحمل المستضدات الأجنبية في أجزاءها المختلفة كالغشاء الخارجي والحيز المحيط بالبلازم ، وللتوصيل الدوائي BG DDS للعديد من المواد كالأحماض النووية و الببتيدات (Salem-Bekhit *et al.*, 2021) ، فضلا عن إمتلاكها لمساحة متنوعة من التطبيقات بما في ذلك علاج الأورام ، فيمكن استخدام اشباح السالمونيلا بالتآزر مع العقار الكيماوي الجهازي لعلاج سرطان القولون النقيلي سواء كعناصر مساعدة أم مشتركة (Groza *et al.*, 2018) ، ولتوصيل العوامل السامة للخلايا نتيجة لاستهدافها الخاص والمحدد للخلايا السرطانية إذ توفر هذه الأشباح خصوصية علاجية متقدمة وتقلل من كميات الأدوية المستخدمة للعلاج (Edinger *et al.*, 2019) ، و كمرشح فعال للقاحات المعطلة لغرض الوقاية من مختلف أنواع عدوى البكتريا السالبة لصبغة كرام (Moon *et al.*, 2017) .

نتيجة لذلك ، يتم استخدام BGs على نطاق واسع كلقاح متعدد التكافؤ (Won *et al.*,2020) ، وفي تعزيز كل من الاستجابة المناعية الجهازية ، وللجهاز المناعي المخاطي الموجود في الجهاز الهضمي ، وللجهاز التناسلي والتنفسي (Xie *et al.*,2021) .

8.2 المعايير المناعية Immunological parameters

تؤدي المناعة دوراً رئيسياً في تراجع الورم وهي ضرورية للإستجابة العلاجية للسرطان ، وأشارت العديد من الدراسات العلمية الحديثة إلى التأثير الفعال لبكتيريا السالمونيلا على مناعة البيئة الدقيقة للورم

(Horiuchi *et al*., 2024 ; Lu *et al*., 2024) ، حيث أُجريت العديد من التجارب العلمية السريرية على لقاح أشباح البكتيريا لاختبار تأثيراته في الاستمناع Immunogenicity كأحد منبهات التحفيز المناعي الفطري ، وقدرته على تنشيط مجموعة واسعة من أنواع الخلايا المشاركة في المناعة الفطرية والتكيفية ، فضلاً عن تأثيراته المعدلة للمناعة المضادة للسرطان immunomodulatory anti-cancer effects (Hajam *et al*., 2017). ولذلك تمت دراسة تأثير لقاح بكتيريا السالمونيلا على تقييم مستوى التعبير عن بعض المعايير المناعية في المصل وعلاقتها بسرطان القولون والتي تتمثل بالمعايير التالية :

1.8.2 بروتين مستقبل الموت المبرمج -1 Programmed death ligand -1(PDL-1)

PD-L1 المعروف ايضا باسم مجموعة التمايز CD274 ، أحد أعضاء عائلة مجموعة التمايز CD28، يمثل المعلم الحيوي الاول والأكثر دراسة للتنبؤ باستجابة الورم لمثبطات نقاط السيطرة المناعية Immune checkpoint inhibitors (ICI) (Wei *et al*., 2018). إذ يتم التعبير عنه بشكل اساسي على الخلايا السرطانية والخلايا المتسللة للورم بما في ذلك الخلايا التغصنية ، والخلايا الليمفاوية التائية والبائية المنشطة ، والبلاعم وخلايا البطانة الوعائية لمجموعة متنوعة من الأمراض السرطانية مما يوفر اهداف قيمة لتطوير علاجات الأورام المناعية الموجهة (Ntomi *et al*., 2021) ، وله دور في حماية الأنسجة من الالتهابات المفرطة وتفاعلات المناعة الذاتية Autoimmunity ، ومع ذلك ، فإن القدرة على إنتاج PDL-1 يمكن ان تستغلها بعض الأورام مما يسمح لها من تجنب المراقبة المناعية Immune surveillance ،إذ يعد تعبيره المفرط في الخلايا السرطانية كعلامة تنبؤية سيئة لمرضى السرطان (Michael & John, 2019) .

يتطور السرطان بأشكال واستراتيجيات مختلفة ، من ضمنها الهروب من المراقبة المناعية عن طريق تنظيم بروتين PD-1 ، وهو أحد نقاط الفحص المناعية الأساسية ، والذي يتم التعبير عنه بشكل أساسي على سطح الخلايا المناعية ، يتفاعل المستقبل PDL-1 المعبر عنه في الخلايا السرطانية مع بروتين PD-1 الخاص به على سطح الخلايا التائية مما يؤدي إلى منع تنشيط الخلايا التائية (Boussiotis ,2016) ، ومن ثم يصعب تمييز الخلايا السرطانية بسبب تعبيرها العالي لهذا الارتباط ، ولذلك عند تثبيط محور الارتباط هذا تتحفز الاستجابة المناعية ضد السرطان ، فمن المتوقع أن يؤدي منع تفاعل PD-1 /PDL-1 بمساعدة الأجسام المضادة وحيدة النسيلة إلى إعادة تنشيط الخلايا التائية ، مما يمكّن الخلايا المناعية من ممارسة نشاطها المضاد للسرطان (Chen *et al*., 2018) ، لقد ثبت أن العديد من الأجسام المضادة التي يطلق عليها اسم ICIs تمنع هذا التفاعل وتمنع نمو الورم ، إذ اثبتت ابحاث علمية عديدة أن تثبيط هذا المحور سيفضي إلى فعالية واعدة في المجال العلاجي للأورام السرطانية (Al-Saafeen *et al*., 2022) ، فوضح Tian وآخرون،(2024) في دراسته على سرطان القولون ، إن تأثير العلاج المركب المضاد للورم المكون من *S. Typhimurium* المضعفة و بالتعاون مع الجسم المضاد للـ PD-1 لا يعتمد على تحريض الموت المبرمج للخلايا السرطانية فقط ، ولكنه يعمل كذلك على تحسين مناعة أنسجة الورم وعلى تجنيد الخلايا

المناعية مثل الخلايا التغصنية و التائية $CD8^+$ السامة للخلايا والبلاعم M1 (عن طريق استقطاب الخلايا البلعمية M2 إلى M1) في موقع الورم ، فضلا عن تسلل الخلايا المناعية إلى الورم عن طريق تغيير مواصفات الكيموكين والسيتوكين الخاصة بها مما يؤدي إلى زيادة التعبير البروتيني للإنترفيرون – كاما (IFN-γ)، وعامل نخر الورمي – الفا (TNF-α) .

2.8.2 عامل النخر الورمي – الفا Tumor necrosis factor – α (TNF- α)

TNF- α هو أحد الوسطاء الكيميائية الرئيسية المحرضة للالتهاب Pro-inflammatory المرتبط بالسرطان ، يعد محط اهتمام كثير من الباحثين إذ يستخدم كعامل تشخيص تنبؤي بمرحلة سرطان القولون ، ولا يمكن الكشف عنه في مصل أو بلازما الأفراد الطبيعيين ولكن يمكن كشفه لدى الأفراد المصابين بالسرطان خاصة في الحالات المتقدمة (Rahardjo *et al*., 2021) . ينظم الاتصال الخلوي داخل البيئة الدقيقة للورم ويرتبط بتطور النمط المظهري للنقائل (Alotaibi *et al*., 2023) . فضلاً عن دوره في التكاثر الخلوي الخبيث وتولد الأوعية Angiogenesis وغزو الأنسجة في سرطان القولون (Banday *et al*, 2016) .

ذكر Zhang & Zhao , (2018) ان لـ TNF- α تأثيرات ثنائية الطور ، إذ يحفز الموت المبرمج للخلايا السرطانية بجرعاته العالية ، بينما يسرع من غزو الورم وانتشاره مع تناول الجرعات المنخفضة على المدى الطويل . وأشارRamesh وآخرون، (2013) في دراسته عن تأثير العلاج الكيميائي لمرضى سرطان القولون ، إلى حصول ارتفاع في مستويات TNF-α لدى مرضى سرطان القولون ، في حين انخفضت مستوياته بعد العلاج الكيميائي . فيما وضح Şenel & Kılıckap , (2010) آلية تأثير TNF-α على تطور السرطان إذ أوعز دوره في ذلك عن طريق احداث تلف الحمض النووي وتثبيط آلية إصلاحه.

إن استخدام الأدوية المضادة للالتهابات لن يوفر تأثيراً علاجياً جيداً إذا تم استخدامه كعلاج وحيد لدى مرضى سرطان القولون ، ولكن سيكون من الأفضل إذا تم إعطاؤه بالتزامن مع العلاج الكيميائي أو العلاج الإشعاعي ، ولذلك ، تستخدم مثبطات TNF على نطاق واسع كعلاجات للسرطان (Al Obeed *et al*., 2014).

3.8.2 المستقبل الشبيه بالتول -4 Toll like receptor -4 (TLR -4)

مستقبل TLR 4 ، المعروف أيضا باسم مجموعة التمايز CD284 ، هو عبارة عن بروتين عبر غشائي بوزن تقريبي 95 كيلودالتون ، ينتمي TLR-4 إلى عائلة المستقبلات الشبيهه بالتول المتمثلة بمستقبلات تمييز النمط (PRR) المعبر عنها من قبل خلايا المناعة الفطرية كأحد دفاعات الجسم المهمة للكشف عن غزو الممرض وتحفيز الاستجابة المناعية للمضيف (Alberts *et al*., 2020) ، وسميت بهذا الاسم لقدرتها على التعرف على مكونات الاحياء المجهرية (البكتيريا والفيروسات والفطريات والطفيليات) والتي تسمى الأنماط

الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (Vaure & Liu ,2014) ، إذ يؤدي التعرف على PAMP بواسطة PRR إلى التنشيط السريع لمسارات الاشارات التي تعدل وضيفة البلاعم لبدأ الالتهاب الحاد بوساطة انتاج السايتوكينات الالتهابية (Swanson *et al*., 2020) .

يستشعر TLR-4 بكفاءة لعدوى البكتيريا السالبة لصبغة كرام من خلال التعرف على المكون LPS الواقع من ضمن مكونات الغشاء البكتيري ، ويؤدي ارتباط الـ LPS بـ TLR4 إلى إطلاق سلسلة إشارات (على سبيل المثال: NF-κB و MAPK) لتبلغ ذروتها في إنتاج السيتوكينات المحرضة للإلتهاب اللازمة لتعبئة الاستجابة الالتهابية وبالتالي تدمير الكائن الممرض (Kim *et al*., 2023) ، ويعزز القدرة على قتل الخلايا السرطانية (Li *et al*., 2017) .

وقد بين Zhang وآخرون ، (2016) بأنه نظراً لإمتلاك الأشباح البكتيرية للـ PAMPs ومن ضمنها الـ LPS الذي له القابلية على تحفيز الاستجابة المناعية بوساطة مستقبلات TLR-4 الموزعة على سطح الخلايا المقدمة للمستضد APCs ، ومن ثم تتحفز هذه الخلايا بلقاح الأشباح عن طريق ارتباط الـ LPSبمستقبل TLR4، فيما اشار Jerala & Oblak , (2011) إن التعبير عن TLR-4 يتم من قبل مجموعة متنوعة من الخلايا المناعية وكذلك الخلايا السرطانية ، إذ يظهر ارتباط TLR-4 بواسطة السموم الداخلية والروابط الداخلية Endogenous ligands فعالية واضحة في علاجات السرطان المختلفة ، مثل الإشعاع أو العلاج الكيميائي ، وأوضح Beilmann-Lehtonen وآخرون ،(2020) في دراسته التي هدفت الى استكشاف القيمة التنبؤية لتعبير TLR-4 الخاص بالورم لدى مرضى سرطان القولون والمستقيم بوساطة تقييم العلاقة بين تعبير TLR-4 والمتغيرات المرضية السريرية وبقاء المريض على قيد الحياة ، إذ يمثل التعبير المناعي المفرط لـ TLR-4 كتشخيص سيئ لدى مرضى سرطان القولون الموضعي .وقد بينت دراسات متعددة أن زيادة نشاط الـ TLR-4 قد يعزز من عملية نمو وانتشار سرطان القولون وذلك بوساطة الافراز الحاد للسايتوكينات الالتهابية التي تتضمن IL8 و IL6 فضلا عن تنشيط مسار Cat-catenin الذي يعزز الأورام المعوية (Semlali *et al*., 2016 ; Santaolalla *et al*., 2013; Cammarota *et al*., 2010) . وأشار Yesudhas وآخرون،(2014) الى الدور الفسيولوجي لـ TLR-4 في تطور وإمراضية سرطان القولون ، وبذلك فأن تطوير أساليب جديدة وواعدة لعلاجات سرطان القولون بمساعدة روابط TLR و مثبطات الاشارة هو من الاستراتيجيات العلاجية المهمة في تعديل وتنظيم الاستجابة المناعية التي تستخدم في العلاج المناعي للسرطان .وبَيّن Li وآخرون ، (2017) في دراسته على تطبيقات منبهات Agonists TLR-4 التنظيمية المناعية كمواد مساعدة Adjuvants في اللقاحات وعلاج السرطان ، إذ تم تسجيل الـ LPS كأول منتج مايكروبي وحدد دوره المناهض للـ TLR-4 في التطبيقات العلاجية .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3.المواد وطرائق العمل Materials and Methodes

3 .1 الاجهزة والأدوات والمواد المستعملة Apparatuses , tools and materials

3 .1 .1 الاجهزة المستعملة

أُستُعملت في هذه الدراسة عدد من الأجهزة وكما هو موضح في الجدول (3-1) .

جدول (3-1) الأجهزة المستعملة تبعاً لاسم الشركة وبلد المنشأ .

ت	الاجهزة Apparatuses	الشركة المصنعة Company	المنشأ Origin
1	ثلاجة Refrigerator	Concord	France
2	مؤصدة Autoclave	D.G.M.	China
3	جهاز النبذ المركزي Centrifuge	Hettich	Germany
4	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer	Tudor	Korea
5	حمام مائي Water bath	Tafesa	Germany
6	جهاز مزج ذو الصفيحة المزدوجة الساخنة Hot plat magnetic stirrer	Labtach	Korea
7	ميزان حساس Sensitive balance	Sartorius	Germany
8	مجهر ضوئي مركب Compound microscope	Optica	Italy
9	جهاز فحص المقايسة المناعية الانزيمية ELISA Multi-well plate reader	Biotech	America
10	حاضنة Incubator	Binder	Germany
11	مازج هزاز Vortex mixer	UM-300	Taiwan
12	مقياس الرقم الهيدروجيني pH-meter	Radiometer	Denmark
13	كابينة معقمة Laminar air flow cabinet	Jeiotich	Korea
14	جهاز مقياس الطيف الضوئي النانوي Nanodrope spectrophotometer	Thermo	Britain
15	كاميرا رقمية Digital camera	Canon	Japan
16	جهاز تقطير Distillater	Labtach	Korea
17	جهاز المشراح Microtome	Histo-Line Lab. Mod.MRS 3500	Italy
18	المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron Microscope(SEM)	Inspects50	Holland
19	جهاز الفايتك2 (Vitek-2 Compact System)	BioMérieux	France
20	جهاز تحليل الدم Complete Blood Count (CBC)	SMART-1	China

2. 1. 3 الأدوات المستعملة

أُستُعملت في الدراسة الحالية عدد من الأدوات كما هو موضح في الجدول (3-2) .

جدول (3-2) الأدوات المستعملة تبعاً لاسم الشركة وبلد المنشأ .

ت	الأدوات Tools	الشركة المصنعة Company	المنشأ Origin
1	ماصة دقيقة ميكانيكية (احجام مختلفة) Automatic Micropipettes	Bio Basic	Canada
2	اطباق بلاستيكية Disposable Petri dishes	Himedia	India
3	انابيب بلاستيكية Plain tube 10ml	AFCO	Jordan
4	عروه ناقله Loop	Loop Shandon	England
5	أداة تجريع Gavages	Oxford	America
6	انابيب خالية من EDTA Gel tube	AFCO-Dispo	Jordan
7	أنابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر EDTA tube	AFCO-Dispo	Jordan
8	زجاجيات مختلفة Pyrex	Volac	England
9	سيت تشريح Anatomy set	S.I.E.	Pakistan
10	شرائح زجاجية Slides	Sail Brand	China
11	أنابيب ابندروف 1.5 microcenterfuge tubes	Eppendorf	Germany
12	محاقن طبية Disposable syringes	Afco-Dipo	Jordan
13	اوراق ترشيح Filter paper	Sartorius	Germany

3. 1. 3 المواد الكيمياوية والبايولوجية Chemical and Biological materials

أُدرجت جميع المواد المستعملة في الدراسة الحالية في الجدول (3-3) .

جدول (3-3) المواد الكيمياوية والبايولوجية المستعملة .

ت	اسم المادة Material	الشركة Company	المنشأ Origin
1	زايلين Xylene	Scharlau	Spain
2	شمع البارافين Paraffin Wax	OWax، Histo-Line Lab	Italy
3	فورمالين Formalin	Pan Reac Appli Chem	Spain

4	كلوروفورم Chloroform	Thomas Baker	India
5	كبريتات دوديسايل الصوديوم Sodium Dodecyl Sulfate	Enzmart Biotech	Thailand
6	هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide	BDH	England
7	بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	Ultra Pure laboratories	Ireland
8	كاربونات الكالسيوم Calcium carbonate	BDH	England
9	كحول اثيلي مطلق Absolute Ethanol	Scharlau	Spain
10	ازوكسيميثان Azoxymethan	Baoji Guokang Bio-Technology Co.,Ltd	China
11	دارئ الفوسفات الملحي Phosphate buffer salin	Biobasic	Canada
12	حامض الكبريتيك Sulphoric acid	Fluka	Germany
13	كلوريد الباريوم Barium chloride	BDH	England
14	كليسيرول Glycerol	BDH	England
15	كلوريد الصوديوم Sodium chloride	BDH	England
16	ماء مزال الأيون Free nuclease water	Bioneer	Korea
17	مساعد فرويند Freund adjuvant	Immuno Cruz Biotechnology	//
18	مادةDPX	Himedia Lab. Pvt. Ltd	India
19	ايثانول 96 % Ethanol	Scharlau	Spain

4. 1. 3 الأوساط الزرعية Culture Media

حُضرت الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في انماء وحفظ وتحضير لقاح *Salmonella Typhimurium* ghosts vaccine حسب تعليمات الشركة المصنعة وكما موضح في الجدول (3-4) .

جدول (3-4) الاوساط الزرعية المستعملة .

ت	الاوساط الزرعية Culture media	الشركة Company	المنشأ Origin
1	وسط المرق المغذي Nutrient Broth	Himedia	India
2	وسط غراء الماكونكي MacConkey Agar		
3	وسط نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth		

4	وسط غراء Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD agar)	Oxoid	England
5	وسط غراء السالمونيلا – شيكلا *Salmonella Shigella* Agar (SS agar)		

5. 1. 3 الصبغات Stains

أُستعملت في الدراسة الحالية عدد من الصبغات كما موضح في الجدول (3-5) .

جدول (3-5) الصبغات المستعملة .

ت	الصبغة Stain	الشركة Company	المنشأ Origin
1	ملون الايوسين Eosin Stain	BDH	England
2	ملون هيماتوكسيلين Hemotoxyline Stain		
3	ملون المثيل الازرق Methylen blue		

6. 1. 3 العدد التشخيصية Kits

أُدرجت جميع العدد التشخيصية المستعملة في الدراسة الحالية في الجدول (3-6) .

جدول (3-6) العدد المستعملة .

ت	العدة التشخيصية Kits	الشركة Company	المنشأ Origin
1	عدة فحص TNF-α الخاصة بفحص الـ ELISA	ELK Biotechnology	China
2	عدة فحص TLR-4 الخاصة بفحص الـ ELISA		
3	عدة فحص PD-L1 الخاصة بفحص الـ ELISA		
4	عدة التلازن (فحص ويدال) Widal Test Polyclonal Agglutination Kit	Mediaclone	India
5	عدة صبغة غرام Gram stain	BDH	England
6	VITEK-2 GN card	BioMérieux	France

7. 1. 3 المحاليل المستعملة في تحضير اللقاح البكتيري Solutions Used for preparation of Bacterial Ghost

حُضرت المحاليل المستعملة في الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (3-7) .

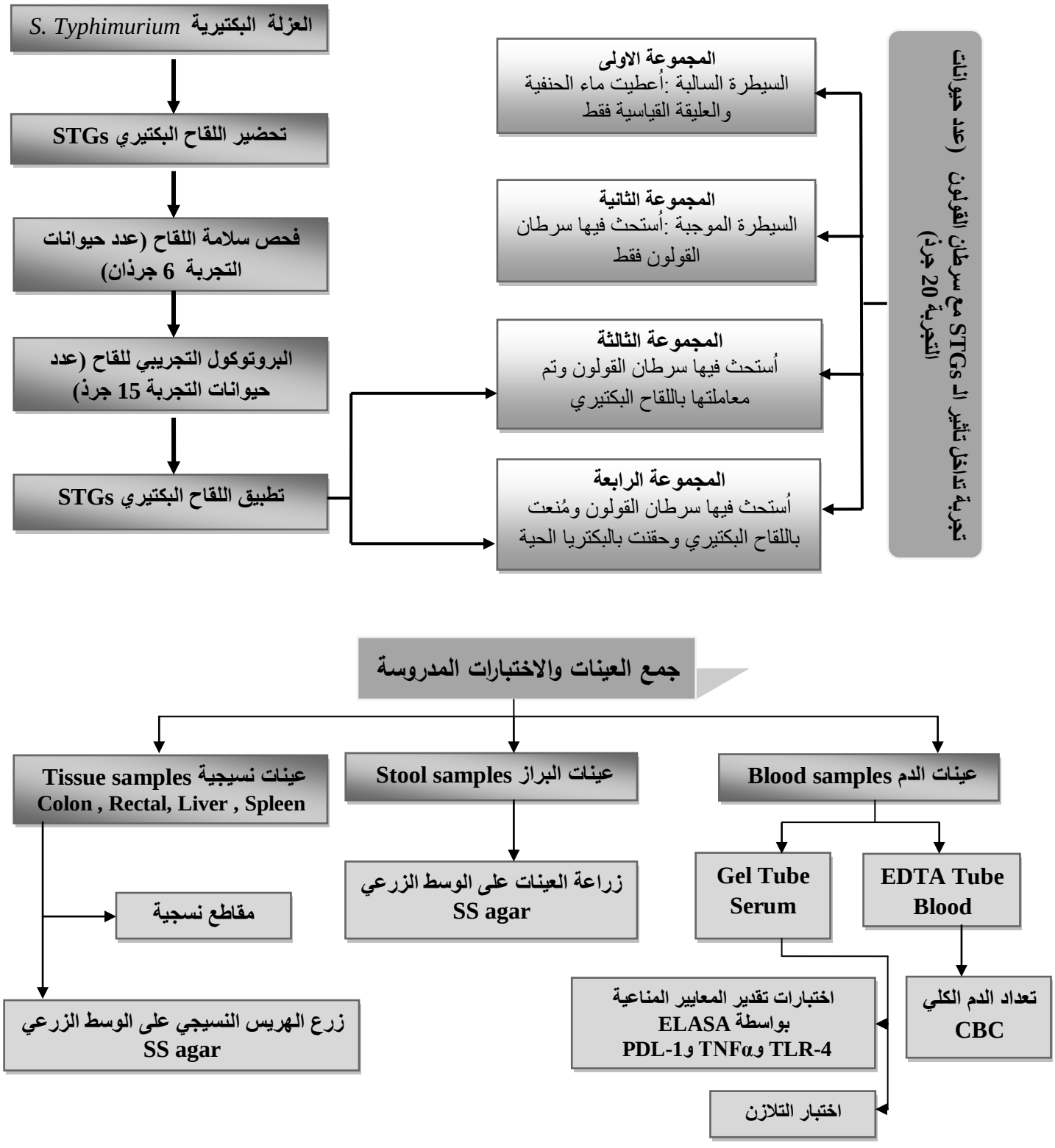
جدول (3-7) المحاليل المستعملة في تحضير اشباح البكتيريا .

ت	المحاليل Solutions	المصدر Reference
1	محلول SDS(10%)	Amara *et al.*, 2014
2	محلول NaOH (10%)	
3	محلول H_2O_2 (30%)	
4	محلول $CaCo_3$	

2. 3 طرائق العمل Methods

أُجريت جميع اختبارات الدراسة الحالية في مختبرات قسم علوم الحياة في كل من كلية التربية للعلوم الصرفة وكلية العلوم / جامعة كربلاء ، وفي البيت الحيواني التابع لكلية الصيدلة / جامعة كربلاء ، وفي المركز التدريبي للشركة العراقية للتقانات الاحيائية في محافظة القادسية للمدة من 2023/2/1 الى 11/1 /2023 .

1. 2. 3 تصميم التجربة Experiment design



شكل (3-1) تصميم التجربة

2. 2. 3 العزلة البكتيرية Bacterial Isolate

تم الحصول على عينة بكتيريا الـ *Salmonella Typhimurium* بصورة جاهزة و منشطة على الوسط الانتقائي لبكتريا السالمونيلا XLD agar من مركز الأمين للأبحاث والتقانات الاحيائية المتقدمة /العتبة العلوية المقدسة ، ثم نقلت العزلة الجرثومية إلى المختبر وحفظت على وسط الغراء المغذي المائل بعد تلقيحه وحضنه بدرجة حرارة (37 ° م) لمدة (18 ساعة) ، ثم حفظت العزلة بدرجة حرارة (4 °م) لحين اجراء الاختبارات اللاحقة، وتم تأكيد التشخيص باستخدام جهاز الفايتك.

3. 2. 3 تحضير الاوساط الزرعية Culture media preparation

1. 3. 2. 3 الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Made Culture media

تم إعداد الأوساط الجاهزة بما في ذلك وسط الغراء / المرق المغذي ، وسط الغراء / نقيع القلب والدماغ ، وسط غراء الماكونكي ، وفقاً لتعليمات الشركات المصنعة وعُقمت بالمؤصدة تحت ضغط (15 باوند / انج^2) ودرجة حرارة (121 °م) ولمدة (15 دقيقة)، كما حُضر الوسط الزرعي آكار السالمونيلا – الشيكلا SS agar ووسط غراء XLD بالتسخين إلى درجة الغليان ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37 °م) لمدة (24 ساعة) للتأكد من سلامة التعقيم (Collee *et al.* 1996).

2. 3. 2. 3 الوسط الزرعي التحضيري – وسط الحفظ والإدامة Maintenance medium

حُضرت اوساط الحفظ والإدامة وفقاً لـ Forbes *et al.*,(2007) ، حفظت العزلة البكتيرية لمدة قصيرة الامد عن طريق نقل مستعمرة واحدة إلى مائل الغراء المغذي ثم حضنت عند درجة حرارة (37 °م) لمدة (24 ساعة)، ثم حفظت بدرجة (4 °م) مع مراعاة تجديد حيوية العزلة ، وتم الحفظ لفترات طويلة باستخدام وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion والمدعم بالكليسرول بتركيز (15%) في درجة حرارة منخفضة في (-20 °م) لمدة ستة اشهر .

4.2.3 تحضير المحاليل Preparation of Solutions

1.4.2.3 محلول ثابت العكرة القياسي McFarland standard Solution No. 0.5

حضر هذا المحلول من كلوريد الباريوم ($BaCl_2 \bullet 2H_2O$) بتركيز (1.175%) بالماء المقطر وحامض الكبريتك المركز(1%) (1 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز ويكمل الحجم الى (99) مليلتر بالماء المقطر) حيث مزج (0.05) مليلتر من محلول كلوريد الباريوم إلى (9.95) مليلتر من محلول حامض الكبريتيك في أنبوبة اختبار اذ يتشكل راسب كبريتات الباريوم والذي يسبب العكوره في المحلول ، ثم حفظ الانبوب في الظلام وتم مزج محتويات الأنبوب قبل الاستعمال لمعايرة عدد الخلايا البكتيرية ،استخدم كمعيار لضبط درجة عكورة العالق البكتيري بحيث يكون عدد البكتيريا في نطاق معين في الاختبارات البكتيرية الخاصة بتحضير اللقاح (Baron & Finegold , 1994) .

2.4.2.3 المحلول الملحي الفسلجي (0.85%) Normal saline

تم تحضير المحلول عن طريق إذابة (0.85)غرام من كلوريد الصوديوم في (90) مليلتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى (100) مليلتر ، وضبط الرقم الهيدروجيني على 7 ، عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة (121°م) لمدة (15 دقيقة) ، ثم تم تخزينه عند درجة حرارة (4 °م) قبل استخدامه (Harley & Prescott, 1996; Chesbrough , 2012) .

3.4.2.3 محاليل التقطيع النسيجي Cutting Solutions

- محلول الفورمالين Formalin : حُضر بمزج (10)مليلتر من الفورمالين التجاري (38%) مع (90)مليلتر ماء حنفية .
- زايلول Xylole .
- ايثانول Ethanole .
- ايوسين Eosin : حُضر بإذابة (1)غرام من الايوسين في (100)مليلتر من الايثانول بتركيز (70%) .
- محلول الهيماتوكسلين Hematoxylin : حُضر على وفق ما جاء في (Culling,1981)، اذ تم بإذابة (1) غرام من الهيماتوكسلين في (10) مليلتر من الايثانول المطلق ومزج مع (200) مليلتر من (10%) شب الالمنيوم ، ثم ذوب فيه (0.5) غرام من اوكسيد الزئبق .

4.4.2.3 محلول صبغة المثيل الازرق 0.2% Methylene Blue : حُضرت الصبغة بإذابة (0.2) غرام من مسحوقها في (30)مليلتر من الكحول الاثيلي (95%) وبعد الذوبان التام اضيف (100)مليلتر من الماء المقطر ثم رشحت باستعمال ورق ترشيح (Whatman No.1)(Davidsohn , 2001) .

5.2.3 الفحوصات التأكيدية Confirmative diagnoses

1.5.2.3 تشخيص البكتريا باستعمال جهاز الفايتك Bacterial Identification Using Vitek-2 Compact System

شُخصت العزلة البكتيرية بايوكيميائياً على وفق تقرير نتائج نظام Vitek 2 الالي ، وبحسب تعليمات الشركة المصنعة (BioMerieux Company: France) ، تم تحضير المعلق البكتيري وذلك بنقل كمية من المستعمرات البكتيرية المراد تشخيصها من مزرعة نقية تم تنقيتها مسبقاً بعمر (18- 24) ساعة إلى (3) مليلتر من محلول ملحي معقم (محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.45 %) ، وتم ضبط العكورة باستعمال جهاز ضبط العكورة (Densi –Chek) إلى (0.5) ماكفرلاند (McFarland) للبكتريا السالبة لصبغة كرام ، إذ تم تشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام بالكاسيت Gram negative identifier (GN-ID) ، وهو نظام مغلق تماماً لا يلزم اضافة أي كواشف آلية ، وتم وضع البطاقة على الكاسيت المصمم للاستعمال مع

نظام Vitek - 2 ووضع في الجهاز وتم ملؤه تلقائيًا في غرفة مفرغة ومحكمة الإغلاق وتم حضانته عند (35.5مْ ، وخضع تلقائيًا للقياس اللوني(بقراءة جديد)كل (15) دقيقة لمدة حضانة أقصاها (8) ساعات ، وتم تحليل البيانات باستعمال قاعدة بيانات Vitek - 2 والتي تسمح بتحديد الكائن الحي بشكل نشط ابتداءً من (180)دقيقة بعد بدء الحضانة (Karagöz *et al.*, 2015).

6.2.3 تحضير أشباح بكتريا *S. Typhimurium* Preparation of bacterial ghost (STGs)

اعتماداً على طريقة (Amara *et al.* , 2014)

1.6.2.3 تحضير المحلول الخزين Stock solution preparation

حضرت المحاليل التالية :

1- محلول SDS %10 : تم تحضيره بإذابة (10) غرام من (كبريتات دوديسيل الصوديوم) في (100) مليلتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة لمدة (20 دقيقة) .

2- محلول NaOH %10 : تم تحضيره بإذابة (10) غرام من (هيدروكسيد الصوديوم) في (100) مليلتر من الماء المقطر المعقم .

3- محلول H_2O_2 %30 : تمت إضافة ثلاثون مليلتر من (بيروكسيد الهيدروجين) إلى (70) مليلتر من الماء المقطر المعقم .

4- محلول Ethanol %60 : تم من خلال إضافة (60) مليلتر من محلول الإيثانول (الكحول الاثيلي) وكُمل حجمه الى (100) مليلتر بالماء المقطر المعقم .

2.6.2.3 تحضير وجمع الكتلة الحيوية البكتيرية Bacterial biomass preparation and collection

تم تلقيح (500) مليلتر من وسط المرق المغذي (المُعد في دورق سعة لتر واحد) بالمزروع الجرثومي لبكتيريا *S. Typhimurium* تحت ظروف قياسية ، ثم حضن بدرجة حرارة (37 مْ) لمدة (72 ساعة) ، بعد انتهاء مدة الحضن تم جمع الكتلة الحيوية عن طريق نبذ الوسط باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة 4000 دورة / دقيقة، ومن ثم غسلت بمحلول الملح الفسلجي (0.5 %) ، ثم جمعت الكتلة الحيوية للخلايا وأعيد تعليقها في الماء المقطر لإعطاء الصورة النهائية للكتلة الحيوية المحضرة لكل من المركبات الكيميائية المستخدمة والتي تتمثل بالمواد NaOH وSDS و H_2O_2 .

3.6.2.3 تحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز الادنى للنمو MGC للمواد NaOH وSDS و H_2O_2 و$CaCO_3$

تم تحديد تركيز المواد وفق المعايير القياسية المعتمدة كما جاء في Amara *et al.* ,(2013a), (2013b) ، وحضر المحلول الخزين لكل من NaOH وSDS بتركيز (10%) لكل منهما وكذلك H_2O_2 (30%) (المحضر كما ذكر في الفقرة 1.6.2.3) ، تم استخدام طريقة التخفيف التسلسلي القياسية لتحديد قيم Minimum inhibitory concenteration(MIC) وMinimum growth concentration(MGC) (يمثل تسلسل التركيز المخفف مباشرة بعد قيمة الـ MIC الذي يتم فيه ظهور وتمييز اول نمو لسلالة البكتيريا المدروسة) ، حيث تم إضافة (0.5) مليلتر من كل من المحاليل المذكورة أعلاه إلى (4.5) مليلتر من وسط المرق المغذي في أنبوب اختبار (10) مليلتر (للحصول على الحجم النهائي 5مليلتر والتخفيف10:1) ، بعدها لُقحت انابيب التجربة بـ (100) مايكروليتر من المزروع الجرثومي المنشط لبكتيريا *S. Typhimurium* المراد فحصه ثم حضنت بدرجة حرارة (37 مْ) لمدة (24 ساعة) تحت ظروف مسيطرة ، تم حساب قيمة MIC لكل مركب فضلاً عن التركيز الذي يسمح بالنمو البكتيري الأول والذي يتم اختصاره بـ MGC (التركيز الذي يُظهر النمو الأول بعد MIC) ، فيما يتعلق بالمركب $CaCO_3$ فلم يتم تحديد MIC وMGC وكان لا بد من استخدامهما بكميات مساوية إلى (+1) الذي يقابل (1.05) مايكروغرام لكل مليلتر ، بينما (-1) كان يقابل (0.35) مايكروغرام لكل مليلتر.

4.6.2.3 استخدام بروتوكول شبيه الإسفنج المختزل لتحضير اشباح بكتيريا *S. Typhimurium*

Sponge Like Reduced Protocol for preparing the *S. Typhimurium* Ghosts (STGs)

أُجريت تجربتين بمعلمات parameters مختلفة (كما في الجدول3-8) ، وتم اختيار التجربتين من النتائج التي حصل عليها Amara وجماعته (2014) بهدف الحصول على الظروف المثلى لتحضير الاشباح البكتيرية (BGs) ، وهي بشكل أساسي التجارب رقم (I و II) في بروتوكول Sponge Like الأصلي وكما هو موضح Sponge Like Reduced Protocol وفق ما جاء في Amara *et al.*,(2013) .

جدول(3-8) تحضير الاشباح البكتيرية باستخدام بروتوكول شبيه الاسفنج المختزل وحسب النظام الاحصائي Plackett-Burman .

متغيرات التجربة					
رقم التجربة	Shaking /temperature	SDS	H2O2	CaCO3	NaOH
I	1+	1+	1+	1+	1-
II	1+	1+	1-	1-	1-

1.4.6.2.3 طريقة عمل البروتوكول Protocol Procedure

تمثل المتغيرات المختلفة أربعة مركبات كيميائية (X_1) SDS، (X_2) H_2O_2، (X_3) $CaCO_3$ و (X_4) NaOH ومُثلت المعلمتين الفيزيائيتين كمتغير واحد ، وتم تمثيل كل متغير بمستويين (عالي ومنخفض) والمشار لها بـ +1 و -1 كما في الجدول (3-8) ، بالنسبة لكل من SDS و H_2O_2 و NaOH : تمثل قيمة +1 MIC بينما تمثل قيمة -1 MGC المحددة .

تم إجراء التجربتين في ثلاث خطوات :

- الخطوة الأولى : تتضمن المعاملة بكافة المتغيرات باستثناء H_2O_2 ، وبعد الغسل بالماء المقطر/المحلول الملحي، جرت الخطوة الثانية المتضمنة المعاملة بـ H_2O_2 فقط ، ففي الخطوة الأولى تم إضافة (1) مليلتر من كل من X5(+1 or -1) NaOH وSDS وCaCO3 إلى (2) مليلتر من المزروع البكتيري المنشط للحصول على حجم نهائي (5) مليلتر ولإعطاء تركيز نهائي يساوي X1 للكل ، و بعد حضن لمدة ساعة واحدة وفقاً لتصميم بلاكيت- بورمان Plackett-Burman ، نبذ الخليط (لكل تجربة) وتم جمع الخلايا كراسب خلوي Cell pellet باستخدام جهاز الطرد المركزي عند (4000) دورة لكل دقيقة لمدة (10دقائق) ، ومن ثم نقل العالق Supernatant إلى أنابيب فالكون نظيفة ومعقمة ، تم بعد ذلك غسل راسب الخلايا بـ (0.5%) محلول ملحي معقم ونبذ مرة ثانية .
- الخطوة الثانية : تم التخلص من المادة الطافية وأعيد تعليق الخلايا في (1) مليلتر من (+) أو (-) قيمة H_2O_2 وفقًا لتصميم Plackett-Burman لمدة (30 دقيقة) ، ومن ثم اعيد جمع الخلايا والعالق على النحو المذكور أعلاه ، ثم غسل راسب الخلايا بمحلول ملحي متبوعًا بالطرد المركزي (كما هو مذكور أعلاه) .
- الخطوة الثالثة : تم إعادة تعليق راسب الخلايا بـ الإيثانول (60 %) وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة (30 دقيقة) مع التدوير بلطف كل خمس دقائق لمدة (30 ثانية) ، وتم تكرار عملية جمع وغسل راسب الخلايا على النحو الوارد أعلاه .

5.6.2.3 تحديد تركيز الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين والبروتين
Determination of the DNA and protein concentrations

تم حساب تركيز الحمض النووي والبروتين لكل عالق ناتج من الخطوات الثلاث للتجربة (1.4.6.2.3 اعلاه) باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي (Thermo Scientific-ISION pro Software V4.30) وذلك وفقًا للطريقة المتبعة من قبل Amara *et al.* , (2014) .

تم تحديد تركيز الحمض النووي عن طريق قياس الكثافة البصرية على طول موجي (260) نانومتر، 1 =$E260$ (extinction) يتوافق مع 50μg dsDNAmL−1 . وتم تحديد تحلل البروتين لكل تجربة (المواد الطافية) باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند (280) نانومتر، و قدر تركيز البروتين في العالق من المنحنى القياسي لبروتين ألبومين المصل البقري (2013), Amara *et al.* .

6.6.2.3 تقييم جودة اشباح بكتيريا *S. Typhimurium* (STGs) باستخدام المجهر الضوئي
Evaluation STGS quality using Light Microscope .

صُبغت المسحات المُعدة لكل من خلايا *S. Typhimurium* الحية وخلايا الأشباح االبكتيرية STGs المعدة لكلا المستحضرين preparations (من التجربة 1 و 2 في الجدول3-8) باستخدام المعايير القياسية للتصبيغ بصبغة البنفسج البلوري ولمدة (2 دقيقة) ، وتم فحص الخلايا من كل تجربة باستخدام المجهر الضوئي ، حددت جودة الخلايا بناءاً على البنية ثلاثية الابعاد للخلايا سواء كانت سليمة أم مشوهة.

7.6.2.3 تقييم جودة اشباح بكتيريا *S. Typhimurium* (STGs) باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح
Evaluation STGs quality using Scanning Electron Microscope.

لغرض المزيد من التقييم لجودة كفاءة البنية ثلاثية الأبعاد للخلايا البكتيرية ، أُستخدام المجهر الإلكتروني لمسح الخلايا البكتيرية ، إذ تم تحضير المسحة البكتيرية الجافة لكل مستحضر باستخدام طريقة Glutaraldehyde Standerd Method للتثبيت ، وبعدها تم طلاء سطح المسحة بحوالي (15)نانومتر من الذهب (SPI-Module Sputter Coater) (Brown & Auburn, 2012) .

8.6.2.3 مسح سطح اشباح بكتيريا *S. Typhimurium* (STGs)
Scanning of the *S. Typhimurium* Gs (STGs) Surface .

فحصت العينات المطلية باللون الذهبي باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (JEOL JSM-5300) ، وكان جهد تسارع العنصر الثانوي عند (30) كيلو فولت (في درجة حرارة الغرفة) ، و تم تعديل الصور الرقمية للعينات وحفظت للدراسات اللاحقة .

9.6.2.3 فحص العقامة Sterility Test (Viability)

زرعت عينات من الـ STGs المحضرة اعلاه على وسط غراء الماكونكي ووسط غراء SS و /او وسط غراء XLD الانتقائية ، حضنت الأطباق المزروعة في الحاضنة بدرجة حرارة (37 مْ) لمدة يومان ، للتأكد من نقاوة اللقاح وخلوه من البكتريا الحية وعدم تلوثه ، كما زرعت عينة من العترة الحية للـ *S. Typhimurium* على اطباق اخرى لذات الاوساط الزرعية المذكوره واستخدمت كمجموعة ضابطة .

10.6.2.3 فحص السلامة Safety test

حقنت 6 جرذان مختبرية بمتوسط أوزان (150)غرام بالـ STGs وبمقدار (150,100,50)مايكروليتر داخل الصفاق (Intra Peritoneal) (2 جرذ لكل مقدار جرعة) ، وتم مراقبة الجرذان مدة 7 ايام للتأكد من سلامة اللقاح المستعمل في التجربة ، إن عدم ظهور أعراض مرضية على تلك الفئران دلالة على سلامة اللقاح البكتيري ، تم التضحية بالجرذان المحقونة بالجرع المذكورة وشرحت مباشرة حيث عرضت الاحشاء الداخلية الى الفحص بالعين المجردة لتعيين وجود علامات غير طبيعية مقارنة بفئران السيطرة غير المصابة.

11.6.2.3 فحص التلازن (التراص) لتفاعل المستضد السطحي للـ STGs مع الأجسام المضادة
Agglutination test for STGs surface antigen-antibodies reaction.

أُجري اختبار التلازن على الشريحة Rapid Slide test باستخدام مصول مضادة قياسية مجهزة من شركة (Mediaclone) لغرض تحديد تفاعل المستضد السطحي للـ STGs والأجسام المضادة الخاصة به ، ولغرض التحديد النوعي للأجسام المضادة الخاصة المضادة لبكتيريا الـ *Salmonella* ، وذلك حسب طريقة (Cruickshank, (1965); Felix & Callow, (1943) ، اذ تم استخدام الأجسام المضادة الموجودة في العدة للتفاعل مع الـ *S. Typhimurium* و مع الـ STGs ، واستخدم المستضد (O-antigen of *Salmonella*) المجهز بالعدة كسيطرة (موجبة) ، تم اختبار قابلية كل من الـ STGs (المحضر وفق الخطوات اعلاه) والمستضد O للسالمونيلا على تحفيز التراص مع الأجسام المضادة المجهزه على النحو الاتي :

أُخذت شريحة نظيفة ووضع عليها (5) مايكروليتر من كل عينة ، ثم أُضيف الى العينتين (3) مايكروليتر من المصل المضاد القياسي للسالمونيلا (Standard antisera) ومزج جيداً وتركت لمدة (4 دقائق) لضمان التفاعل التام ، وتركت قطرة من المستضد من دون اضافة المصل كسيطرة (سالبة) ، أن حدوث التلازن بشكل واضح والذي يمكن رؤيته بالعين المجردة دليل على النتيجة الموجبة لهذا الاختبار .

ولغرض التحديد النوعي للأجسام المضادة الخاصة المضادة لبكتيريا الـ *Salmonella* الموجودة في المصل اثناء وبعد الانتهاء من برنامج التطعيم ، تؤخذ شريحة زجاجية نظيفة وتوضع عليها قطرتان من محلول الملح الفسلجي ، ثم يؤخذ جزء من المستعمرة بواسطة عروه ناقل معقم إلى كل من القطرتين وتمزج جيداً مع المحلول ثم تضاف قطرة واحدة من المصل المضاد إلى إحدى القطرتين السابقتين وتمزج جيداً لمدة (30 ثانية) ، وتترك القطرة الثانية من دون اضافة المصل كسيطرة ، أن حدوث التلازن بشكل واضح بعد مرور (2-3 دقيقة) دليل على النتيجة الموجبة لهذا الاختبار (Collins and lyne, 1987).

7.2.3 الحيوانات المستعملة في الدراسة

تم توزيع (41) ذكر من الجرذان البيض المختبرية *Rattus rattus* المستخدمة في هذه الدراسة حسب تصميم التجربة الى ثلاثة مجاميع رئيسية ، المجموعة الاولى هي مجموعة فحص سلامة اللقاح التي تتكون من (6) جرذان بمتوسط أوزان (150)غرام توزعت الى ثلاثة مجاميع فرعية بواقع(2) جرذ لكل مجموعة ، المجموعة الرئيسية الثانية هي مجموعة البروتوكول التجريبي للقاح التي تتكون من (15) جرذ بمتوسط أوزان (150)غرام وتوزعت الى ثلاثة مجاميع فرعية بواقع (5) جرذ لكل مجموعة ، بالاضافة الى المجموعة الرئيسية الثالثة هي مجموعة دراسة التداخل بين التلقيح والمادة المسرطنة (AOM) وخصص لها (20) جرذ بعمر (4-5) اسبوع وأوزان تتراوح بين (50-75)غرام ، خضعت المجاميع تحت المراقبة لمدة

اسبوع قبل استخدامها للتأكد من سلامتها ونشاطها وحيويتها ، والتي جهزت من قبل البيت الحيواني التابع لكلية الصيدلة – جامعة كربلاء وتم ايوائها في البيت الحيواني العائد لذات الكلية ، وزعت الحيوانات الى مجاميع في اقفاص بلاستيكية ذات اغطية معدنية مخصصة لتربية الجرذان وفرشت ارضية الأقفاص بنشارة الخشب وروعي تبديلها بين الحين والآخر وتم توفير الظروف المثلى تحت درجة حرارة 25 ^{o}م والتهوية والرطوبة المناسبة بالاضافة الى نظافة ماء الشرب وأعتمدت مدة الاضاءة 12ساعة ومدة الظلام 12ساعة ، اعطيت الغذاء بصورة حرة المكون من العليقة الحيوانية (pellets) *ad libitum* وهي عبارة عن علف يتم شراؤه من الأسواق المحلية .

1.7.2.3 مجاميع الدراسة

: 1.1.7.2.3

A- البروتوكول التجريبي للتلقيح بـ STGs

Experimental protocol for vaccination with STGs

قسمت حيوانات هذه التجربة عشوائيا الى ثلاث مجاميع وبواقع (5) حيوانات لكل مجموعة وعلى النحو التالي (Rabea *et al.*,2022):

1- المجموعة الاولى : مجموعة السيطرة حقنت تحت الجلد Subcutaneous بمحلول الـ Normal saline فقط حسب تصميم التجربة .

2- المجموعة الثانية : أُعطيت جرعة واحدة عن طريق الفم Orally بأحجام متساوية (1:1) من STGs + مساعد فرويند Freund's adjuvant بجرعة (100) مايكروليتر/ جرذ .

3- المجموعة الثالثة : حقنت بجرعة واحدة تحت الجلد Subcutaneous بأحجام متساوية (1:1) من STGs + مساعد فرويند Freund's adjuvant بجرعة (100) مايكروليتر/ جرذ .

تم تطعيم جميع حيوانات التجربة ثلاث مرات بفاصل أسبوعين ، اذ تم إعطاء لقاح الـ STGs بجرعة أولية في اليوم صفر ، تلتها جرعات معززة في اليومين الرابع عشر والثامن والعشرين حسب ما ذكره Vinod وجماعته (2014) ، تم جمع المصل من كل حيوان قبل كل جرعة لقاح وبعد انتهاء برنامج التطعيم وتم اختبار الأجسام المضادة في المصل باستخدام اختبار التلازن الموصوف في الفقرة (11.6.2.3) .

B - دراسة تأثير اللقاح على القابلية الاجتياحية لجرثومة *S. Typhimurium* (تجربة التحدي)

Studying the effect of the vaccine on the invasiveness of a bacterium *S. Typhimurium* (Challenge test)

بعد الانتهاء من برنامج التطعيم بأكمله كما ورد في الفقرة (A-1.1.7.2.3) ، تم إصابة كل جرذ عن طريق الحقن تحت الجلد بـ (1) مليلتر من العالق الجرثومي لبكتريا *S. Typhimurium* الحية وبتركيز ($10^{8}\times1$ خلية /مليلتر) CFU/mL لمرة واحدة (Hougen *et al.*, 1989)، بعدها تم جمع عينات البراز (1) غرام من كل مجموعة خلال أسبوع واحد من احداث الإصابة من بعد اليوم الأول لتجربة المواجهة

(التحدي) Challenge مع البكتيريا الحية وزرعت على وسط غراء السالمونيلا- الشيكلا (SS-agar) ، وبعد مرور(7) أيام تم التضحية بجميع الجرذان وشُرحت وأُخذ جزء من الكبد والطحال كلاً على حده ، ثم هرست مع (1) مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي (PBS) وتم مجانسة العالق المتكون بواسطة المازج الدوار ، وزرعت على وسط غراء السالمونيلا- الشيكلا (SS-agar) ، حُضنت جميع الاطباق عند (37 مْ) لمدة (24 ساعة) وتم قراءة نتائج الزرع بحساب العدد الجرثومي لغرض المزيد من الفحوصات التأكيدية (Rabea *et al.*, 2022;Vinod *et al.*, 2017).

C- تحديد الفعالية الضد بكتيرية في المصل Determination of serum bactericidal activity

تم اختبار النشاط الضد بكتيري في المصل كما ذكره Hossain *et al.*, (2012) ، اذ تم مزج (25) مايكرولتر من المصل مع (100) مايكرولتر من العالق الجرثومي لبكتيريا *S. Typhimurium* الحية وبتركيز (1×10^8 خلية /مليلتر) CFU/mL في انبوبة معقمة ، وحضنت لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة ، بعد الحضن ، زرعت العينات على الوسط الانتقائي للسالمونيلا ، وحضنت لمدة (24- 48) ساعة عند (37 مْ) لغرض استخدامها لتحديد عدد الوحدات المكونة للمستعمرة CFU لكل مليلتر .

D- تحضير العالق البكتيري Preparation of bacterial suspension

نقلت عدة مستعمرات منفردة ونقية من وسط اكار السالمونيلا – الشيكلا الصلب إلى أنبوبة اختبار حاوية على (10) مليلتر من محلول الملح الفسلجي المحضر في الفقرة (2.4.2.3) ، وبعد المزج الجيد باستعمال المازج قورنت عكورته بعكورة أنبوبة مكفرلاند رقم (0.5) المحضر في الفقرة (1.4.2.3).

E- إستحداث سرطان القولون Induction of colon cancer

تم استحداث سرطان القولون والمستقيم في ذكور الجرذان بوساطة حقنها تحت البريتون بمادة الـ Azoxymethan بجرعة (15) ملغم/كغم من وزن الحيوان بعد ان تم تذويبها بالماء المقطر وحقنت بها الحيوانات مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتالين ، فقد ثبت ان هذه المادة تعد من المواد السامة والمسرطنة للقولون (Yu *et al.*, 2020) .

2.1.7.2.3 دراسة التداخل بين التلقيح بـ STGs والخلايا الحية لجرثومة *S. Typhimurium* ومادة المسرطنة (AOM) في الجرذان المختبرية

Study of the interaction between vaccination with STGs and live cells of *S. Typhimurium* and the carcinogen (AOM) in laboratory rats.

خُصص لهذه التجربة (20) جرذ تم تقسيمها الى اربع مجاميع وبواقع (5) جرذان لكل مجموعة حسب الطريقة المتبعة من Jabbar, *et al.* (2023) وعلى النحو التالي :

1- المجموعة الاولى : مجموعة السيطرة السالبة التي لم تحقن وتجرع بأي مادة وأطعمت العليقة القياسية وشربت ماء الحنفية ، جمعت عينات الدم وشرحت هذه المجموعة عند الحاجة اليها خلال ظروف التجربة .

2- المجموعة الثانية : مجموعة السيطرة الموجبة التي تم حقنها بمادة (AOM) وبمعدل (15) ملغم/كغم من وزن الحيوان وحقنت هذه الحيوانات مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتالين وأطعمت العليقة القياسية وشربت ماء الحنفية ، جمعت عينات الدم وشرحت هذه المجموعة من الحيوانات حسب ظروف التجربة.

3- المجموعة الثالثة : مجموعة الحيوانات التي تم حقنها بجرعة واحدة تحت الجلد Subcutaneous بأحجام متساوية (1:1) من STGs + مساعد فرويند Freund's adjuvant بجرعة (100) مايكروليتر/ جرذ بعد (20) اسبوع من تاريخ الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر برنامج التطعيم بأكمله كما ورد في الفقرة {(1.1.7.2.3) A-3 } ثم تم جمع عينات الدم وشرحت بعد ذلك.

4- المجموعة الرابعة : مجموعة الحيوانات المعاملة بالمادة (AOM) المسرطنة حسب الطريقة المذكورة في الفقرة (2) اعلاه ، والتي تم اخضاعها للتداخل بالبكتيريا الحية عن طريق الحقن تحت الجلد بـ (1) مليلتر من العالق الجرثومي لبكتريا *S. Typhimurium* الحية وبتركيز (1×10^8 خلية /مليلتر) CFU/mL لمرة واحدة وذلك بعد انتهاء برنامج التطعيم الكلي كما ورد في الفقرة {(1.1.7.2.3) A-3 } ، بعدها جمعت عينات البراز والدم وتم تشريحها كما ورد في الفقرة (1.1.7.2.3 - B).

8.2.3 جمع العينات Samples Collection

1.8.2.3 عينات الدم The Blood 'samples

تم صيام Fasting الحيوانات لمدة (12 ساعة) وجمعت عينات الدم بعد تخدير الحيوانات باستعمال قطن حاوي على مادة التخدير الكلوروفورم موضوع في علبة كبيرة موجود فيها الحيوان ليتم تخديره عن طريق التنفس بعدها تم سحب (5) مليلتر من الدم مباشرة من القلب عن طريق طعنة القلب Cardiac puncture للحصول على أكبر كمية من الدم ، وضعت كمية من الدم (1)مليلتر في أنابيب اختبار حاوية على المادة المانعة للتخثر EDTA الخاصة بإجراء اختبار تعداد الدم الكلي ، و(4)مليلتر في أنابيب خالية من المادة المانعة للتخثر وحاوية على المادة الهلامية (Gel Tubes) لغرض فصل المصل وإجراء اختبارات فحص المقايسة المناعية بواسطة ELASA TLR-4وTNF-α وPDL-1) ، إذ تم فصل المصل بترك الانبوب يتخثر حوالي (30 دقيقة) في درجة حرارة الغرفة ثم طرد باستعمال جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة (3000 دورة /الدقيقة) ولمدة (15 دقيقة) ، نقل المصل المفصول إلى أنابيب بلاستيكية صغيرة Eppendrof Tubes معلمة معقمة وجافة ، بعدها حفظت هذه الأنابيب الحاوية على المصل في حالة تجميد عند (- 20 °م) لغرض استخدامه في أجراء الفحوصات المناعية لاحقاً.

2.8.2.3 عينات الانسجة Tissue 'samples

بعد أخذ عينات الدم من الحيوانات ، تم التضحية بالحيوانات وشرحت واستأصلت الأنسجة والأعضاء المطلوبة ، عزلت انسجة القولون والمستقيم من جسم الحيوان ومن ثم تم غسلها بالماء لإزالة الدم الموجود عليها ، بعدها تم تجفيفها عن طريق وضعها على ورق نشاف ، فتحت بشكل طولي لكي يتم حفظها لضمان وصول المادة الحافظة اليها ، وحفظت العينات في عبوات معلمة نظيفة وجافة محكمة الغطاء وحاوية على مادة الفورمالين (10%) Formalin كحد اقصى لمدة (48) ساعة ، وبعد ذلك تركت هذه العبوات لحين إجراء عملية التقطيع النسيجي عليها لما يقارب ثلاثة أيام . وعزلت انسجة الكبد والطحال والأمعاء بنفس الطريقة بعد ان تم تقطيعها الى قطع صغيرة لضمان وصول المادة الحافظة اليها .

9.2.3 الدراسة النسجية Histological Study

1.9.2.3 التحضيرات النسجية Histological preparations

أُستخدمت طريقة Suvarna وجماعته (2013) لتحضير المقاطع النسجية مع بعض التعديل ، بعد ان تم تثبيت عينات الاحشاء الداخلية قيد الدراسة للجرذان المعاملة ، استخرجت من محلول الفورمالين ووضعت على ورق الترشيح ثم نقلت إلى (70%)كحول اثيلي وأجريت عليها بعد ذلك سلسلة من المعاملات شملت :

1.1.9.2.3 الانكاز والترويق Dehydration and Clearing

تم غسل النسيج بالماء الجاري ومن ثم تم سحب الماء منه وذلك عن طريق إمراره في سلسلة متصاعدة من الكحول الاثيلي بتركيز (50% و70% و80% و 90% و100%) لمدة (2) ساعة لكل تركيز ،بعدها تم ترويق النماذج بالزايلول لمدة عشر دقائق ، تم تكرار هذه الخطوه مرتين .

2.1.9.2.3 التشريب Infiltration

بعد الترويق ، نقلت النماذج إلى مزيج من الزايلين وشمع البرافين Paraffin wax المنصهر (بدرجة انصهار 57 -60 °م) والمرشح بنسبة 1:1 وطمرت فيه لمدة ساعتين داخل فرن كهربائي بدرجة حرارة (58 °م) بهدف الحفاظ على سيولة الشمع ولضمان عملية التشريب ، ومن ثم تم تغيير شمع البرافين مرة كل ساعة بنقل النماذج مرتين إلى قناني حاوية على الشمع .

3.1.9.2.3 الطمرEmbedding

ثبتت النماذج داخل قوالب من الشمع وذلك عن طريق صب الشمع في قوالب بلاستيكية خاصة ، ثم طمرت فيها النماذج وتركت لتتصلب بدرجة حرارة الغرفة ومن ثم فصلت عن القوالب وحفظت إلى حين وقت التقطيع .

4.1.9.2.3 التقطيع Sectioning

قطعت القوالب الى شرائح بسمك (5) مايكروميتر باستعمال جهاز المشراح اليدوي Rotary Microtome ، وتم تثبيتها على شرائح زجاجية نظيفة بعد أن تم وضعها لمدة (1-2 دقيقة) في حمام مائي بدرجة حرارة (45-50 °م) لضمان فرش المقاطع وبعدها تركت لتجف على الصفيحة الساخنة Hot Plate بدرجة (37 °م) .

5.1.9.2.3 التصبيغ والتحميل Staining and Mounting

صبغت المقاطع النسجية باستعمال صبغة الهيماتوكسلين والايوسين الكحولي ، إذ تم غمرها في الزايلين لمدة خمس دقائق لغرض التخلص من الشمع ثم مررت بسلسلة تنازلية من تراكيز الكحول الاثيلي (Hydration) (100%، 90% ،80% ،70%) لمدة (5 دقائق) لكل تركيز بعدها في الماء المقطر لمدة دقيقة بعدها صبغت الشرائح بصبغة الهيماتوكسلين لمدة خمس دقائق وغسلت بماء الحنفية لمدة (10 دقائق) ثم بكحول محمض مرتين إلى ثلاثة لغرض ازالة الصبغة الزائدة ثم بماء الحنفية ، يليه ماء مقطر ، بعدها صبغت الشرائح بالايوسين لمدة (6 دقائق) بعدها بالماء المقطر لمدة دقيقتين ، ثم نقلت الى سلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي (70%، 80 %، 90 %، 100 %) لمدة دقيقتين لكل منها وغمرت بالزايلين بمرحلتين لكل مرحلة لمدة (10 دقائق) لغرض الترويق ، جففت الشرائح بعدها حُملت باستعمال مادة الـ Distrain plasticizer xylene(DPX) لتثبيت غطاء الشريحة وتركت لتجف لليوم الثاني وبذلك تكون جاهزة للفحص.

6.1.9.2.3 التصوير المجهري Microphotography

صُورت المقاطع النسجية باستعمال المجهر الضوئي من نوع Optica مزود بكاميرا رقمية Digital Camera عالية الدقة من نوع Canon وبقوة تكبير مختلفة بما يتناسب مع متطلبات الدراسة .

2.9.2.3 فحص بؤر الخبئ الشاذ في قولون الحيوانات المختبرية Aberrant Crypt Foci (ACF)

تم فحص الـ (ACF) على وفق الطريقة المتبعة من قبل Bird (1987) ، بعد تشريح الجرذان تم أخذ جزء القولون والمستقيم ووضع في طبق بتري حاوي على (5)مليلتر من محلول الملح الفسلجي وأزيلت الانسجة الدهنية والرابطة العالقة فيه باستخدام ملقط دقيق وشفرة حادة ثم فُتح طوليا ونُظف باستخدام محلول الملح الفسلجي وقطع الى قطع صغيرة وثبتت هذه القطع بمحلول (10%) فورمالين لمدة (24 ساعة) ، بعدها غسلت بالماء الجاري للتخلص من بقايا المثبت وصبغت بصبغة (0.2%) المثيل الزرقاء لمدة دقيقة واحدة ثم جففت العينة بورق الترشيح وفحصت بالمجهر الضوئي على القوة 40X .

10.2.3 الفحوصات الدموية : اختبار تعداد الدم الشامل Complete Blood Count (CBC) وحساب النسبة المئوية للخلايا المحببة The granulocytes' percentage calculation

بعد انتهاء المدة المحددة للتمنيع (42) يوم ، تم فحص عينات الدم المسحوب (من كل مجموعة) من أجل تعداد الدم الكامل التفاضلي (CBC) ، وتم إجراء فحص CBC التفاضلي على محلل دم آلي Automated blood analyzer ثم تم حساب نسبة الخلايا المحببة (Rabea *et al.*,2022) .

11.2.3 الدراسات المناعية Immunological Studies

1.11.2.3 تقدير تعبير المعايير المناعية TLR-4 و PDL-1 و TNF-α في مصل جرذان مجاميع الدراسة

Estimation the expression of immunological markers of TLR-4, PDL-1 & TNF-α in the serum of rats of the study groups .

قُدِّر مستوى TLR-4 و PDL-1 و TNF-α في مصول الجرذان قيد الدراسة باستعمال اختبار الامتصاصية المناعية المرتبطة بالأنزيم Sandwich ELISA وحسب طريقة العمل في عدة التشخيص المجهزة من قبل شركة (ELK Biotechnology /China) وهي كالآتي :المعيار المناعي Rat TLR4(Toll Like Receptor4) ELISA Kit ذو الرقم التسلسلي (ELK2106) ، المعيار المناعي Rat PDL1(Programmed Cell Death Protein 1 Ligand 1) ELISA Kit ذو الرقم التسلسلي (ELK0661) والمعيار المناعي Rat TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit ذو الرقم التسلسلي (ELK1396) .

1.1.11.2.3 مبدأ الاختبار Test Principle

يعتمد هذا الاختبار أساساً على طلاء الجدار الداخلي للحفر الصغيرة في صفيحة الفحص بالأجسام المضادة المتخصصة لمستقبل Toll Like 4 (TLR4) ، أو لبروتين موت الخلايا المبرمج (PDL-1) أو لعامل النخر الورمي –الفا (TNF-α) كلا على حده ، تضاف العينات أو المقاييس Standards إلى حفرWells صفيحة الفحص المناسبة ذات الـ 96 حفرة ثم يضاف بعدها الجسم المضاد المترافق مع البايوتين Biotin-conjugated antibody والمتخصص للمستقبل Toll Like 4 أو لبروتين موت الخلايا المبرمج أو لعامل النخر الورمي الفا، ثم بعدها يضاف الـ Avidin - Horseradish Peroxidase (HRP) إلى كل حفر الصفيحة ويتم حضنها ، بعد انتهاء مدة الحضن يضاف محلول الركيزة TMB وبعدها تُظهر الحفر التي تحتوي على الـ (TLR4 او PDL-1 او TNF-α) والأجسام المضادة المترافقة مع البيوتين والإنزيم Avidin المترافق تغيراً في اللون ، ينتهي التفاعل بإضافة محلول التوقف الحمضي (حمض الكبريتيك) ويقاس الامتصاص عند طول موجي 450nm ± 10nm ، يتم التحديد الكمي للمعايير المناعية قيد الدراسة في عينات مصل جرذان التجربة من خلال مقارنة الكثافة الضوئية OD للعينات مع المنحنى القياسي

2.1.11.2.3 محتويات عدة الفحص ELISA Kit Contents

تحتوي العدد التشخيصية الخاصة بالمعايير المناعية TLR4 وPDL-1 و TNF-α على مجموعة مكونات مبينة في الجدول (3-9) .

جدول (3-9) محتويات العدد التشخيصية

Components	Quantity
Pre-Coated Microplate	12 strips x 8 wells
Standard (Lyophilized)	2 vials
Biotinylated Antibody (100×)	120 µL
Streptavidin-HRP (100×)	120 µL
Standard/Sample Diluent Buffer	20 mL
Biotinylated Antibody Diluent	12 mL
HRP Diluent	12 mL
Wash Buffer (25×)	20 mL
TMB Substrate Solution	10 mL
Stop Reagent	6 mL
Plate Covers	2 pieces

3.1.11.2.3 تحضير المحاليل Reagents Preparation

حُضرت الكواشف في العدد وفقا لتعليمات الشركة المجهزة وكما يلي :

1- تم تهيئة جميع الكواشف والمحاليل القياسية والعينات بدرجة حرارة الغرفة .

2- خُفف محلول الغسيل المركز 25X الى تركيز 1X في الماء المقطر المزدوج للحصول على (500) مليلتر من محلول الغسل Wash Buffer .

3- حُضر محلول العمل القياسي Standard Working Solution كما يلي :

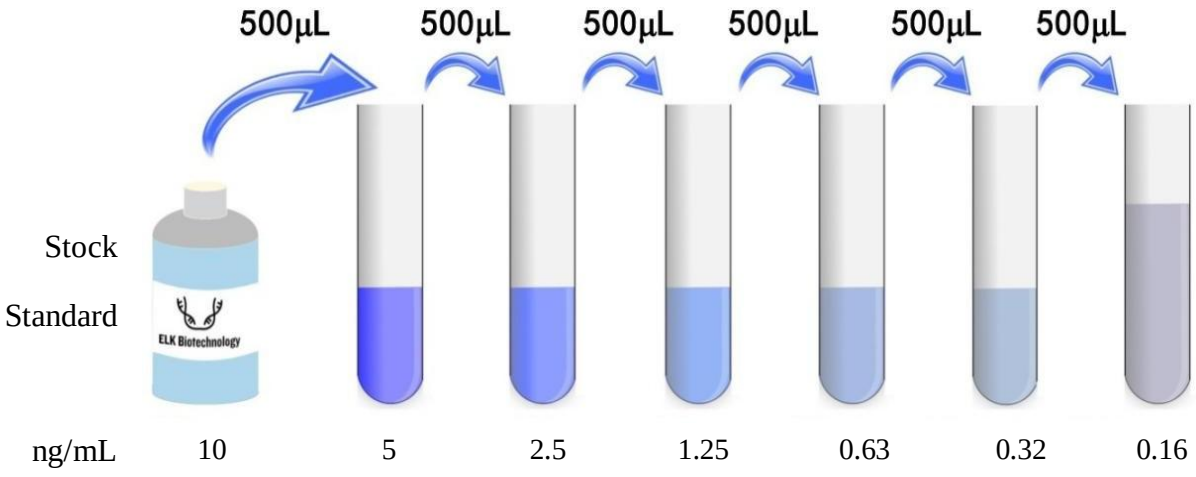
* وضع المركب القياسي في جهاز الطرد المركزي عند 1000 x g لمدة دقيقة واحدة .

*عُلق المركب القياسي باستخدام (1) مليلتر من محلول التخفيف القياسي وحفظ بدرجة حرارة الغرفة لمدة عشر دقائق مع التحريك بلطف قبل اجراء التخفيفات (تركيز المركب القياسي في محلول الخزين القياسي كالآتي :

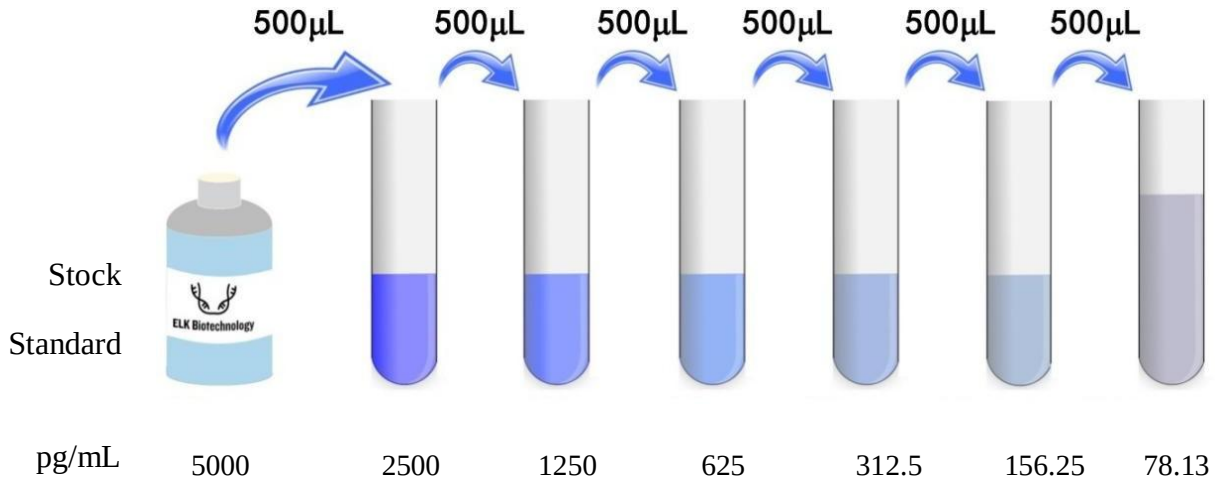
- 10ng/mL خاص بالمعيار المناعي TLR4
- 5000 pg/mL خاص بالمعيار المناعي PDL1
- 1000 pg/mL خاص بالمعيار المناعي TNF-α)

* تم تحضير 7 أنابيب تحتوي على (0.5) مليلتر من محلول التخفيف القياسي وأُستخدام المخفف القياسي لإنتاج سلسلة التخفيف المزدوجة وفقاً للشكل (3-2) و(3-3) و (3-4) ادناه .

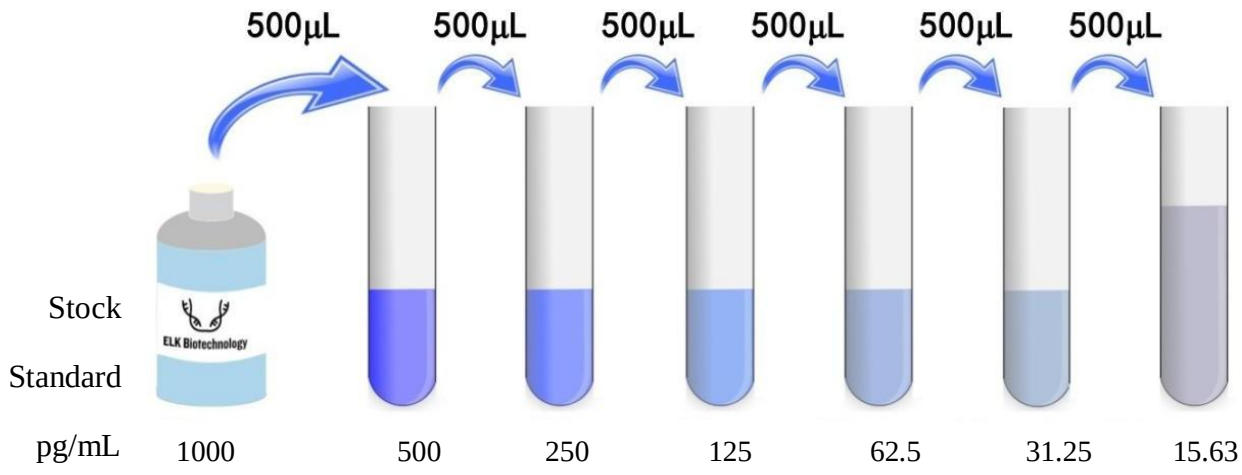
* حُضرت التخافيف (0.16 , 0.32 , 0.63 , 1.25 , 2.5 , 5 , 10) ng/mL خاصة بالمعيار المناعي TLR4 ، والتخافيف (5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.13)pg/mL خاصة بالمعيار المناعي PDL-1 ، والتخافيف (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63)pg/mL خاصة بالمعيار المناعي TNF-α ، و مثلت أنابيب EP الأخيرة مع محلول التخفيف القياسي المعيار الصفري Blank (0) ng/mL .



الشكل (3-2) : التخفيف التسلسلي للمحلول القياسي للـ TLR4



الشكل (3-3) : التخفيف التسلسلي للمحلول القياسي للـ PDL-1



الشكل (3-4) : التخفيف التسلسلي للمحلول القياسي للـ TNF-α

4- حُضر محلول الجسم المضاد 1X Biotinylated Antibody و محلول 1X Streptavidin-HRP عن طريق تدوير المركب القياسي في جهاز الطرد المركزي لمدة وجيزة قبل الاستخدام ، ومن ثم تم اذابتهم لتحضير محلول العمل بتركيز 100 ضعف عن طريق استخدام محلول التخفيف الخاص بكل مركب على التوالي .

5- تم سحب الكميات المطلوبة من محلول الركيزة الاساسي TMB Substrate Solution باستخدام تبات Tips معقمة مع مراعاة التخلص من الكمية المتبقية داخل الماصة الاوتوماتيكية بسكبها خارجا وعدم ارجاعها إلى قارورة المحلول الاساسية .

4.1.11.2.3 خطوات العمل Assay Procedure

1- حُددت الحفر Wells الخاصة لكل من محاليل التخفيف القياسية ، العينات و المعيار الصفري Blank بواقع 7 حفر للمحاليل القياسية و1 حفرة للـ Blank ، تم اضافة (100) مايكروليتر من محلول العمل القياسي (المحضر كما في الخطوة 3 من الفقرة 3.1.11.2.3) او (100) مايكروليتر من العينات في قعر الحفر الملائمة مع تجنب ملامسة السطح الداخلي للحفر ومنع تشكل الرغوة قدر الإمكان ، ثم غطيت اللوحة باستخدام غطاء اللوحة المانع للتسرب ، و حضنت لمدة (80 دقيقة) عند (37 °م) .

2- أُزيل غطاء اللوحة وتم التخلص من محلول الحفر عن طريق سكبه مباشرة في حوض الغسيل لتجنب تلوث الحفر الاخرى وغسلت اللوحة 3 مرات باستعمال (200) مايكروليتر من محلول الغسيل المؤقت1X وبواقع (1-2 دقيقة) لكل غسله ، ثم قلبت اللوحة على الورق الماص لضمان التخلص التام من محلول الغسل.

3- تم اضافة (100) مايكروليتر من محلول عمل Biotinylated Antibody إلى كل حفرة ، ثم غطيت اللوحة وحضنت لمدة (50 دقيقة) عند (37 °م) .

4- كررت عملية السكب والغسل بواقع 3 مرات كما تم إجراؤها في الخطوة 2 .

5- تم اضافة (100) مايكروليتر من محلول عمل Streptavidin-HR إلى كل حفرة ، غطيت اللوحة وحضنت لمدة (50 دقيقة) عند (37 °م) .

6- كررت عملية السكب والغسل بواقع 5 مرات كما هو المعمول به في الخطوة 2 .

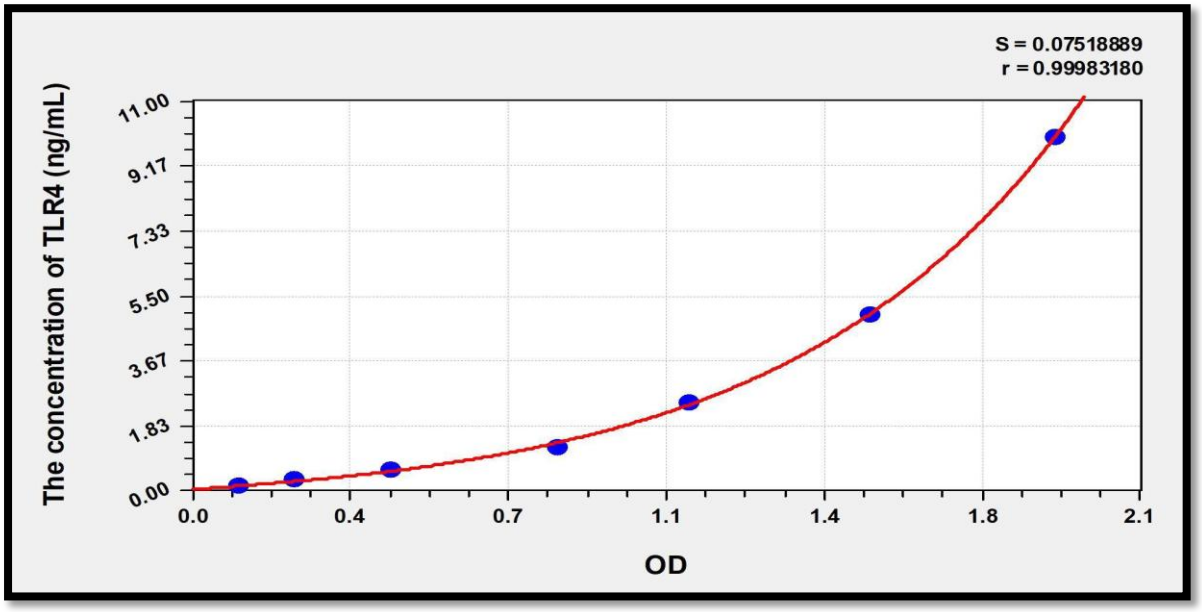
7- أضيف (90) مايكروليتر من محلول الركيزة الاساسي TMB إلى كل حفرة ، وغطيت اللوحة بغطاء لوحة مانع للتسرب جديد وتم الحضن في الظلام لمدة (20 دقيقة) (على أن لا تتجاوز 30 دقيقة) عند (37 °م) سيتحول السائل إلى اللون الأزرق بإضافة محلول الركيزة TMB ، تم تسخين قارئ الصفيحة الدقيقة Microplate Reader لمدة (15 دقيقة) قبل قياس الكثافة الضوئية OD .

8- أُضيف (50) مايكروليتر من كاشف التوقف Stop Reagent إلى كل حفرة وملاحظة تحول اللون الازرق إلى اللون الأصفر على الفور .

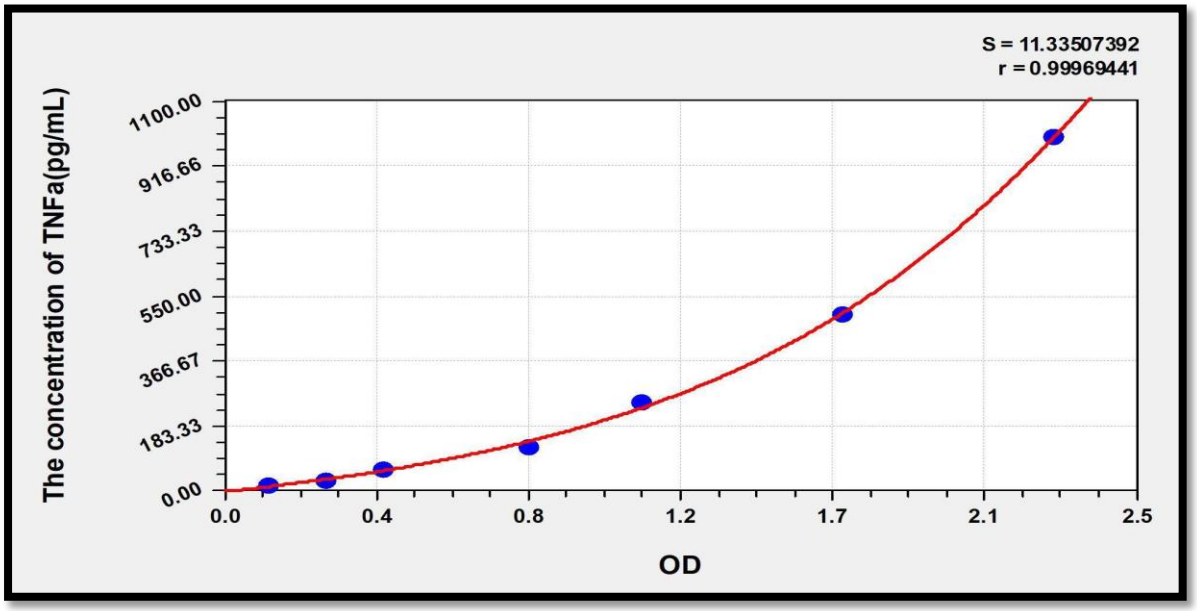
9- تم تحديد قيمة الكثافة الضوئية باستعمال قارئ صفيحة ميكروسكوبية مضبوطة على 450 نانومتر على الفور بعد اضافة محلول الايقاف .

5.1.11.2.3 حساب النتائج Calculation Of Result

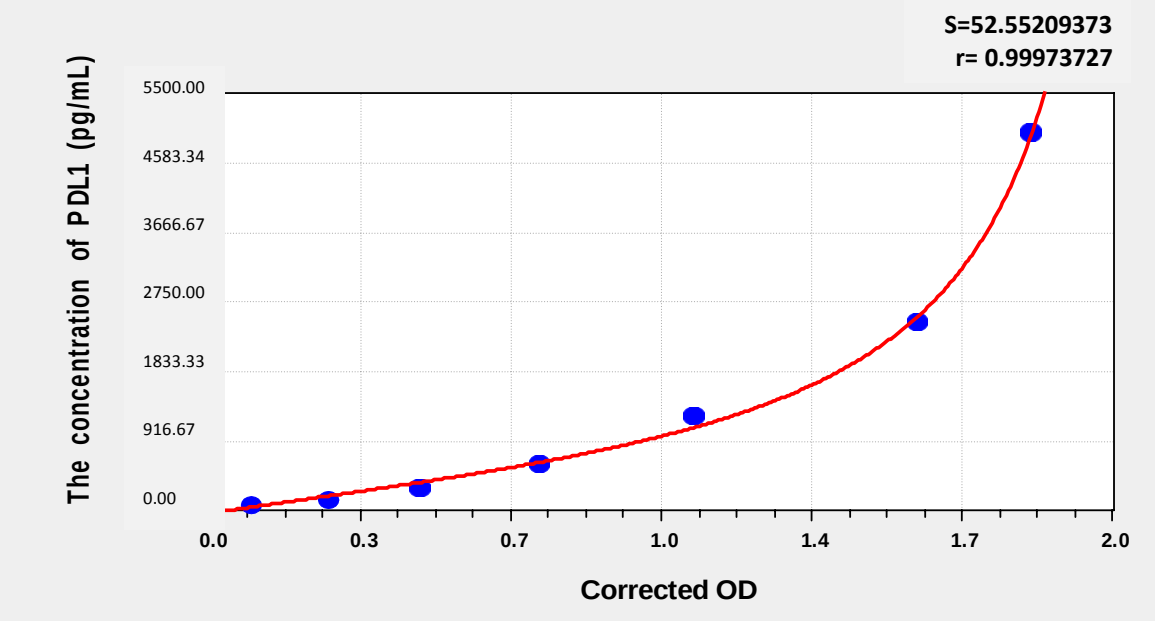
سُـجل معـدل قـراءة مكـررات كـل مـن المـواد القياسـية Standard ، السـيطرة Control والعينـات Samples وطـرح متوسـط الكثافـة الضـوئية القياسـية الصـفرية ، تـم حسـاب تركيـز العينـات بالاعتمـاد علـى المنحنـى القياسـي الـذي يمثـل العلاقـة بـين التراكيـز القياسـية للمعـايير المناعيـة قيـد الدراسـة علـى المحـور الصادي(y) والامتصاصية على المحور السيني (x) والتي تكون بشكل منحنى تزايدي كما موضح بالشكل (3-5) و(3-6) و(3-7) .



الشكل (3-5) : المنحنى القياسي لـ TLR-4



الشكل (3-6) : المنحنى القياسي لـ TNF-α



الشكل (3-7) : المنحنى القياسي لـ PDL-1

3.3 الموافقة الاخلاقية Ethical Approval

تم اجراء هذه الدراسة حسب التعليمات الرسمية الخاصة بموافقة لجنة أخلاقيات البحث ذي العدد د.ع /14 /6267 بتاريخ 12/5 /2022 من قبل لجنة أخلاقيات البحث بكلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء ، استخدمت في هذه الدراسة 41 ذكر من الجرذان البيض *Rattus rattus* تم الحصول عليها من البيت الحيواني بكلية الصيدلة / جامعة كربلاء .

4.3 التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم اجراء التحليل الاحصائي للبيانات الخاصة بتقدير مستوى تعبير المعايير المناعية باستخدام برنامج Statistical Package for Social Sciences (SPSS) الاصدار 26 ، وتم حساب قيم المعدل و الخطأ القياسي Mean ± Standard Error (SE) لقياس خمس مكررات ، إذ تم تقييم الارتباط بين المعلمات المدروسة باستخدام اختبار Anova (Tukey's pairwise) على مستوى احتمالية ($p< 0.05$) (Abu-Bader,2021) .

الفصل الرابع

النتائــج والمناقشــة

Results
and
Discussion

4 . النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4 إنتاج وتوصيف لقاح أشباح *S. Typhimurium* المُعدَّة حسب بروتوكول شبيه الاسفنج المختزل

Production and characterization of *S. Typhimurium* ghosts (STGs) vaccine of Sponge-like reduced protocol (SLRP)

تم الحصول على لقاح شبح جرثومة السالمونيلا (STGs) من العزلة الجاهزة المشخصة المعاد تنشيطها ، وذلك عن طريق اتباع بروتوكول اقل تركيز مؤثر للمواد الكيميائية وبخطوات تمكن من إزالة المحتويات السايتوبلازمية للجرثومة مع احتفاظها بالقابلية المستضدية .

1.1.4 تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز الأدنى للنمو MGC

Determination of Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Growth Concentration

تعتمد الخطوة الرئيسية لغرض إنتاج أشباح السالمونيلا المستحثة كيميائيًا (STGs)على تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز الأدنى للنمو (MGC) لمختلف المواد الكيميائية المستخدمة ، تم تحديد الـ (MIC) والـ (MGC) لكل من هيدروكسيد الصوديوم NaOH والـ SDS باستخدام طريقة التخفيف التسلسلي في المرق المغذي(NB) Serial broth dilution method ، إذ بينت نتائج الدراسة الحالية أن التركيز المثبط الأدنى والتركيز الأدنى للنمو قد بلغ (0.1) مايكروغرام / مليلتر و (0.01) مايكروغرام / مليلتر لكل من NaOH وSDS على التوالي ، و بلغ الـ (MIC) والـ (MGC) لمادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (0.03%) و(0.003٪) على التوالي ، في حين بلغ الـ (MIC) والـ (MGC) لمادة بيكاربونات الكالسيوم CaCO3 للكمية المستخدمة بقيمة +1 كانت (1.05) مايكروغرام / مليلتر بينما للقيمة -1 كانت (0.35) مايكروغرام / مليلتر . يعد هذا الاختبار من الاختبارات التحليلية المهمة لتحديد التأثير الرئيسي للمتغيرات التي أثرت بشكل ايجابي أو سلبي على جودة تحضير الأشباح البكتيرية BGs وللحصول على صورة اكثر وضوحاً حول تأثير المركبات الكيميائية المستخدمة على مكونات جدار خلية جرثومة السالمونيلا (Park, 2023;Amara *et al*.,2013a) .

2.1.4 تقييم جودة اشباح الـ STGs STGs quality evaluation

حُددت الجودة العالية لأشباح السالمونيلا بوساطة قياس تركيز كلاً من الحمض النووي DNA والبروتين المتحررمن الخلايا خلال خطوات التحضير وذلك باستخدام جهاز الطيف الضوئي (NanoDrop) عند 260 و 280 نانومتر على التوالي ، اذ أظهرت النتائج تحقق عملية تفريغ المحتوى السايتوبلازمي بصورة سليمة وصحيحة لكل من الحمض النووي والبروتين أثناء خطوات التحضير وكما هو موضح بالجدول (4-1) ، كذلك تم الاعتماد على البروتوكول المعني في الكشف عن وجود أي خلايا حية أو متحللة .

جدول (4-1) تحديد تركيز الحمض النووي والبروتين عند كل خطوة في تحضير اشباح *S. Typhimurium*

رقم التجربة	التجربة الأساسية Basic Experiment		خطوة المعاملة بـ H_2O_2		خطوة المعاملة بالايثانول		جودة الـ STGs %
	280 nm	260 nm	280 nm	260 nm	280 nm	260 nm	
	Protein µg /mL	DNA µg/mL	Protein µg /mL	DNA µg/mL	Protein µg /mL	DNA µg/mL	
I	2961.94	211.21	3535.47	278.62	3286	176.7	100
II	3452.8	387.51	3765.43	495.76	3221	288.6	95

بينت نتائج الدراسة الحالية تحقق عملية تفريغ صحيح لكل من الحمض النووي DNA وللبروتين أثناء خطوات التحضير ، وسجلت تراكيز عالية للبروتين المتحرر وبكمية أعلى من كمية الحمض النووي خاصة في خطوة المعاملة بمادة H_2O_2 ، وهذا ما تم إثباته من قبل الباحث(Rabea *et al.*, 2022) عند تقييمه لجودة أشباح STGs المنتجة ، إذ سجل تحرر كمية عالية من البروتينات والحمض النووي DNA والتي تبلغ 2975 مايكروغرام / مليلتر و 786 مايكروغرام / مليلتر على التوالي مقارنةً مع الخلايا غير المعالجة والتي سجلت انعدام في تحرر لأي من البروتينات والأحماض النووية ، كما اوضحت نتائج الدراسة الحالية أيضاً أن كمية الحمض النووي DNA المتحرر في التجربة الثانية عند استخدام H_2O_2 بقيمة (1-)أكبر من تلك الموجودة في التجربة الأولى (1+) ، إذ بلغت 495.76 و 278.62 مايكروغرام / مليلتر ،على التوالي وكما هو موضح في الجدول (4-1) ، وتعد هذه النتيجة منطقية ، فقد بين أحد الباحثين بوساطة تجاربه أن أقل كمية من مادة H_2O_2 (1+) تؤدي إلى تراجع بعملية تحرر الحمض النووي والذي يسجل قراءة أقل عند قياسه بجهاز الطيف الضوئي (Amara *et al.*,2014) ، وتطابقت ظروف الخطوة الاولى لكلتا التجربتين للدراسة الحالية ، ماعدا في حالة المعاملة بمادة هيدروكسيد الصوديوم NaOH ، إذ تم استخدامه بقيمة (1-) لكلا التجربتين وكما يبدو في أنه يكون مسؤولاً عن تعزيز عملية تحرر الحمض النووي وتراجع بعملية تحرر البروتين ، وذكر الباحث (Al-Azawi *et al.*, 2021) ، في دراسته لتحضير أشباح بكتيريا *Brucella melitensis* وبإتباع خطوات البروتوكول المعني ، أن التعديل الطفيف في بعض الظروف التجريبية يتضح دوره على نتائج التجربة .

تعتمد فعالية المركبات الكيميائية المستخدمة في الدراسة الحالية على استخدامها بالتركيز الصحيح لضمان نجاح تحضير الـ STGs ، وتجدر الإشارة إلى أنه تم استخدام NaOH في كلتا التجربتين بقيمته (1-) ، في حين تمثل استخدام كل من الـ SDS و "معدل الاهتزاز Shaking rate ودرجة الحرارة (يستخدمان كمتغير واحد) " بذات القيمة .

تمتاز جدران خلايا جرثومة السالمونيلا بحساسيتها العالية لمادة الـ SDS المسؤولة عن زعزعة استقرار جدار الخلية والغشاء البلازمي وتكوينها للمسام (الثقوب pore)، في حين تضمن المعاملة بمادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 عن تحليل وتدمير لأي حمض نووي متبقي (Amara and El-Baky, 2022) ، وعليه أطلق اسم Sponge -like على البروتوكول المعني إذ ساهمت المركبات الكيميائية على إحداث مسام دقيقة في الخلايا البكتيرية أثناء خطوات تحضير أشباح السالمونيلا STGs ، إذ تم الضغط على الخلايا برفق مثل الإسفنج لإطلاق محتواها دون تشويه بنيتها ثلاثية الأبعاد ، وهو الحدث الأكثر أهمية ، وتمت مراقبة الخطوات باستخدام المجهر الضوئي .

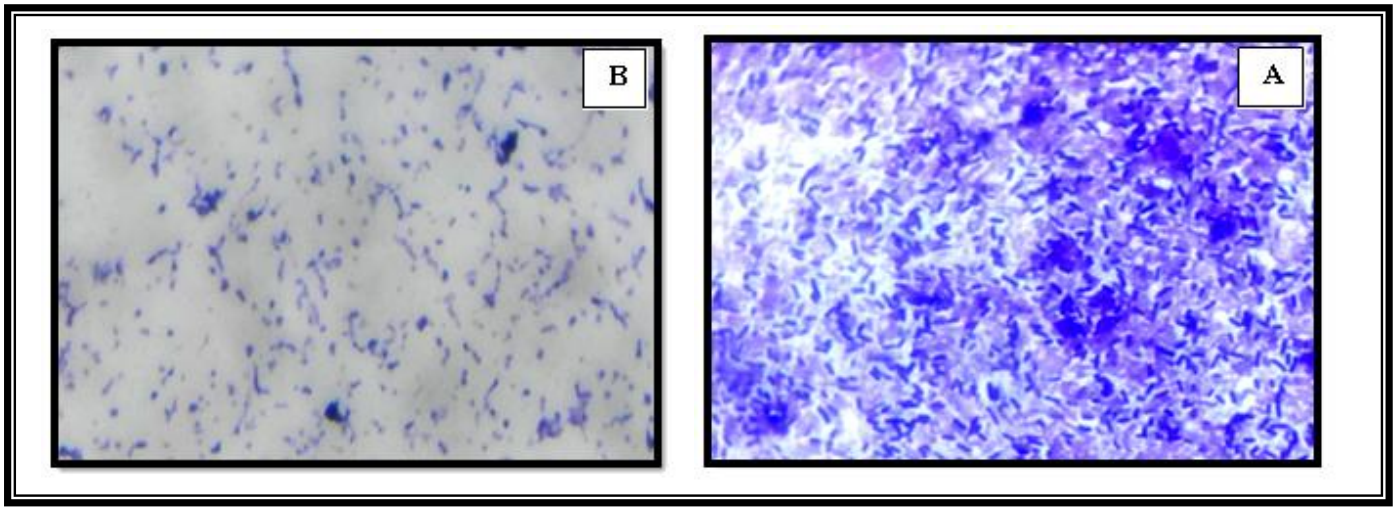
الفكرة الأساسية وراء هذه التقنية هي تطبيق طريقة بسيطة لإعداد الأشباح البكتيرية BGs عن طريق استخدام تراكيز حرجة لمركبات كيميائية نشطة تم اختيارها و استخدامها أما بصورة مفردة أو مشتركة بتركيبة دقيقة (لضمان منع التفاعلات المتبادلة) ، وكذلك اشتملت الطريقة على عدة خطوات من الغسل والطرد المركزي واطئ السرعة (يمكّن الضغط الدقيق على الخلايا) لضمان الازالة الكاملة لمحتويات الخلية السايتوبلازمية من الحمض النووي والبروتين، وبخطوة مهمة تحدد حيوية الخلايا من عدمها بالاعتماد على تحديد تراكيز الـ MIC وMGC ، أحدهما مسؤول عن موت الخلايا ، بينما الآخر مسؤول عن تحديد وتقييد التأثير المميت للمواد الكيميائية المستخدمة بأدنى تركيز ليسمح ببقاء الخلايا محتفظة بحيويتها ، تم تحديد MIC وMGC للمواد NaOH وH_2O_2 وSDS (Amara *et al*., 2014; Amara *et al*., 2013a) .

اشارت العديد من الدراسات إلى الدور المهم من استخدام بروتوكول التراكيز الحرجة لبعض المركبات الكيميائية النشطة المختارة لإخلاء أي نوع من الخلايا وتحويلها إلى خلايا فارغة ، فهو قادر على إنتاج خلايا الأشباح من مجموعة متنوعة من الكائنات الحية ، كبدائية النواة مثل البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Amara , 2023) ، البكتريا المغلفة بالكبسولة ، البكتريا المنتجة للابواغ ،الفيروسات ، فضلا عن الخلايا حقيقية النواة ، وقد اكتسب هذا البروتوكول قبولًا واسع النطاق نظراً لقلة تكلفته وموثوقيته وتعدد استخداماته مع مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة (Sheweita *et al*.,2022 ; Ji *et al*.,2022 ; Dentovskaya *et al*.,2021 ; El-Baky *et al*.,2021) .

أستخدم البروتوكول الأولي المطوّل المسمى بتصميم Plackett-Burman (طريقة التوزيع العشوائي وتحقيق الحالة المثلى Optimization) بالاعتماد على برنامج يحدد الكميات المناسبة التي يجب استخدامها والظروف المثلى عند تحضير BGs (Plackett and Burman,1946) ، ووفقاً لهذا البروتوكول ، توزع المتغيرات التي تدعم استخدام MIC كقيمة (+1) وMGC كقيمة (-1) (Amara,2011).

3.1.4 اختبارات الكشف وتقييم جودة أشباح الـ STGs
Identification tests and quality evaluation of STGs
1.3.1.4 المجهر الضوئي Light microscope

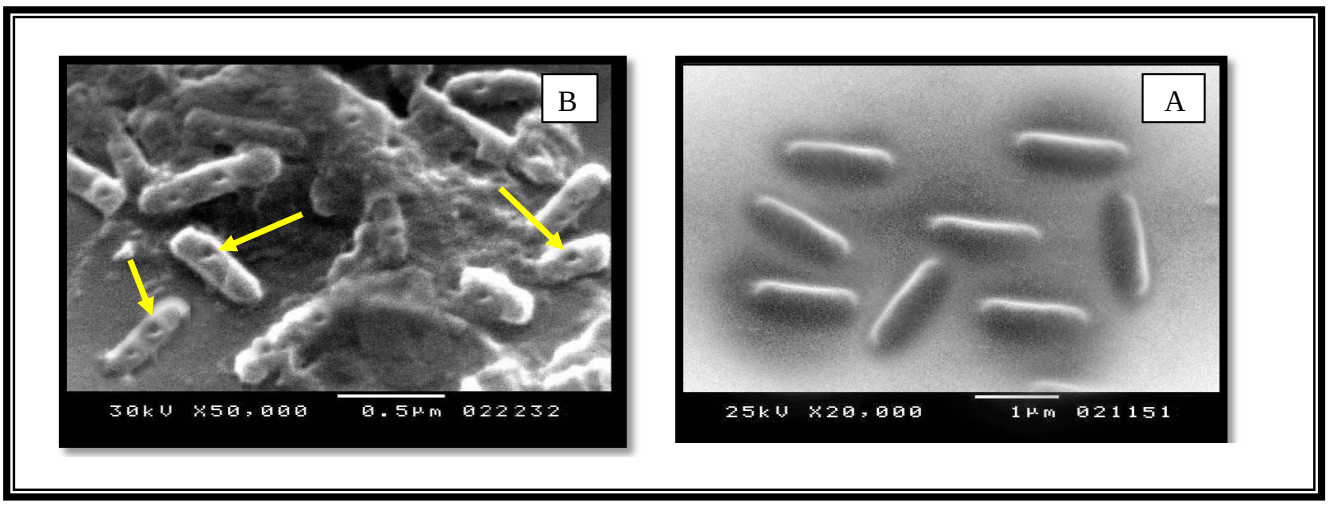
تم تحديد جودة الخلايا لكل تجربة باستخدام المجهر الضوئي ، إذ أظهرت خلايا STG جودة شبح بكتيرية عالية Bacterial Ghost Quality(BGQ) بعد صبغها بصبغة البنفسج البلوري وفحصها تحت المجهر كما توضحه الصورة (4-1).



صورة (4-1) الخلايا الحية لـ *S. Typhimurium* (A) ، وأشباح *S. Typhimurium* (B) تحت المجهر الضوئي تظهر فيها احتفاظها ببنيتها ثلاثية الابعاد السليمة (صبغة البنفسج البلوري ، قوة التكبير 100x).

2.3.1.4 المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron microscope (SEM)

تم استخدام المجهر الإلكتروني الماسح للتحقق من سلامة خلايا STGs ، وهي خطوة إضافية لدراسة جودة الشبح البكتيري (BGQ) ، وتوضح الصورة (4-2) أن الخلايا الشبحية لـ *S. Typhimurium* تحتوي على أغلفة خارجية سليمة ونفق غشائي واحد على الأقل بهيئة مسام صغيرة جدًا مسؤولة عن إخلاء الخلايا من محتوياتها من الجزيئات الكبيرة ، إذ كانت الخلايا ذات جودة جيدة وحافظت على بنيتها ثلاثية الأبعاد.



صورة (4-2) المجهر الالكتروني الماسح للخلايا الحية لجرثومة *S. Typhimurium* (A) ، وأشباح (B) STGs توضح الاسهم الصفراء الانفاق عبر الغشائية trans-membrane tunnels في الـ STGs (قوة التكبيرx50000) .

أوضحت نتائج الدراسة الحالية نجاح الطريقة المستخدمة لتحضير الخلايا الشبحية لجرثومة السالمونيلا STGs ، واقترحت انعدام قابلية خلايا الـSTG على النمو والاستمرار بالبقاء حية تحت ظروف الانماء الطبيعية ، والذي ظهر جلياً بكونها تمثل شكل من أشكال الخلايا البكتيرية الفاقدة لمحتواها السايتوبلازمي ، إذ لوحظ وجود الانفاق المخترقة لغشاء سطح خلايا STG والتي كانت السبيل الوافي لإزالة البروتينات ومحتويات الحمض النووي، وتتفق هذه النتيجة مع (Rabea *et al.*, 2022) إذ تم استخدام الطريقة الكيميائية لإعداد STGs . وذكر الباحث Ma وآخرون، (2021) أن الـBGs المشتقة كيميائياً تخضع لتغيرات شكلية وبنيوية مقارنة بخلاياها البكتيرية الأصلية ، ويتم إجراء التحليل المورفولوجي لتلك الاشباح عادةً باستخدام المجهر الإلكتروني مثل المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) . في حين بين الباحث Park , (2023) إن استخدام المجهر الإلكتروني الماسح يكشف عن خصائص الـ BGs المنتجة كيميائيًا ، اذ تحتفظ بخصائص وبنية سطح الخلايا البكتيرية الأم ، بما في ذلك بروتينات الغشاء الخارجي ، عوامل الالتصاق ، والمكونات السطحية الأخرى ، مع الحفاظ على التشابه المورفولوجي .

4.1.4 تقدير السلامة والأمان Safety assessment

1.4.1.4 فحص العقامة Sterility (Viability) test

لغرض التحقق من عقامة لقاح الـ STGs المنتج ، وضمان فقدان قدرة الخلايا البكتيرية على التكاثر ومن ثم فقدان قابليتها على إحداث المرض Pathogenicity بينما لا تزال محتفظة بقابليتها التمنيعية بسبب وجود مستضداتها السطحية ، أُجري هذا الاختبار ، ولم يلاحظ أي نمو جرثومي على اطباق الاوساط الزرعية كوسط الغراء المغذي الاعتيادي و وسط غراء الماكونكي ووسط غراء SS التي زرعت عليها مسحات من الـ STGs وبعد الحضن لمدة يومين عند 37 مْ مقارنة مع النمو الجرثومي الواضح على اطباق المجموعة

الضابطة ، وهذا يدل على عدم تلوث اللقاح المحضر بالجرثومة ، جاءت هذه النتيجة مماثلة لدراسة (Amara *et al.*,2014) .

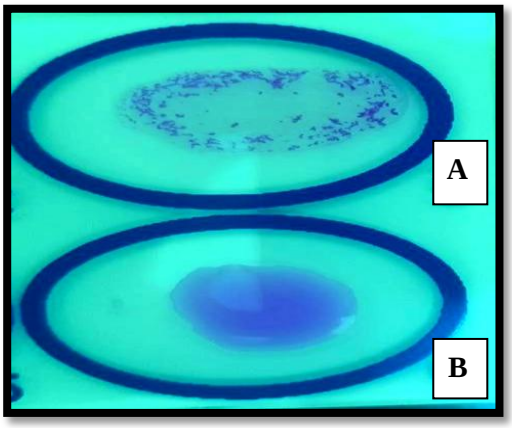
2.4.1.4 فحص السلامة Safety test

أظهرت النتائج أن استخدام لقاح STGs المحضر من بكتريا *S. Typhimurium* لم يرتبط بأي هلاك أو ظهور لأي علامات مرضية على الجرذان المحقونة به وهذا يدل على سلامة اللقاح . الشيء الذي يؤكد الدور الكبير للقاح البكتيري BGs في تحقيق السلامة المطلوبة يعزى إلى فقدان خلايا اللقاح المحضر للجزر الممرضة Pathogenic island(PI) ولـ اشرطة المقاومة ضد الجرثومية Antimicrobial resistance cassettes وبالتالي ينعدم أي انتقال لتلك العوامل الممرضة جينيا من بكتيريا لأخرى (Salem-Bekhit *et al.*, 2021) .

اثبتت الدراسة التي قام بها الباحث Rabea وآخرون ، (2022) أن لقاحات اشباح السالمونيلا *S. Typhimurium* BGs المحضرة كيميائيًا لها القدرة على حماية جميع الفئران الملقحة (معدل البقاء على قيد الحياة 100٪) بدون مواد مساعدة Adjuvant ، وفي نتائج مماثلة في دراسة Amro وآخرون، (2014) أدى تحصين الفئران عن طريق الحقن تحت الجلد بـ BGs المحضرة من بكتريا *Listeria monocytogenes* بالاعتماد على بروتوكول شبيه الإسفنج (طريقة الاستحثاث الكيميائي) إلى حماية الفئران الملقحة بنسبة 100% على عكس 0% من معدل البقاء على قيد الحياة في الحيوانات غير الملقحة ، كذلك بيّن Vinodوآخرون ،(2015) بوساطة دراسته على لقاح اشباح المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* ghost vaccine(SAGs) إن معدل بقاء مجموعة الحيوانات التي تم تطعيمها عن طريق الوريد على قيد الحياة بلغ 100% ، بينما بلغ حوالي 60% في المجموعة غير الملقحة .

5.1.4 فحص التلازن Agglutination test

اعتماداً على النتائج التي تم التوصل إليها وبعد التأكد من جودة تحضير الأشباح البكتيرية (BGQ)، لإكمال خطوات الدراسة ولغرض تحديد سلامة المستضد السطحي للـ STGs عن طريق تفاعله مع الأجسام المضادة الخاصة به ، تم إجراء اختبار القابلية التلازنية (Agglutination) لخلايا جرثومة *S. Typhimurium* والـ STGs (المحضرة من تجارب البروتوكول المعني) باستخدام اختبار التلازن على الشريحة Rapid Slide test وباستخدام مصول مضادة قياسية مجهزة من شركة (Mediaclone)، بينت نتائج الدراسة الحالية أن التلازن ظهر جلياً عند استخدام الاضداد القياسية مع خلايا جرثومة *S. Typhimurium* والـ STGs المحضرة ، فكانت نتيجة التلازن موجبة على الشريحة الزجاجية بوساطة وجود التجمع الحبيبي ، في حين انعدمت القدرة التلازنية في مجموعة السيطرة السالبة وكما هو موضح في الصورة (4-3) ، أن ظهور التلازن هو اثبات لوجود مستضدات سطحية سليمة على سطح الـ STGs المحضرة باستخدام البروتوكول المعني .



صورة (4-3) تفاعل التلازن لـ BGs المحضرة من *S. Typhimurium* (A) ، السيطرة السالبة (B)

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة الباحث Amara وآخرون، (2014) في دراسة له لبروتوكول شبيه الإسفنج المختزل ، و بالاعتماد عليه تم تحويل جرثومة *S. Typhimurium* إلى BGs ثم اعطيت عن طريق الفم للفئران المختبرية ، أظهرت النتائج ان مصل المجموعة التي تم تطعيمها عن طريق الفم سجلت حصول تفاعلات تراص بين المستضد O و H ضد الأجسام المضادة ، وبذلك أكد سلامة بنية غلاف خلايا لقاح السالمونيلا المحضر والذي قد يحمي ضد عدوى السالمونيلا الحية .

6.1.4 مجاميع الدراسة

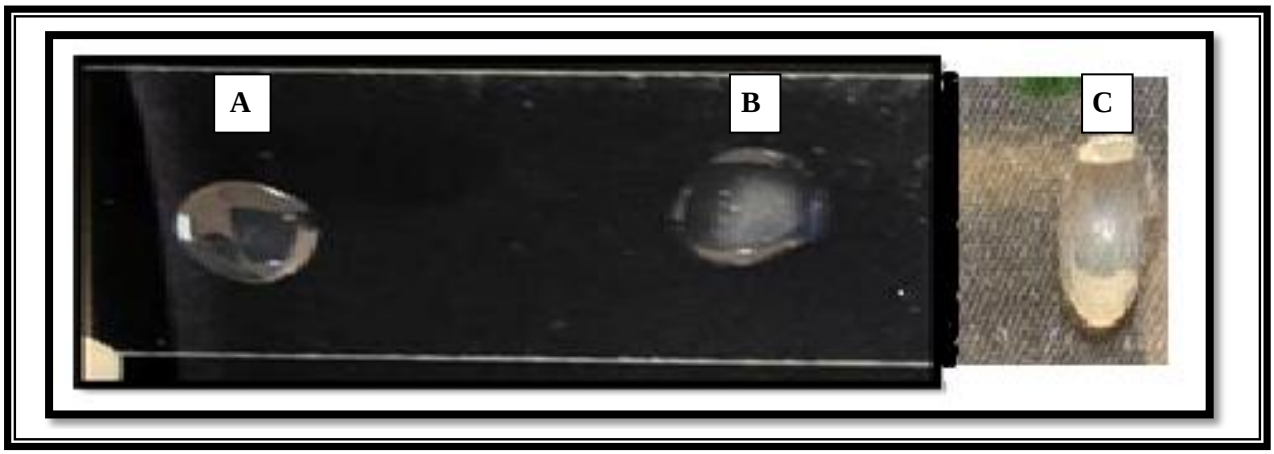
1.6.1.4 البروتوكول التجريبي للتلقيح بـ STGs Experimental protocol for vaccination withSTGs

بعد أن أُقحت حيوانات التجربة بلقاح STGs وبعد جمع المصل من كل حيوان قبل كل جرعة لقاح وبعد انتهاء برنامج التلقيح بعد مدة (14 و28 و 42) يوم ، إذ تم قياس قدرة الأجسام المضادة الموجودة في المصل على التفاعل مع مستضد الجرثومة الحية باستخدام اختبار القدرة التلازنية والذي يوضحه الجدول (4-2)، واظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نتيجة التلازن الموجبة على الشريحة الزجاجية كانت من خلال وجود التضبب الحبيبي الحليبي اللون كما هو موضح بالصورة (4-4) ، إذ أن جميع اختبارات مجموعة التلقيح تحت الجلد اعطت تلازناً واضحاً لتفاعل الجسم المضاد مع المستضد بعد المعاملة بلقاح STGs (تكتل خلال دقيقة واحدة) ، بالمقارنة مع اختبارات مجموعة التلقيح الفموي إذ اظهرت قدرة تلازنية ضعيفة مع المصل بعد المعاملة بلقاح STGs وفي الفترات قبل المعالجة الثالثة وبعد انتهاء برنامج التطعيم (28 و42) يوم ، على التوالي ، في حين انعدمت القدرة التلازنية مع المصل في مجموعة السيطرة Control والتي تم معاملتها مع محلول الملح الفسلجي Normal salin .

جدول (4-2) نتائج اختبار التلازن لمجاميع الامصال المعاملة مع جرثومة *S. Typhimurium* الحية قبل وخلال برنامج التلقيح بلقاح STGs

المجاميع Groups	وقت اختبار التلازن Agglutination test time	النتائج Results
مجموعة السيطرة Control	قبل المعاملة الاولى (صفر) يوم	-
	قبل المعاملة الثانية (14) يوم	-
	قبل المعاملة الثالثة (28) يوم	-
	بعد نهاية التلقيح (42) يوم	-
مجموعة التلقيح فموياً Orally	قبل المعاملة الاولى (صفر) يوم	-
	قبل المعاملة الثانية (14) يوم	+
	قبل المعاملة الثالثة (28) يوم	+*
	بعد نهاية التلقيح (42) يوم	+*
مجموعة التلقيح تحت الجلد SC	قبل المعاملة الاولى (صفر) يوم	-
	قبل المعاملة الثانية (14) يوم	+
	قبل المعاملة الثالثة (28) يوم	+
	بعد نهاية التلقيح (42) يوم	+

*تلازن ضعيف



صورة (4-4)اختبار التلازن في المصل للبروتوكول التجريبي للتلقيح بلقاح STGs (A) السيطرة السالبة (B)، التلقيح تحت الجلد SC ، (C) التلقيح الفموي Orally

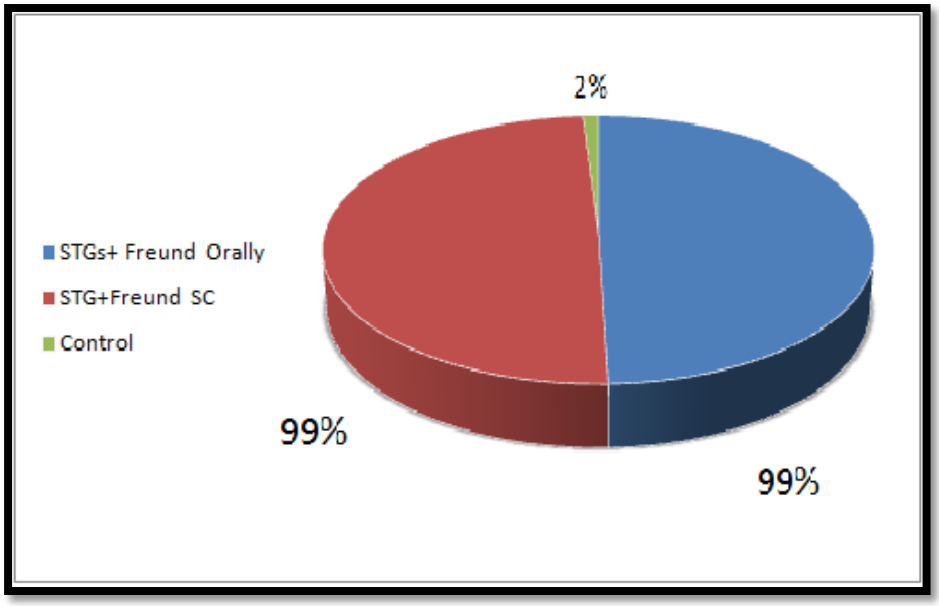
بينت التجارب التي قام بها الباحث Rabea وآخرون ، (2022) ان لقاح اشباح الـ *S. Typhimurium* BGs المحضر كيميائيًا له القدرة على تحفيز استجابات مناعية خلطية وخلوية عند اعطائه تحت الجلد Subcutaneous ، كذلك فسر الباحث إن سبب حصول الاستجابة المناعية البسيطة أو المنخفضة للقاح BG المعطى عن طريق الفم إلى اليات الهضم المعدي المعوي بالإضافة إلى الارتجاع المتعمد المحتمل من قبل الحيوان نفسه . كذلك وضحت دراسة أخرى أن أعلى مستويات نشاط للأجسام المضادة IgG ونشاط

مبيد للبكتيريا Bactericidal activity في المصل قد سُجلت في مجموعة الحيوانات التي تم تلقيحها تحت الجلد subcutaneous بلقاح (SAGs) *Staphylococcus aureus* ghost vaccine ، تليها المجموعة التي تم تلقيحها عن طريق الوريد Intravenous ، ثم أخيراً المجموعة التي تم تطعيمها عن طريق الفم Orally ، كذلك تنشطت نسبة عالية من الخلايا التائية $CD4^+$ و $CD8^+$ في المجاميع التي لُقحت تحت الجلد ثم عن طريق الوريد ثم عن طريق الفم (Vinod *et al*., 2015) . وذكر Lalsiamthara وآخرون (2018)، أن الفعالية المستضدية للقاح السالمونيلا تكون أكثر تأثير عند توصيله داخل الصفاق Intraperitoneally، يليه عن طريق الحقن العضلي Intramuscularly ، بينما التوصيل عن طريق الفم يكون الأقل فعالية .

وقد اظهرت نتائج اختبار التلازن للأجسام المضادة في الامصال المناعية المعاملة مع جرثومة الـ *S. Typhimurium* الحية قبل وخلال برنامج التطعيم بلقاح STGs للدراسة الحالية أن مستوى الاجسام المضادة كان مرتفعاً وهذا يشير الى الاستجابة المناعية العالية من الحيوانات المحقونة بالمستضدات ومن ثم انتاجها للأجسام المضادة بهذا المعيار المرتفع مما يدل على أن مستضدات الجرثومة قيد الدراسة هي محفزات مناعية جيدة من حيث تنشيطها للجهاز المناعي وتعديل الاستجابة المناعية على مستويات متعددة .

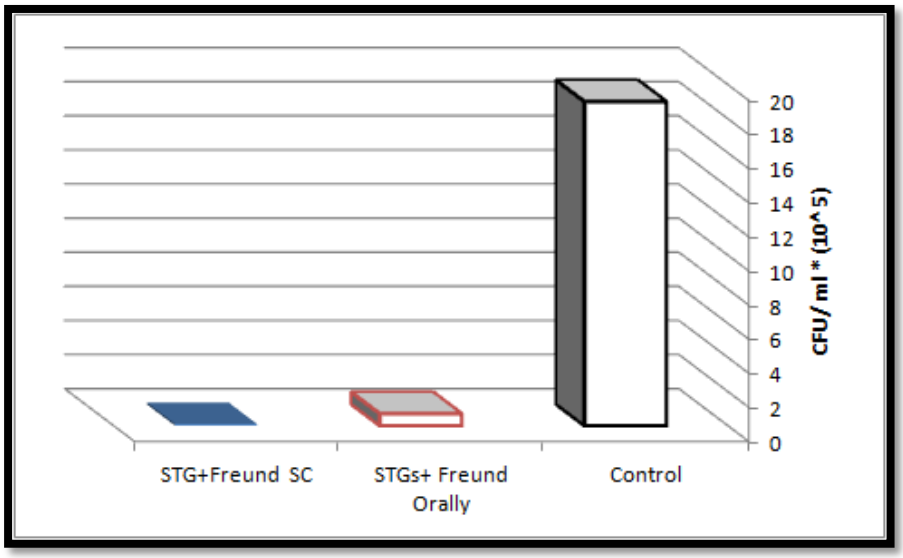
2.6.1.4 تأثير اللقاح على القابلية الاجتياحية لجرثومة *S. Typhimurium* (تجربة التحدي البكتيري)
Effect of vaccine on the invasiveness of *S. Typhimurium* (Bacterial Challenge test)

لغرض تحديد فاعلية وتأثير اللقاح من الناحية المناعية ضد جرثومة *S. Typhimurium* المرضية ، تم حقن جميع جرذان مجاميع التجربة تحت الجلد ببكتيريا *S. Typhimurium* الضارة بتركيز (1×10^8 خلية /مليلتر) في الفترة من بعد اسبوعين من التطعيم الاخير (الاسبوع السابع) ، إذ اظهرت النتائج بقاء الجرذان التجريبية المحقونة بالمستحضر المناعي الشبح ghost immunogenic بعد الحقن على قيد الحياة وبصحة جيدة ، بينما اظهرت أغلب حيوانات المجموعة الضابطة علامات المرض مثل فقدان الرغبة في الأكل وفقدان الوزن وضعف الحركة وهلاك بعضها في فترات مختلفة بعد الحقن ، كما هو موضح بالشكل (4-1).



الشكل (4-1) النسبة المئوية للجرذان الحية بين المجاميع الملقحة وغير الملقحة وفق تجربة التحدي البكتيري

بعد مرور أسبوع واحد على الإصابة ، اجري التعداد الكلي للـ *S. Typhimurium* في البراز ، وأظهرت مجموعة الجرذان الملقحة بلقاح الـ STGs تحت الجلد اقصى نشاط مضاد للبكتيريا ظهر جليا عند اختفاء أي نمو بكتيري للسالمونيلا على اطباق الوسط الزرعي SS الصلب الحاوية على عينات البراز ، في حين اظهرت مجموعة الجرذان الملقحة فمويا عدم قدرة اللقاح في توفير الحماية الكاملة ضد البكتيريا الممرضة إذ تعززت النتيجة بظهور نمو جرثومي للبكتيريا الحية عند اجراء التعداد الكلي البالغ ($10^5 \times 0.7$) CFU/ gram مقارنة مع التعداد البكتيري الكلي المرتفع للمجموعة الضابطة إذ بلغ ($10^6 \times 1.9$) CFU/ gram ، كما هو موضح بالشكل (4-2) .



الشكل (4-2) عدد خلايا جرثومة *S. Typhimurium* الحية في براز الجرذان بين المجاميع الملقحة المختلفة

كما أظهرت نتائج زراعة متجانس الكبد والطحال المأخوذين من المجموعة الضابطة على أطباق أجار SS وبعد فترة حضانة (24 ساعة) عند (37 مْ) ، كما هو موضح بالجدول (4-3) ، احتوائها على نمو كثيف لجرثومة *S. Typhimurium* على الوسط الزرعي المذكور ، بينما لم يظهر أي نمو بكتيري لذات البكتيريا على الاوساط الزرعية المحتوية على عينات متجانس الكبد (0) CFU/ gram ونمو ضئيل (10) CFU/ gram لعينات مزيج الطحال والمأخوذة من مجاميع التجربة الممنعة تحت الجلد بالأشباح ، وظهر نمو محدود جدا (17،6) CFU/ gram على الاوساط الزرعية المحتوية على عينات مهروس الكبد والطحال (كلا على حدة ، على التوالي) المأخوذة من مجاميع التجربة الممنعة فموياً ، والتي تم حضنها عند نفس درجة الحرارة المذكورة أعلاه (Al-Azawi *et al.*, 2021) .

جدول (4-3) الحمل الجرثومي لجرثومة *S. Typhimurium* في متجانس الكبد والطحال للجرذان الملقحة بين المجاميع المختلفة

نوع اللقاح	العدد الحي في الكبد CFU/ gram	العدد الحي في الطحال CFU/ gram
مجموعة السيطرة (N.S.)	غير قابل للعد Un countable	7×10^3
مجموعة التطعيم الفموي Orally STGs+ Freund	6	17
مجموعة الحقن تحت الجلد(SC) STGs+ Freund	0*	10

*عند مستوى معنوية $P<0.05$

تتطلب الحاجة المقرونة بالسيطرة على عدوى الانماط المصلية المختلفة لجرثومة *الـ Salmonella* والوقاية منها الى تطوير لقاحات آمنة وفعّالة ضد هذه الجرثومة ، الشيء الذي علله العديد من الباحثين بوساطة دراسة الدور الذي يلعبه كل من الخلايا البلعمية والخلايا التغصنية والتي تعد بمثابة الخلايا الرئيسية التي تصاب بالعدوى بالـ *S. Typhimurium* ، إذ تقوم هذه الخلايا المقدمة للمستضد Antigen presenting cells بنقل البكتيريا إلى الكبد والطحال ، وهما العضوان الرئيسيان لتكاثر البكتيريا ، وكلتا الخليتين مكونان أساسيان للاستجابة المناعية لعدوى *S. Typhimurium* ، إذ تتحكم الخلايا البلعمية في نمو البكتيريا في المرحلة المبكرة من العدوى وتبدأ الخلايا التغصنية بتحفيز استجابة الخلايا التائية T cell response (Zhao *et al.*, 2006)، وتوفر اللقاحات المحضرة من الأشباح البكتيرية BGs العائدة لأجناس بكتيرية ممرضة عديدة حماية مقبولة وأمينة لدى حيوانات التجربة ، وهدفت العديد من الدراسات العلمية إلى تحديد الفعالية التمنيعية للقاحات ضد ذات البكتيريا الممرضة المحضر منها اللقاح ، إذ سجلت كلا من الدراسات Sheweita وآخرون ، (2022) وBahy وآخرون ، (2023) معدلات بقاء لحيوانات التجربة بنسبة 100% بعد تجربة التحدي البكتيري ، و احتفظت الحيوانات الملقحة بكامل حيويتها بالمقارنة مع غير الملقح منها ، وفي دراسة Amara وآخرون ، (2014) عند تقييمه لجودة المستضد السطحي لأشباح

S. Typhimurium ghost المعدة وفق بروتوكول شبيه الاسفنج المختزل SLRP، أظهرت نتائج تجربة التحدي مع جرثومة *S. Typhimurium* والتي تم تقييمها بوساطة زراعة عينات لكل من براز الحيوانات و خليط الكبد المتجانس Liver homogenate بعد اختبار التحدي عدم ظهور نمو للبكتيريا المعنية ، كذلك لم يحدث هلاك لأي من الحيوانات المعالجة بـ STGs ، وهلك جرذ واحد فقط من مجموعة السيطرة (بعد حقنه بالبكتيريا الحية) بعد اختبار التحدي .

وفي دراسة Rabea وآخرون ، (2022) عند توصيفه المناعي لأشباح *S. Typhimurium* ghost المحضرة كيميائياً كلقاح مرشح ، تحقق أعلى نشاط مبيد للجراثيم Bactericidal في المصل (بنسبة إبادة 100%) في الحيوانات الممنعة تحت الجلد باللقاح البكتيري BG المتآزر مع المادة المساعدة (الشبَ Alum) ، اذ اختفت خلايا السالمونيلا من براز الجرذان الملقحة عن طريق الحقن تحت الجلد لكل من لقاح BG بصورة منفردة ولقاح BG مع الـ Alum بعد اختبار التحدي مع عوامل ضراوة جرثومة السالمونيلا الحية ، وهذا ما يتفق مع نتائج الدراسة الحالية . كما بين Park وآخرون ، (2016) أن التركيز المثبط الادنى (MIC) للقاح أشباح العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* ghosts المستحث بهيدروكسيد الصوديوم اظهر انخفاضًا كبيرًا في الحمل البكتيري الإجمالي داخل الأعضاء الداخلية (الكبد والطحال والرئتين والكلى) لجميع مجموعات الجرذان الملقحة (عن طريق الفم وتحت الجلد و الوريد) .

وأشار Vinod وآخرون ،(2014) في دراسته عن أشباح *Salmonella enteritidis* ghosts (SEGs) التي تم تحضيرها أيضًا بنفس العامل (NaOH) ، تحقق استجابة مناعية مماثلة ، اذ أظهرت جميع المجموعات الملقحة استجابات مناعية خلطية وخلوية كبيرة مقارنة بمجموعات الجرذان غير الملقحة ، فظهر أعلى تأثير مبيد للجراثيم في المصل بطريقة الحقن العضلي لـ (SEG) مع مساعد فروند Complete Freund's adjuvant تليها مجموعة الجرذان الملقحة عن طريق الفم وبالمثل ، أعطى اللقاح العضلي (SEG) مع المساعد أعلى مستويات IgG وأظهر أقل تعداد بكتيري في مهروس الأعضاء الداخلية .

يمكن أن تؤثر كلاً من الانزيمات البروتينية الحالة والحمض المعدي في جودة وكفاءة لقاح الأشباح البكتيرية BGs المعطاة فموياً مما ينعكس بدوره على مستوى الاستجابة المناعية المطلوبة (Mayr *et al.*,2005) ، ولغرض توليد مناعة وقائية ، يمكن إضافة مادة مساعدة مخاطية إلى تركيبة اللقاح لتقليل إنتاج الحمض في المعدة (Xian *et al.*,2020) ، في حين بينت الدراسات إن استخدام طريقة التطعيم عن طريق الفم له مزايا الراحة والأمان مقارنة بالحقن الوريدي ، وخاصة بالنسبة للأطفال ، ولهذا السبب استخدم العديد من الباحثين الطريقة الفموية في دراسات التلقيح (Wang & Lu, 2009 ; DiGiandomenico *et al.*,2004) .

وذكرت الدراسة Grupper وآخرون ، (2021) عن دور اللقاح فايزر في تنشيط الاستجابة الخلطية لدى المرضى الذين يخضعون لغسيل الكلى ، أن مستويات الحماية المتحققة من اللقاح لوحظت بعد حوالي 14 يوم من التلقيح وكانت بذات المستوى بغض النظر عن عمر المريض ، مما يقلل من خطر إصابة الشخص الملقح بالعدوى بعد أربعة أسابيع من الجرعة الواحدة للقاح .

أن تحصين الجرذان بلقاح STGs يمنح القدرة على توفير حماية جيدة ضد ضراوة الجرثومة *S. Typhimurium* لأنه يعزز من المستويات العالية لكل من الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية بعد تجربة التحدي البكتيري ، ومن ثم يخفض أو يمنع من شدة ضراوة هذه الجرثومة في الجرذان المحصنة بلقاح STGs مؤدياً إلى استبعادها من قبل الجهاز المناعي ، والتي في الغالب لا يتم ضبطها من قبله ، بناءاً على ذلك ، من الممكن افتراض أن دفاعات المضيف المحسّنة للجرذان الممنعة بلقاح STGs تتوسطه آليات مناعية، حيث أدت كل من الخلايا البلعمية Macrophages والعدلات Neutrophils دوراً حاسماً ومهماً في السيطرة على الممرضات الغازية Invading pathogens عن طريق عملية البلعمة Phagocytosis وإنتاج البروتينات المضادة للميكروبات (Dejager *et al.*,2010) .

وقد أظهرت تجربة التحدي عند استخدام جرعة بكتيرية حية بقدرة الحيوان على البقاء على قيد الحياة ، والتي ثبتت بوساطة قدرته على التخلص والشفاء من خلايا جرثومة السالمونيلا في عينات البراز (والتي تمثل النشاط والمسلك السليم ضد هذه الجرثومة) ، كما انعدم نمو الخلايا في عينات متجانس الكبد ، وبذلك أثبتت لقاحات STGs كفاءتها في تمنيع الجرذان وتحفيز إنتاج الأجسام المضادة الخاصة والحفاظ على مكونات المستضد السطحي السليم والبنية ثلاثية الأبعاد الصحيحة.

3.6.1.4 تحديد الفعالية الضد بكتيرية في المصل Determination of serum bactericidal activity

تم اختبار النشاط المبيد للبكتيريا ضد *S. Typhimurium* الحية في مصل مجاميع الجرذان تحت الدراسة والذي تم جمعه من بعد اكمال برنامج التطعيم بلقاح STG ، عند مقارنة طريقة التلقيح تحت الجلد SC-vaccination مع التلقيح عن طريق الفم Orally vaccination ، لوحظ في اختبار تحدي الضراوة أن المجموعة التي تم تلقيحها بلقاح STG + SC اظهرت قدرة تمنيعية وبمستويات أعلى بشكل ملحوظ من الأجسام المضادة المبيدة للجراثيم إذ سجلت نمو قليل جداً (معدل ابادة عالي) لخلايا السالمونيلا الحية ، تليها في ارتفاع معدل الابادة لمجموعة التلقيح الفموي STG + Orally مقارنة بمجموعة السيطرة (المحلول الملحي الفسلجي N.S.) التي سجلت نمو بكتيري للسالمونيلا وبإعداد كبيرة (معدل ابادة قليل) وكما هو موضح في الجدول (4-4)، وبشكل عام ، تشير النتائج إلى أن المجموعة التي تم تلقيحها بلقاح STG زادت من الأنشطة المبيدة للبكتيريا طوال فترة التلقيح (42 يوم) (Yang *et al.*, 2013).

جدول (4-4) الفعالية الضد بكتيرية في مصل الجرذان الممنعة بلقاح STG بعد 42 يوم من التجربة

المجاميع	النمو على الوسط الزرعي CFU	معدل الابادة البكتيري
مجموعة السيطرة (.N.S)	غير قابل للعد Un countable	–
مجموعة التلقيح الفموي Orally STGs+ Freund	اقل من 30 مستعمرة	+
مجموعة الحقن تحت الجلد(SC) STGs+ Freund	اقل من 10 مستعمرات	+

في دراسة للباحث Vinod وآخرون ،(2017) بينت إحدى نتائجه الخاصة بتحديد الفعالية ضد البكتيرية في المصل للقاح STGs المحضر بطريقة الاستحثاث الكيميائي عند مقارنته مع اللقاح المحضر بطريقة قتل الخلايا بالفورمالين(FKC) Formalin-killed inactivated cells ، لوحظ حدوث تحفيز كبير للأجسام المضادة المبيدة للبكتيريا في المصل عند تعريض الحيوانات الملقحة بلقاح STGs إلى جرثومة *S. Typhimurium* مقارنة بالحيوانات الملقحة بـ FKC او بدارئ الفوسفات الملحي PBS ، بالإضافة الى ذلك ، اشارت نتائج دراسته إلى أن التلقيح بلقاح STG يحفز مناعة وقائية قوية في تجارب المواجهة مع كل من السلالات *S. Typhimurium* و *S. enteritidis* .

على الرغم من أن مستويات الأجسام المضادة تتضاءل عادةً بعد التطعيم أو العدوى ، في المقابل فإن استجابات الأجسام المضادة الوظيفية يمكن الحفاظ عليها وتعزيزها بمرور الوقت ، وتعتمد الحماية من الإصابة الثانوية re-infection بالبكتيريا السالبة لصبغة جرام على ارتباط الأجسام المضادة بسطح الخلية البكتيرية ، وتحتوي جميع اللقاحات البشرية المرخصة على مستضدات سطح الخلية أو مستضدات مفرزة ، في حالة عدم وجود متعدد السكريد الكبسولي ، فإن المكون الفرعي(O-antigen) من متعدد السكريد الدهني (LPS) المؤثر مناعياً هو الهدف الرئيسي للأجسام المضادة التي تمنح حماية خاصة للنمط المصلي ضد العدوى (Zhu *et al*.,2021 ; MacLennan *et al*.,2022) .

إن قابلية لقاح الأشباح البكتيرية BGs على تحفيز الاستجابة المناعية الخلطية المحددة يعتمد بصورة اساسية على احتفاظه بجميع المستضدات ذات الصلة الموجودة في البكتيريا الحية ، الشيء الذي فسر سبب تمييزها والتهامها من قبل الخلايا البلعمية في الحيوانات الممنعة ، كما إن قدرة أي لقاح على تحفيز الاستجابة المناعية الوقائية يعزى الى تحقق عاملين رئيسيين ، أولهما التقديم الكفء للمحددات المستضدية Antigenic Epitopes من جهة وثانياً القدرة على رفع التحفيز المناعي المطلوب إلى الدرجة المرضية من جهة اخرى (Melssen *et al*. 2019) .

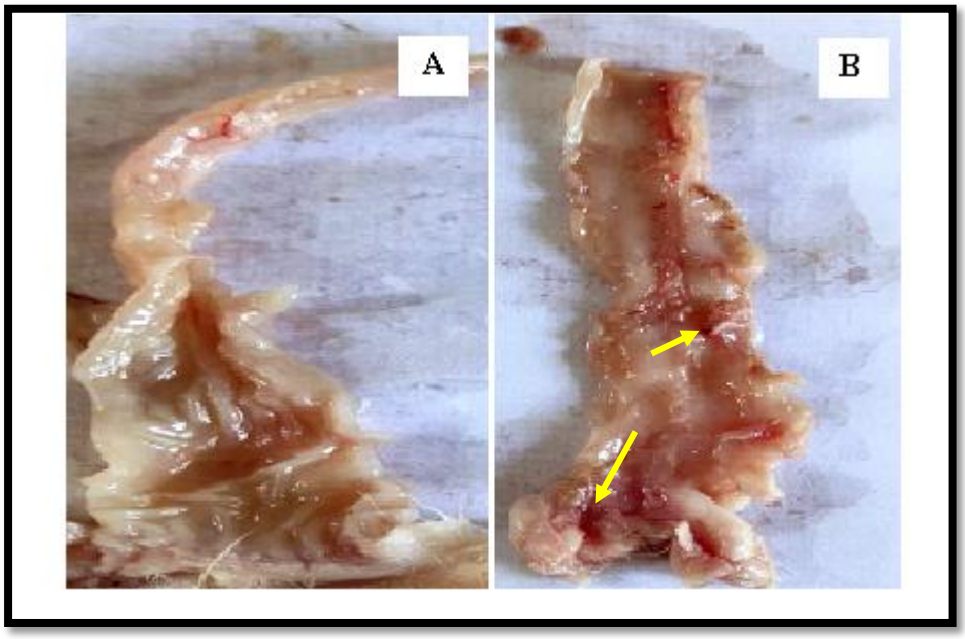
2.4 تأثير اختبارات التداخل بين التلقيح بـ STGs والخلايا الحية لجرثومة *S. Typhimurium* على سرطان القولون المستحث في الجرذ الابيض باستخدام مادة الـ AOM

Effect of interference tests between vaccination with STGs and live cells of *S. Typhimurium* on colon cancer induced in albino rats using Azoxymethan

1.2.4 التغيرات العيانية والنسجية Gross & Histological changes

1.1.2.4 التغيرات في نسيج القولون والمستقيم Changes in colorectal tissue

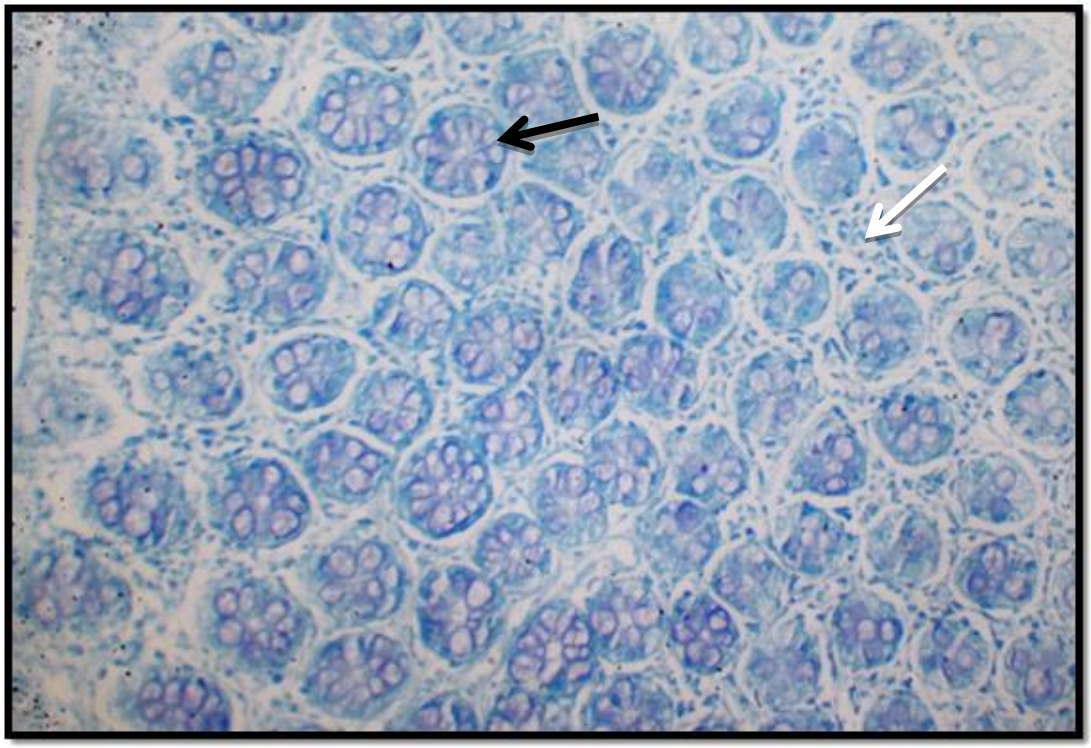
تم متابعة الحيوانات المختبرية في مجموعة السيطرة الموجبة (المجموعة الثانية)المستحث فيها سرطان القولون والمستقيم المحقونة بمادة الازوكسيميثان (AOM) ، وبعد تشريح الجرذان ، تميز المظهر العياني بحدوث تغيرات في القولون تمثلت بقصر حجمه وبفقدانه لمظهره الطبيعي لكل من الشكل واللون وتطور الملمس الخشن الواضح في بطانة القولون بالمقارنة مع الحالة الطبيعية الملاحظة بمجموعة السيطرة السالبة فضلاً عن ظهور كتلًا متعددة من السلائل (زوائد لحمية) Polypoid masses ملحوظة بالصورة (4-5) المقرون بتكوين عناقيد من الخبايا Crypts القولونية غير الطبيعية (شاذة) ، تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه كل من (Jabbar *et al*., 2023; Li *et al*., 2019) .



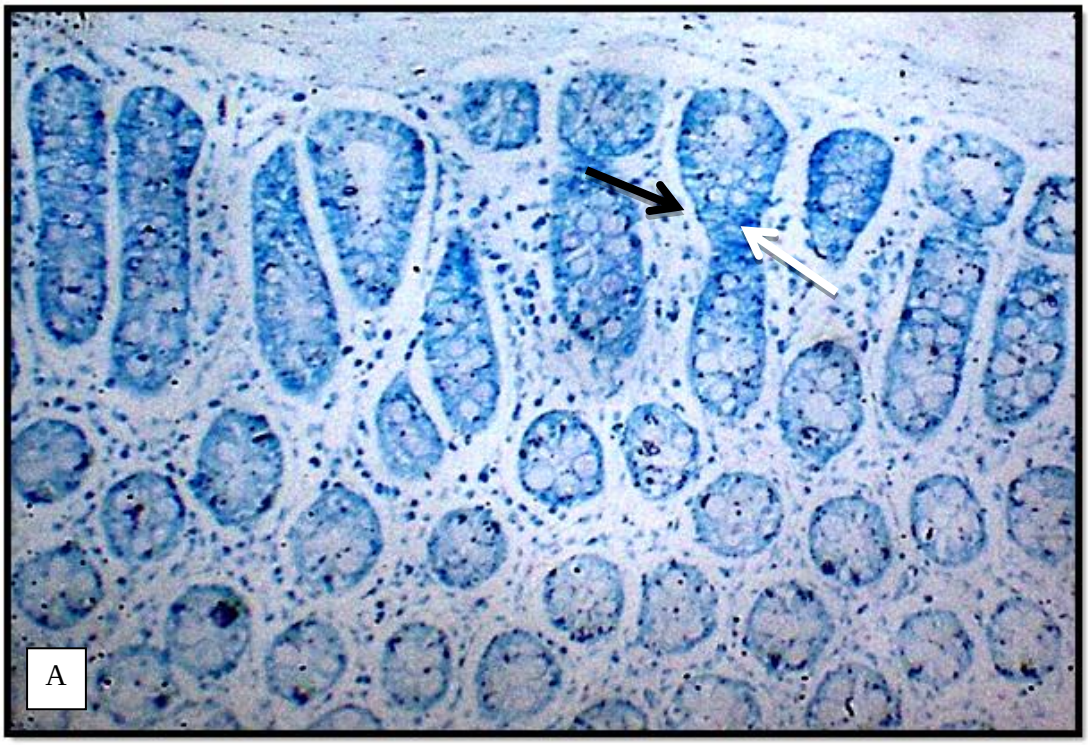
الصورة (4-5) نسيج القولون والمستقيم للجرذ مفتوح طولياً يظهر فيه (A) القولون الطبيعي لمجموعة السيطرة السالبة ، (B) مجموعة السيطرة الموجبة المستحث فيها سرطان القولون .

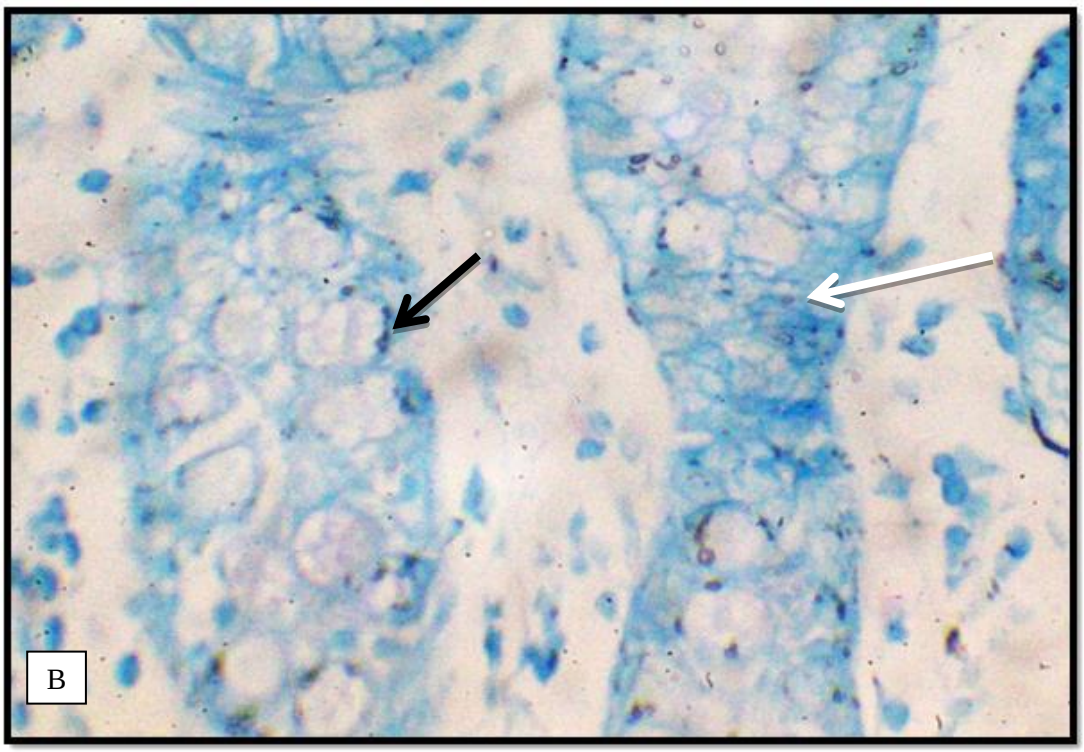
كما تم الفحص المجهري للمقاطع النسيجية لعينات قولون الجرذان باستخدام صبغة ازرق المثيلين MB لغرض تتبع ظهور بؤر الخبيء الشاذ ACF في النسيج ، إذ أظهر الفحص لعينات مجموعة السيطرة السالبة

في الصورة (4-6) امتلاكها بنية مخاطية Mucosa نسيجية طبيعية وخبايا Crypts طبيعية مع صفيحة مخصوصة Lamina propria وطبقة تحت مخاطية Sub mucosa طبيعية ، بينما الصورة (4-7) مثلت مقطع مستعرض لنسيج القولون والمستقيم لمجموعة السيطرة الموجبة لوحظ فيه ارتشاح شديد للخلايا الالتهابية بين الخبايا مع فرط تنسجي Hyperplasia ملحوظ في البؤر الغدية للطبقة المخاطية وتغيرات نسيجية في الخبايا تجلى في تكوين بؤر ACF شاذة متمثلة بكبر حجمها واستطالتها وظهور أنويه داكنة في ظهارة البؤر (فرط الصبغة Hyperchromatism) ، في حين الصورة (4-8) أظهرت مقطع مستعرض لنسيج قولون الجرذان المعاملة بلقاح STGs بعد أن تم استحثاثها بسرطان القولون لوحظ فيه تغيرات نسيجية شديدة وفرط تنسجي لمفاوي مصحوب بإرتشاح للخلايا الالتهابية .



الصورة (4-6) مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة السالبة تظهر فيه البنية النسجية ذات الخبايا الطبيعية (السهم الاسود) مع الصفيحة المخصوصة (السهم الابيض)(صبغة MB قوة التكبير 10X).

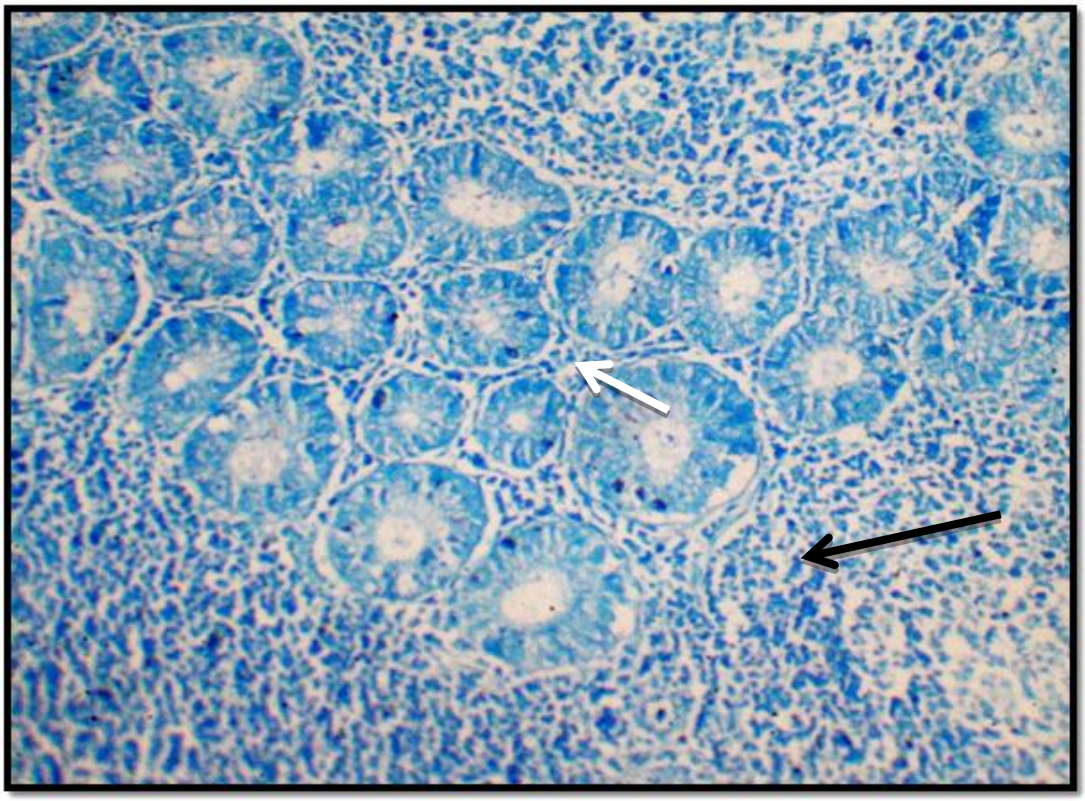




الصورة (4-7) مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة الموجبة تظهر فيه:

A- تغيرات البنية النسجية للخبايا وتكوين خبايا شاذة(السهم الابيض) مع بطانة ظهارية سميكة (السهم الاسود)(صبغة MB قوة التكبير 20X).

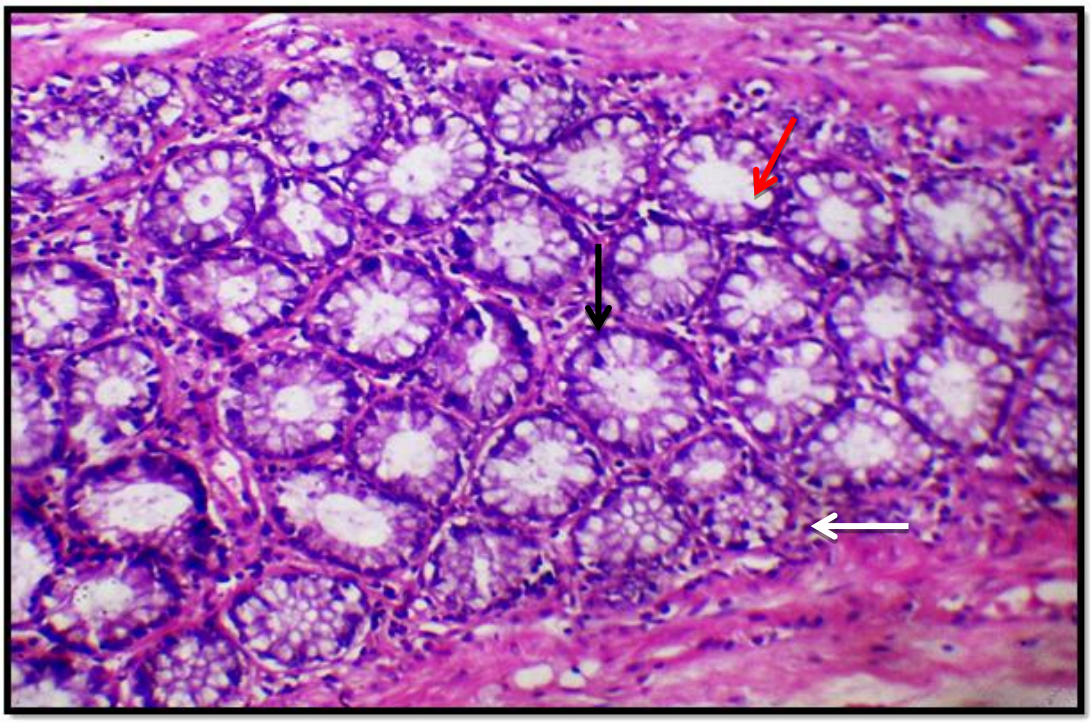
B- تغيرات البنية النسجية للخبايا وتكوين انوية داكنة في ظهارة الخبيء(السهم الاسود) مع بطانة ظهارية سميكة (السهم الابيض)(صبغة MB قوة التكبير 40X).



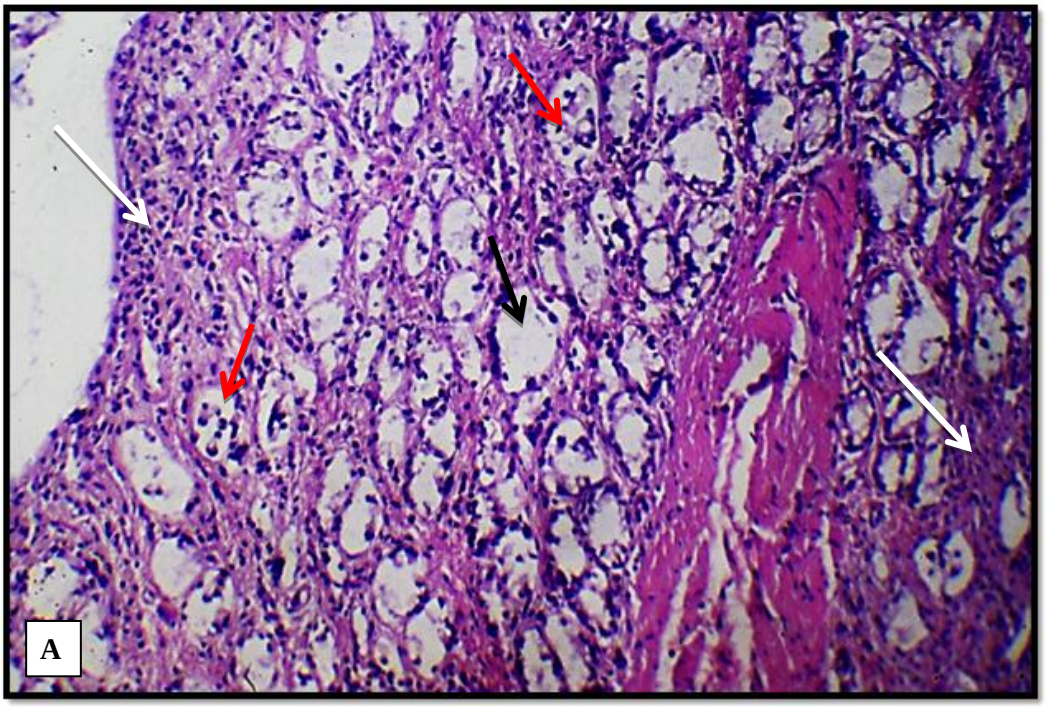
الصورة (4-8) مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة الجرذان المستحثة بسرطان القولون والمعاملة بلقاح STGs تظهر فيه تبدلات نسيجية شديدة وفرط تنسج كبير في الأنسجة الليمفاوية (السهم الأسود) مع ارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأبيض) (صبغة MB قوة التكبير 20X).

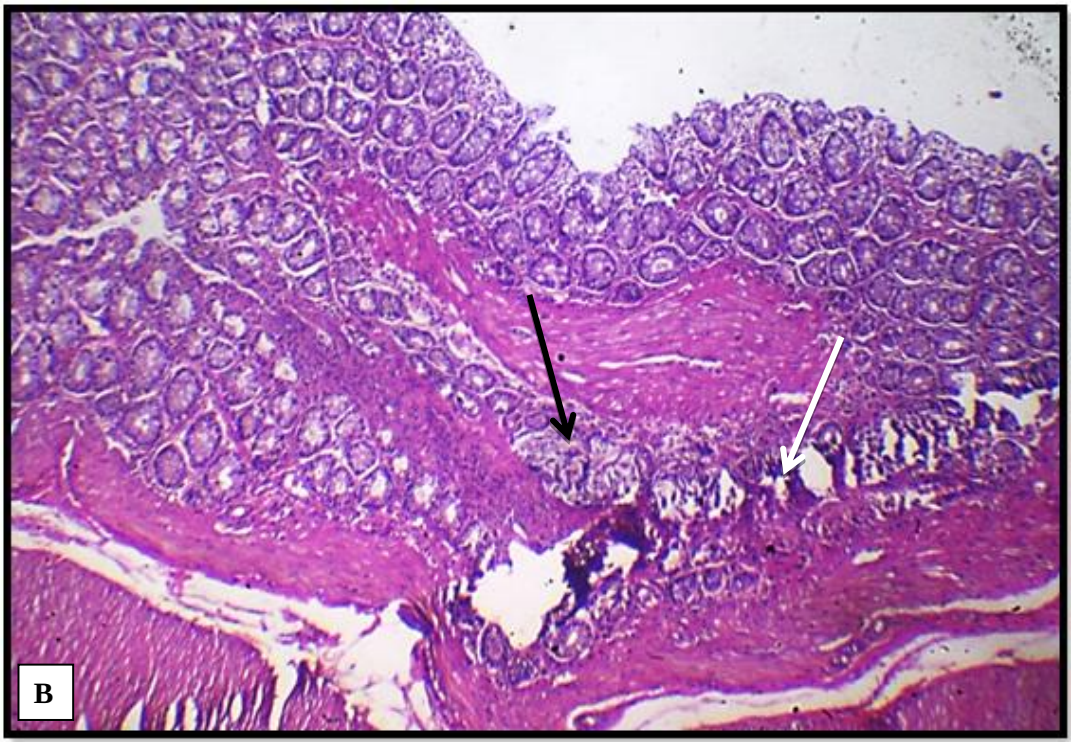
كما أُجري الفحص المجهري للمقاطع النسيجية لعينات قولون الجرذان باستخدام صبغة الايوسين والهيماتوكسلين (H & E) لغرض تتبع ظهور الالتهاب Inflammation إذ أظهرت مجموعة السيطرة السالبة في الصورة (4-9) امتلاكها بنية نسيجية منتظمة وطبيعية لكل من الطبقة المخاطية Mucosa المؤلفة من النسيج الظهاري والصفيحة المخصوصة Laminae propria والصفيحة العضلية المخاطية والخلايا الكأسية Goblet cells كذلك تميزت بوجود الخبايا ذات التجويف الواضح ، أما الصورة (4-10) تبين مقطع مستعرض لنسيج القولون لمجموعة السيطرة الموجبة ويلاحظ فيه أن الجرذان المعاملة بالـ AOM تميزت بفقدانها البنية النسيجية الطبيعية مع ظهور تغيرات فرط تنسج Hyperplastic ملحوظة (ACF) وتسنن Serration كبير في تجويف القنوات وتلف شديد في الغشاء المخاطي وتآكل Erosion كبير في البطانة الظهارية للخبايا المصحوب بتوسع ظاهر في تجويفها واستطالتها مع تغير ملحوظ في غشاءها المخاطي يتمثل في زيادة عدد الخلايا الكأسية الموجودة في اتجاهات مختلفة داخل التجويف وارتشاح شديد للخلايا الالتهابية في الصفائح المخصوصة فضلاً عن فرط تنسج الأنسجة الليمفاوية القولونية وسماكة شديدة في الصفيحة العضلية المخاطية مع تنكسها Degeneration ، في حين الصورة (4-11) تبين مقطع مستعرض لنسيج القولون لمجموعة الجرذان المستحثة بسرطان القولون والمعاملة بلقاح STGs يظهر فيه تغيرات

نسيجية شديدة للغشاء المخاطي للقولون وفرط تنسج كبير في الأنسجة الليمفاوية مع ارتشاح الخلايا الالتهابية المصحوب بتلف الظهارة وتقشرها مع تضرر في خبايا الطبقة المخاطية وتثخن الطبقة العضلية المخاطية .



الصورة (4-9) مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة السالبة تظهر فيه البنية النسجية ذات الخبايا الطبيعية المستديرة الشكل وبتجويف مميز (السهم الاسود) مع الصفيحة المخصوصة (السهم الابيض) وخلايا كأسية طبيعية(السهم الاحمر) (صبغة E&H قوة التكبير 10X).

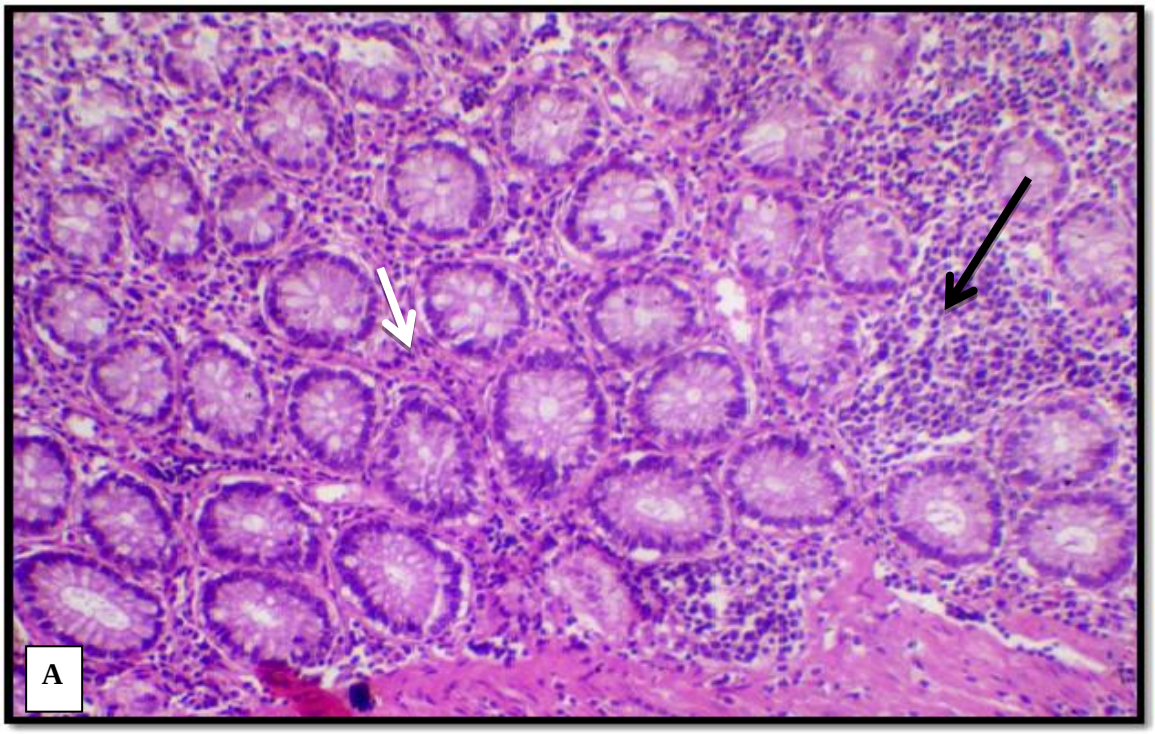


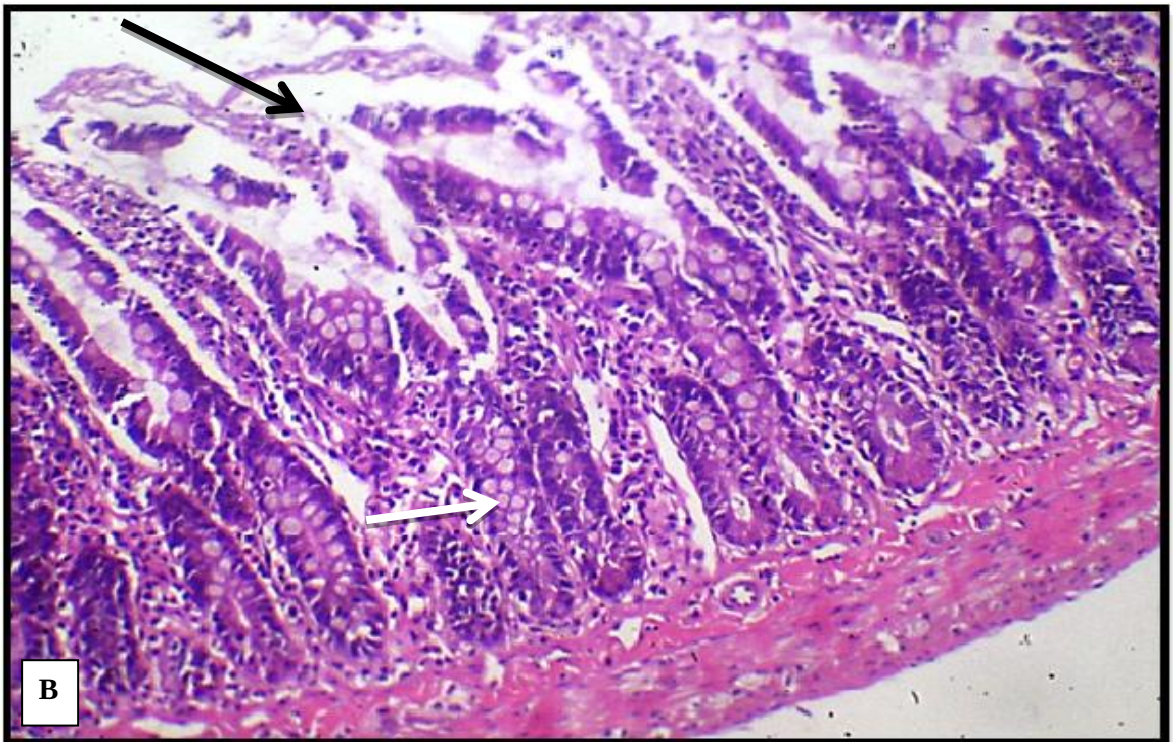


الصورة (4-10) مقطع عرضي في مخاطية نسيج القولون لمجموعة السيطرة الموجبة تظهر فيه:

A- تلف شديد في الغشاء المخاطي للخبايا يتجلى في تآكل كبير في البطانة الظهارية (السهم الأحمر) مع توسع ملحوظ في التجويف (السهم الأسود) وارتشاح شديد للخلايا الالتهابية في الصفيحة المخصوصة (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 10X).

B- تلف كبير في مخاطية الخبايا(السهم الأبيض) مع زيادة المسافات بين الخبايا (السهم الأسود)(صبغة H&E قوة التكبير 4X).





الصورة (4-11) مقطع في مخاطية نسيج القولون لمجموعة الجرذان المستحثة بسرطان القولون والمعاملة بلقاح STGs تظهر فيه:

A- فرط تنسج الأنسجة الليمفاوية (السهم الأسود)، مع ارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 20X، مقطع عرضي).

B- تلف الظهارة وتقشرها (السهم الأسود) تضرر خبايا الطبقة المخاطية (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 20X ، مقطع طولي).

بينت نتائج الفحص المجهري للمقاطع النسجية إن استحداث سرطان القولون بمادة الازوكسيميثان (AOM) قد سبب في حدوث تغيرات نسجية في بنية نسيج القولون وهذا يتفق مع نتائج دراسة Yu وآخرون، (2020) ، يعود هذا إلى الإستقلاب غير المباشر لمادة الـ AOM التي تنتهي بتكوينها لنواتج أيضية سامة للخلايا (Machado *et al.*, 2016) . الأزوكسيميثان (AOM) المستخدم في هذه الدراسة هو مادة مسرطنة قوية متخصصة للقولون Organ – specific تحفز نشوء وتطور بؤر الخبيء الشاذ (ACF) وتستخدم على نطاق واسع لدراسة أبحاث السرطان كمركب مسرطن غير مباشر وعامل تطفير جيني يسبب تبدلات ضاره في الأحماض النووية ، يتنشط في الكبد عن طريق أكسدة النيتروجين مما ينتج عنه مستقلبات تفاعلية أساسية Methylazoxymethanol(MAM) و Methyl-diazoxide تسبب الالتهاب ونشوء السرطان ، تنتقل هذه المركبات إلى القولون عن طريق مجرى الدم او الصفراء على شكل Conjugated Glucuronide ، وتتحقق السمية الخلوية بوساطة الإجهاد التأكسدي (Arango-Varela *et al.*, 2022) ، الذي يعد أحد عوامل الخطر الرئيسية للالتهابات الراجع بشكل أساسي إلى عدم انتظام إنتاج الـ ROS مما يقلل من إنزيمات مضادات الأكسدة المطلوبة للقضاء على الجذور الحرة (Abudoulrahman *et al.*, 2019) ، مؤدياً الى اضرار تأكسدية شديدة تؤدي إلى أكسدة الدهون في أنسجة القولون وخلايا الدم (Li *et al.*, 2022) ، ويعد التوافق في توليد الـ ROS أمرًا بالغ الأهمية في وظيفة الخلية ومسار موت الخلايا المبرمج ، وأي اضطراب أو نقص في تنظيمه يمكن أن يؤدي إلى تلف كبير في العضيات الخلوية مما يقلل من وظيفتها الطبيعية ويحور في التعبير الجيني والايض الخلوي وموت الخلية (Tang *et al.*, 2022) .

تتميز الآفة المرضية النسيجية ما قبل الورمية لقولون القوارض باتخاذها اشكال متنوعة يتم اللجوء اليها في تحديد مرحلة بدء تكوّن الأورام في القولون والمستقيم كمعلمات حيوية لتسرطن القولون ، وتشمل هذه الآفات البؤر الخبيثة الشاذة (ACF) والبؤر الشاذة المسطحة (flat ACF) والبؤر الخالية من المخاط Mucus-deficient foci (MDF) (Arnesen *et al.*, 2021) ، تتشكل البؤر غير الطبيعية لدى البشر وفي القوارض المعاملة بمادة الـ(AOM) وتنمو على هيئة عناقيد من الغدد غير الطبيعية الشبيهة بالأنابيب في بطانة القولون والمستقيم ، لذا استخدمت خصائص نمو هذه البؤر او الخبايا في تحديد مرحلة نشوء ومعدل تطور سرطان القولون وقد تمثل واحدة من اولى التغييرات التي يمكن رؤيتها في تطور سرطان القولون (Venning *et al.*, 2013) ، واتفقت النتائج الحالية مع دراسات عديدة توصلت الى ان هذه البؤر لا تظهر فورًا بعد إعطاء المادة الكيميائية المسببة للسرطان بل تستغرق وقتًا حيث يزداد عددها بمرور الوقت ، فوجد الباحث Li & Li ،(2003) أن ظهور البؤر غير الطبيعية سُجل بعد مرور 8 أسابيع من الحقنة الثانية بمادة الـ(AOM) بتركيز 15 مليغرام / كجرام من وزن الجرذ ، في حين وجدت الدراسة التي قام بها Gossé وآخرون،(2005) أنه بعد حقنه للجرذان المختبرية بمادة الـ(AOM) بتركيز 15 مليغرام / كجرام من وزن الجرذ ظهور البؤر الشاذة بعد مرور 6 أسابيع من الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة ، بعبارة اخرى يمكن أن يختلف معدل استحثاث المرض في القوارض بشكل كبير اعتمادًا على سلالة الحيوان وظروف السكن (التغذية ، القفص المزدحم ، التلوث) (Suzuki *et al.*, 2006 ; Johnson & Fleet ,2013) .

كما أظهرت المقاطع النسجية المأخوذة من قولون الجرذان المستحثة بسرطان القولون والمعالجة بلقاح *S. Typhimurium* ghosts (STGs) العديد من التغيرات النسيجية الشديدة تمثلت بفرط تنسج كبير في الأنسجة الليمفاوية مع تحفيز سلسلة من التفاعلات المناعية المسؤولة عن زيادة ارتشاح الخلايا الالتهابية في تلك الاعضاء، يتميز الهيكل التركيبي السليم لـ أشباح السالمونيلا (STGs) والمتمثل بغشاء الخلية البكتيرية بمكوناته المهمة مثل متعدد السكريد الشحمي (LPS) الاساسي في تنشيط وتعبئة الخلايا المناعية وإنتاج TNF-α، فضلا عن قدرة مسارات الاشارة TLR-4 في التعبير عن السايتوكينات المستحثة بواسطة السالمونيلا ، علاوة على ذلك، منع تكاثر الخلايا السرطانية بوساطة تشجيع مسار موت الخلايا المبرمج ، ومنع تكوين وتطور الأورام بوساطة تعزيز وتقوية الجهاز المناعي (Kocijancic *et al*., 2017) ، الى جانب تعزيز ودعم ارتشاح الخلايا المناعية إلى بيئة الورم مثل الخلايا الليمفاوية التائية والبائية والعدلات والخلايا القاتلة الطبيعية والبلعميات (Grille *et al*., 2014) .

تبين جلياً من خلال نتائجنا الدور الذي تلعبه البكتيريا ككائنات علاجية في التعامل مع سرطان القولون المستحدث لدى الحيوانات المختبرية ، الشيء الذي ايده العديد من الباحثين في تجاربهم ، حيث لاحظ الباحث Rasheed وآخرون، (2012) أن لخلايا ومكونات *Lactobacillus acidophilus* دور في تقليل عدد ACF والتي تعد من بين المؤشرات الحيوية التي تمت دراستها في قولون الجرذان المختبرية خلال مرحلة بدء تسرطن القولون ، فيما بيّن الباحث Lafta ،(2017) في دراسة له وفيها تم حقن فئران التجربة بخلط لقاح خلايا *S. Typhimurium* الميتة مع مادة مساعدة وأظهرت نتائج تحصين الفئران بالخليط ارتفاع مناعة الحيوان التي تحفز كلا من المناعة الخلطية والخلوية والتي يمكن مراقبتها من خلال ارتشاح الخلايا الوحيدة النواة وظهور الآفات النسيجية المرضية.

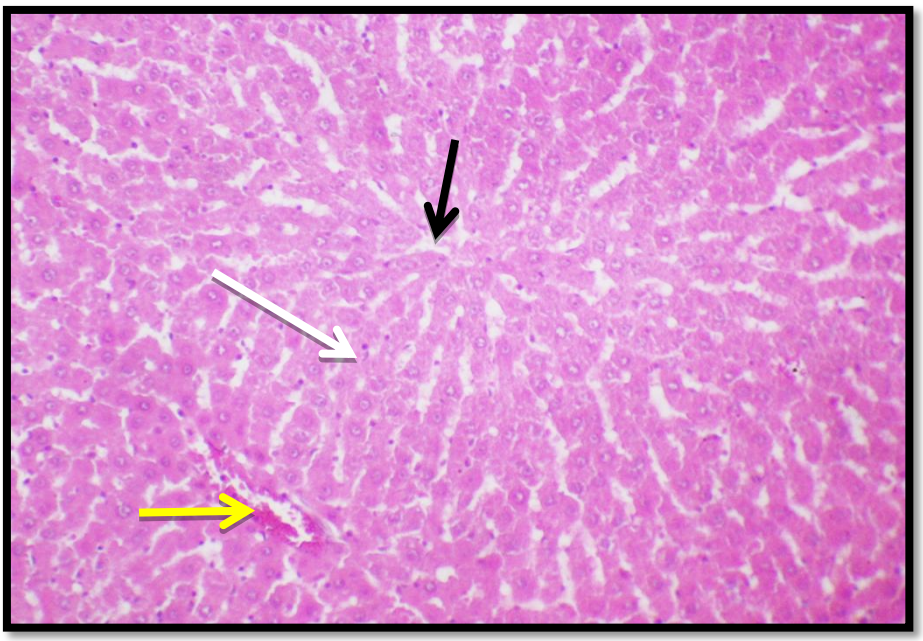
من بين العلاجات المناعية المختلفة للسرطان ، وفي دراسة للباحث Chen وآخرون،(2024) تم استخدام لقاح للسرطان معتمد على البروبيوتيك Probiotic ومصمم من بكتيريا الـ *E. coli* المضعفة والمحملة بالمستضدات الخاصة بالسرطان لغرض تعزيز المناعة المضادة للأورام عن طريق انشاء وتحفيز المناعة المدربة Trained Immunity ، وبينت نتائجه أنه بعد حقن اللقاح Ec/Ag تحت الجلد ، اظهرت المقاطع النسجية لمواقع الحقن المصبغة بصبغة الهيماتوكسيلين والإيوسين (H&E) وجود بعض الخلايا الالتهابية في المجموعة الملقحة ، وعلل سبب ذلك بأن تقوم الخلايا البلعمية في مواقع الحقن ببلعمة لقاح الـ Ec/Ag بكفاءة لتحفيز المناعة المدربة ، فتفرز الخلايا البلعمية السيتوكينات المؤيدة للالتهابات لتجنيد الخلايا الوحيدة/البلعمية ، تعمل السيتوكينات المؤيدة للالتهابات التي تفرزها الخلايا الوحيدة/البلعمية المدربة على تجنيد الخلايا المتغصنة DC بكفاءة ، و يعزز بلعمة الخلايا المتغصنة لـ Ec/Ag لنضوجها ، وبذلك تنشيطها للخلايا التائية ، ومن ثم ارتشاح الخلايا التائية إلى أنسجة الورم ذات الأهمية البالغة في تنشيط الاستجابات المناعية التكيفية .

تتمتع لقاحات السرطان بكفاءة عالية للعلاج السريري من خلال إثارة المناعة المعتمدة على الخلايا التائية ، وتظهر اهمية لقاحات السرطان في قتل الخلايا السرطانية ومنع تكرار الورم ونقائله ، التي تعتمد على

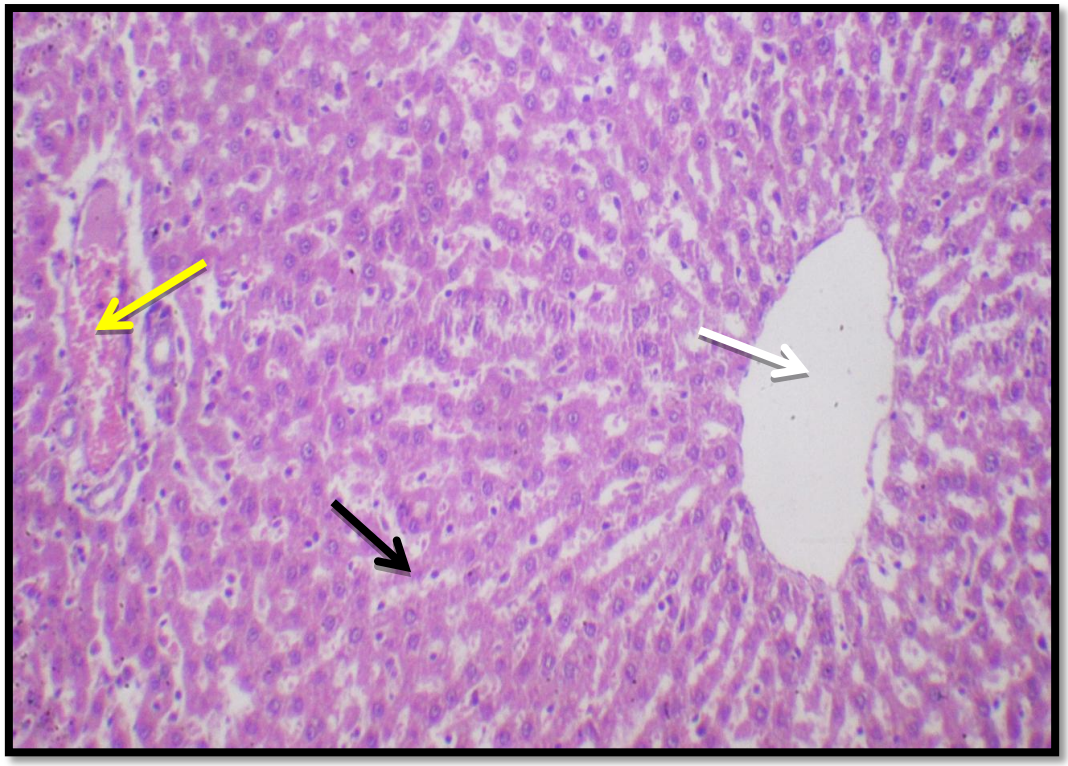
مستضدات الورم والمواد المساعدة لتعزيز عرض المستضد بواسطة الخلايا المقدمة للمستضد (APCs) وتنشيط الاستجابة المناعية التكيفية المضادة للأورام والذاكرة المناعية (Wculek *et al.*, 2020).

2.1.2.4 التغيرات في نسيج الكبد والطحال Changes in liver and spleen tissue

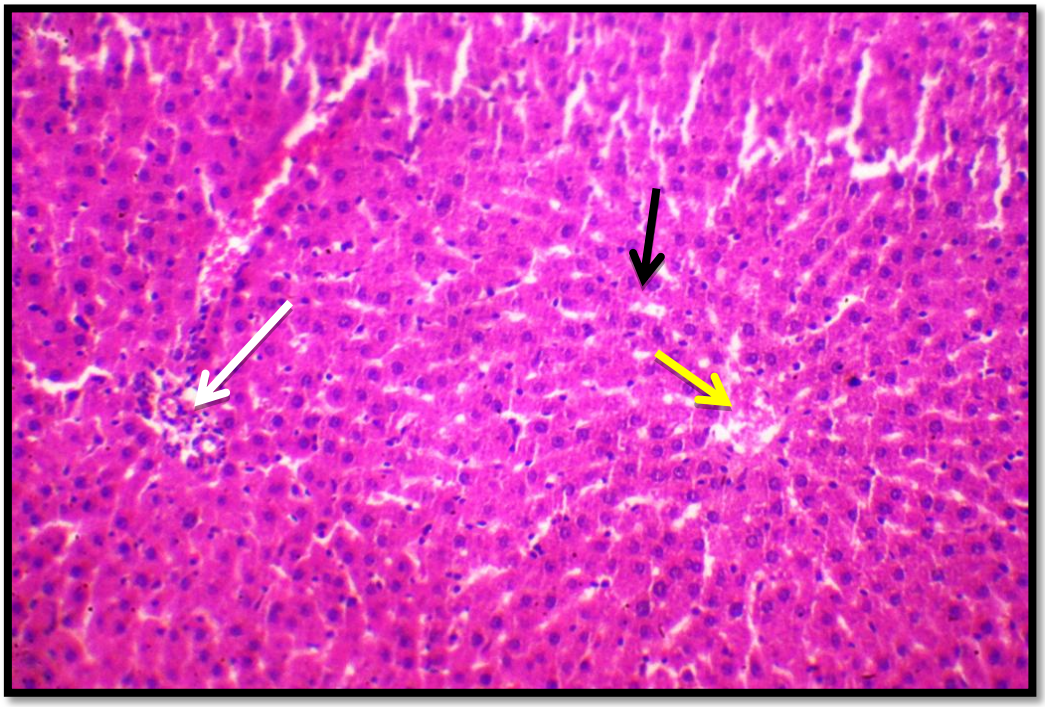
أظهرت المقاطع المستعرضة لنسيج الكبد لمجموعة السيطرة السالبة تركيب النسيج الطبيعي من الخلايا الكبدية والوريد المركزي فضلا عن الجيبانيات كما في الصورة (4-12) ، بينما لوحظ في المقطع المستعرض في كبد مجموعة السيطرة الموجبة ظهور تغيرات نسيجية تمثلت بوجود احتقان دموي في الوريد المركزي المصحوب بهجرة وارتشاح الخلايا الالتهابية في المتن الكبدي مع احتقان شديد ملحوظ في الوريد البابي (الصورة 4-13) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ، أما الصورة (4-14) مثلت مقطعاً مستعرضاً لنسيج الكبد للمجموعة الرابعة (استحثاث السرطان +اللقاح البكتيري+حقن البكتيريا الحية) اظهرت وجود احتقان دموي جيبي بسيط وتحلل لبعض الخلايا الكبدية ووجود تنخر في الخلايا الأخرى مع اختلال الحبال الكبدية وعدم انتظام الجيبانيات المصحوب بإرتشاح بعض الخلايا الالتهابية في المنطقة البوابية مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .



الصورة (4-12) مقطع مستعرض في نسيج كبد مجموعة السيطرة السالبة موضحاً فيه الخلايا الكبدية المرتبة في حبال (السهم الأبيض) حول الوريد المركزي (السهم الأسود) و الجيبانيات (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).

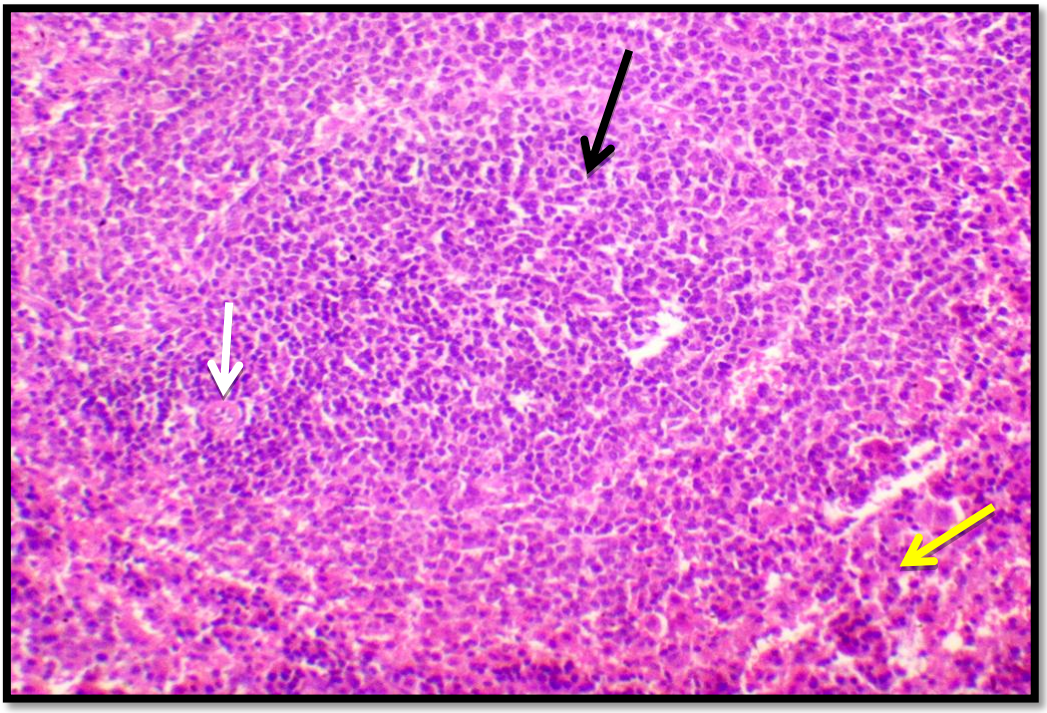


الصورة (4-13) مقطع مستعرض في نسيج كبد مجموعة السيطرة الموجبة تظهر توسعاً كبيرًا في الوريد المركزي (السهم الأبيض) وتجمع ملحوظ لارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأسود) واحتقان في الوريد البابي (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).

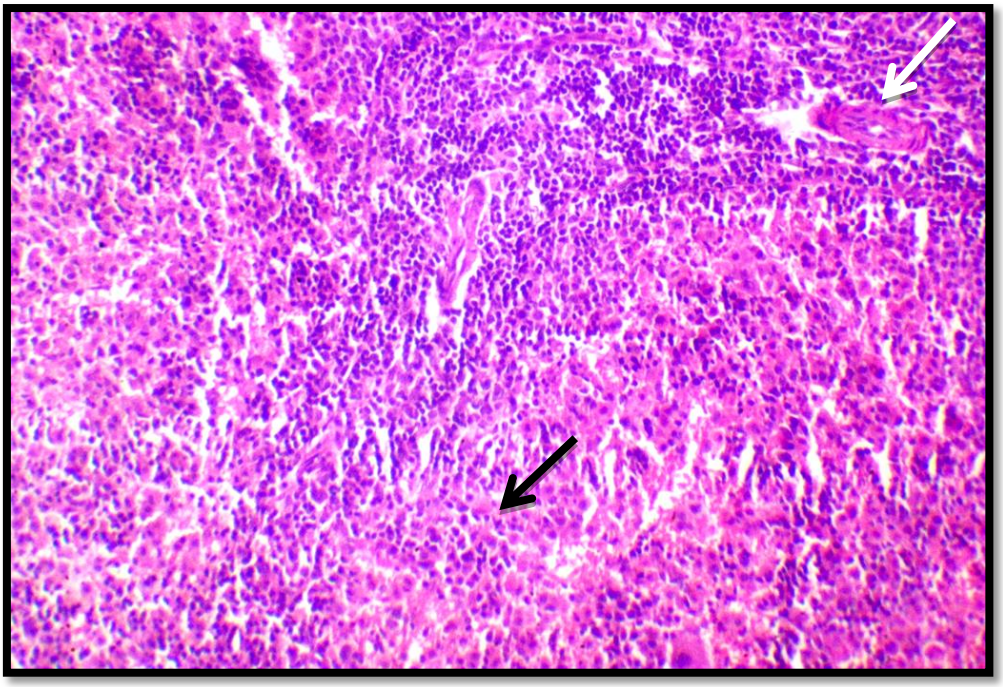


الصورة (4-14) مقطع مستعرض في نسيج كبد المجموعة الرابعة تظهر احتقان الوريد المركزي (السهم الأصفر) وارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأبيض) واختلالًا في الحبال والخلايا الكبدية (السهم الأسود) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).

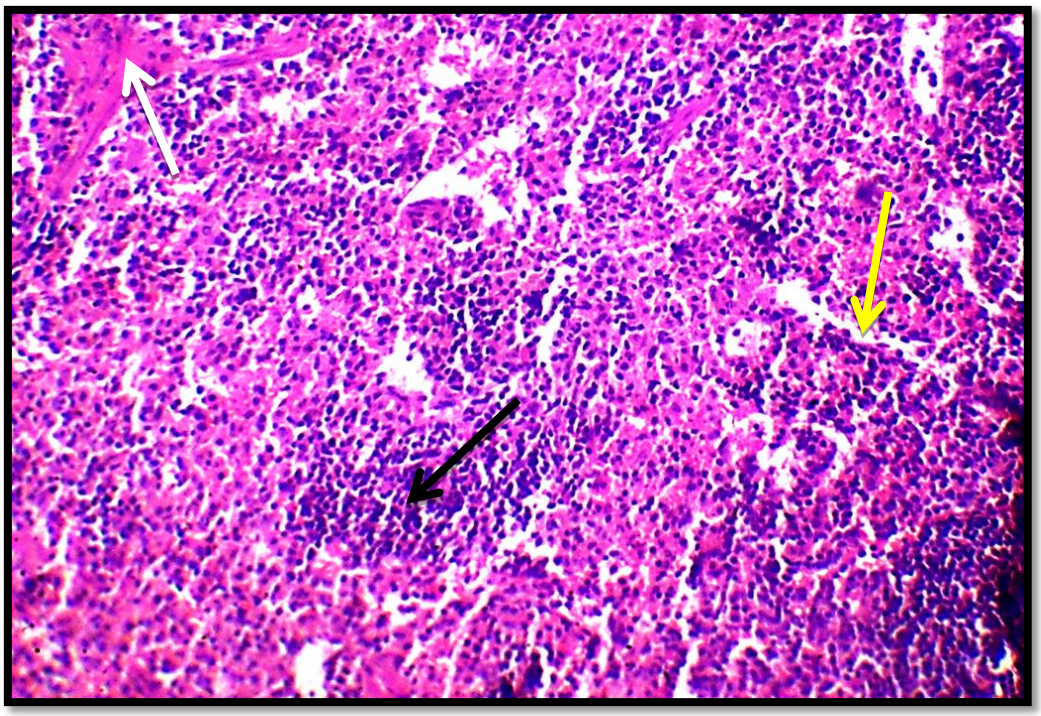
كما اوضحت الصورة (4-15) مقطع مستعرض لنسيج طحال مجموعة السيطرة السالبة إذ يُظهر وجود الجريب الليمفاوي الطبيعي(اللب الابيض) مع الشريان المركزي واللب الأحمر ، في حين تميز المقطع المستعرض لنسيج طحال مجموعة السيطرة الموجبة في الصورة (4-16) بحدوث استنزافاً Exhaustion واضحاً ونخراً في اللب الأبيض المقرون بارتشاح قوي للخلايا الالتهابية مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ، وأوضحت الصورة (4-17) مقطع مستعرض لنسيج الطحال للمجموعة الرابعة (استحداث السرطان + اللقاح البكتيري + حقن البكتيريا الحية) اظهرت وجود تجمعات صغيرة للخلايا اللمفاوية للب الابيض المتناثرة عبر اللب الاحمر يرافقه ارتشاح طفيف للخلايا الالتهابية المصحوب بتوزيع للحزم العضلية مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .



الصورة (4-15) مقطع مستعرض لنسيج طحال السيطرة السالبة يظهر فيها اللب الابيض (الجريب اللمفاوي الطبيعي) (السهم الأسود) مع الشريان المركزي (السهم الأبيض) واللب الأحمر (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).



الصورة (4-16) مقطع مستعرض لنسيج طحال مجموعة السيطرة الموجبة يظهر فيها حدوث استنزاف Exhaustion واضح وارتشاح الخلايا الالتهابية في اللب الأبيض (السهم الأسود) مع سماكة العضلات المحيطة بالشرايين (السهم الأبيض) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).



الصورة (4-17) مقطع مستعرض لنسيج طحال المجموعة الرابعة يظهر فيها حدوث تجمعات صغيرة من اللب الأبيض متناثرة عبر اللب الأحمر (السهم الأسود) مع تليّف Fibrosis (السهم الأبيض) وارتشاح خفيف للخلايا الالتهابية (السهم الأصفر) (صبغة H&E قوة التكبير 20X).

تبين النتائج وجود ترابط واضح بين ارتفاع نسبة وشدة التغيرات النسيجية المرضية لكل من كبد وطحال جرذان مجموعة التجربة الناتجة عن معاملتها بلقاح STGs مع البكتيريا الحية والمستحثة مسبقاً بسرطان القولون مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة والموجبة الشيء الذي أشار اليه العديد من الباحثين بوساطة تجاربهم حيث وضح Fan وآخرون، (2021) في دراسته عن تطوير سلالة RE88 *S. Typhimurium* التي تم توهينها بمادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لتؤدي دور الناقل للقاح السرطاني ، أشارت النتائج من الدراسة إلى أن التلقيح تحت الجلد بهذه السلالة المعطلة قد عزز تنشيط الخلايا التائية الطحالية وزاد من ارتشاح الخلايا التائية $CD4^+$ و$CD8^+$ إلى داخل أنسجة الورم ، إذ يعد هذا المسار من المسارات المهمة للقاح المعتمد على البكتيريا فتكون الخلايا التائية السامة Cytotoxic T cells هي المؤثر الأساسي للاستجابة المناعية المتخصصة بالورم بينما بعد ذلك تتوسط كل من الخلايا التائية $CD4^+$ و$CD8^+$ مرحلة الذاكرة (Stern *et al.*, 2015) .

في حين درس آخرون الدور الذي يؤديه اللقاح الفعال في التعزيز والتحفيز النشط لـ ارتشاح مجاميع الخلايا التائية إذ سجلت نتائج الدراسة Farashi-Bonab & Khansari،(2019) حصول تراجع كبير في نمو الورم المستحث في النماذج التجريبية التي تعاني من عوز بالخلايا التائية بعد ان تم حقنها وريدياً بالخلايا التائية الطحالية الحساسة للورم من واهبين مُمنّعين . بالإضافة الى إن وصول الجرثومة إلى الخلايا الكبدية والطحالية سيكون مقروناً بتجمع كمية كبيرة من خلايا الدم البيض العدلة في موقع الاصابة استجابة لعوامل الجذب الناتجة من التفاعلات المناعية الحاصلة بين الجهاز المناعي للمضيف والجراثيم الغازية (Huaizhu *et al.*,2003) ، في حين ذكر Keshta وآخرون ، (2023) في دراسته عن الإنتاج والتقييم المناعي للقاح شبح *Enterobacter aerogenes* (EAGs) في نموذج فئران التجربة إذ تسبب اللقاح في إحداث استجابة قوية للأجسام المضادة وقللت بشكل كبير من الأحمال البكتيرية بعد الإصابة في الأعضاء الداخلية للفئران وأظهرت الفئران الملقحة بـ EAG تحسنًا في أنسجة الكبد والطحال بعد الفحص النسيجي المرضي وعلل ذلك أنه قد تكون قدرة EAGs على إثارة مناعة خلوية وخلطية محددة هي السبب وراء هذه النتائج والتي قامت لاحقاً بحماية الأعضاء الداخلية من التأثير البكتيري بعد تعرضها للتحدي من قبل سلالة حية ، وتتوافق نتائج هذه الدراسة مع نتائج Sheweita وآخرون، (2019) التي بينت أنه عند الفحص النسيجي أظهرت أقسام الكبد والطحال للفئران الملقحة بأشباح (ABGs) *Acinetobacter baumannii* تحسنًا مقارنة بتلك الموجودة في الفئران غير الملقحة بعد اصابتها بخلايا *A. baumannii* الحية .

كما أظهرت دراسة AL-Saafeen وآخرون، (2022) على قدرة جرعة مخفضة من السالمونيلا المضعّفة على تنشيط المناعة الجهازية في نموذج لسرطان القولون والمستقيم من خلال زيادة ارتشاح الخلايا المناعية إلى الطحال وتعزيز إمكانية عرض المستضد للخلايا الوحيدة حيث لوحظت تغيرات في خلوية الطحال اتضحت في زيادة ما يقارب 0.2 ضعف عند تعداد خلايا الطحال وأظهرت أن كل من الخلايا الليمفاوية والنخاعية ساهمت ايضاً في هذه الزيادة .

2.2.4 تأثير التلقيح ب STGs على مقاييس الاستجابة المناعية (في العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض)

Effect of STG vaccination on immune response parameters (total and differential white blood cell counts)

بينت النتائج الملاحظة في الجدول (4-5) والملحق (1) وجود زيادة معنوية في العدد الكلي لخلايا الدم البيض بين مجموعات الدراسة الثلاثة المعاملة مقارنة بالسيطرة السالبة إذ بلغت أعلى قيمة لها في مجموعة السيطرة الموجبة بمعدل وخطأ قياسي (17.52±0.28خلية/ملم^3 دم) إذ تشكل هذه الزيادة فارق معنوي عند مستوى دلالة ($P<0.05$) عند مقارنتها بمجاميع التجربة ، القيمة الاحتمالية (p-value) بين المجموعات كانت (0.0006) مما يدل على وجود دلالة احصائية قوية . كذلك أظهرت النتائج الواردة في الجدول أعلاه حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في المعدل والخطأ القياسي للخلايا اللمفية Lymphocyte للمجاميع الثلاثة مقارنة بالسيطرة السالبة إذ سجلت أعلى قيمة لها في مجموعة السيطرة الموجبة والبالغة (14.66±0.36 خلية/ملم^3 دم) عند مقارنتها مع مجموعات التجربة ، القيمة الاحتمالية (p-value) بين المجموعات كانت (0.0001) مما يدل على وجود دلالة احصائية قوية ($P<0.05$) . أما خلايا الدم الحبيبية Granulocyte فقد أظهرت زيادة معنوية ($P<0.05$) في المعدل والخطأ القياسي للمجاميع الثلاثة مقارنة بالسيطرة السالبة بلغ (7.9±1.92 خلية/ملم^3 دم) في المجموعة الرابعة (استحداث سرطان +لقاح بكتيري +معاملة بالبكتيريا الحية) عند مقارنتها مع مجموعات التجربة ، قيمة الاحتمالية (p-value) بين المجموعات كانت (0.013) مما يدل على وجود دلالة احصائية ($P<0.05$) ، تلك المجموعة التي أعطت ايضاً زيادة معنوية ($P<0.05$) في قيمة المعدل والخطأ القياسي للخلايا احادية النواة Monocyte عند مقارنتها مع مجموعات التجربة لتصل إلى (1.40±0.031 خلية/ملم^3 دم) ، قيمة الاحتمالية (p-value) بين المجموعات كانت (0.0008) مما يدل على وجود دلالة احصائية ($P<0.05$) . في حين أظهرت كريات الدم الحمر زيادة غير معنوية ($P>0.05$) في كل مجموعات التجربة الثلاثة المعاملة مقارنة بالسيطرة السالبة وسجلت قيمة احتمالية بين المجموعات بلغت (0.28) .

جدول (4-5) تأثير التلقيح ب STGs في العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض وكريات الدم الحمر في الجرذان البيض

عدد خلايا الدم / المجاميع	كريات الدم البيض Mean ±SE Cell/mm^3*10^3	اللمفاوية Mean ±SE Cell/mm^3*10^3	الحبيبية Mean ±SE Cell/mm^3*10^3	احادية النواة Mean ±SE Cell/mm^3*10^3	كريات الدم الحمر Mean ±SE Cell/mm^3*10^3
السيطرة السالبة	5.35±0.361 C	2.94±088 C	1.933±0.38 B	0.03±0.01 C	7.37±0.60 A
السيطرة الموجبة	17.52±0.28 A	14.66±0.36 A	2.68±0.29 B	0.05±0.02 C	7.7±0.22 A
المستحثة ـ الملقحة	14.00±0.70 B	10.74±0.88 B	3.78±0.41 B	0.14±0.07 B	8.49±0.39 A
المستحثة – الملقحة ـ معاملة بالبكتيريا الحية (تجربة التحدي البكتيري)	13.36±2.25 B	9.1±0.34 B	7.9±1.92 A	1.40±0.031 A	7.38±0.22 A
قيمة الاحتمالية p-value	0.0006*	0.0001*	0.013*	0.0008*	0.28

***تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية (P< 0.05)**
SE = الخطأ القياسي
تدل الحروف الكبيرة المختلفة في الاتجاه العمودي على وجود فروقات معنوية

كانت نتائج هذه الدراسة مقاربة للعديد من الدراسات والتي بيّنت أن الارتفاع المعنوي في عدد خلايا الدم البيض في الدم المحيطي يعد أولى خطوات المناعة الذاتية Innate immune response للوقوف في وجه غزو البكتيريا ومستضداتها حيث تحصل زيادة سريعة في خلايا الدم البيض العدلة Neutrophiel والخلايا احادية النواة Monocyte في مجرى الدم للتصدي لهذه الجرثومة (de Waard *et al.*,2003) ، وبالمثل ، تمكّن العناصر المستضدية المعروفة بـ Pathogen Associated Molecular Patterns(PAMPs) التي تحتويها أشباح السالمونيلا STGs (بما في ذلك متعدد السكريد الشحمي (LPS) والليبيد A وطبقة الببتيدوجليكان أو الأسواط) التي يتم تمييزها والتقاطها بواسطة العديد من الخلايا المناعية (الخلايا الشجيرية (DCs) والبلعميات والخلايا البائية والتائية) والخلايا غير المناعية (الخلايا الظهارية والأورمات الليفية Fibroblasts والخلايا الكيراتينية Keratinocytes) إذ تنشط ردود فعل مناعية فطرية كاستجابة اولية ، بالإضافة إلى امكانية التعرف عليها وتمييزها من قبل مستقبلات TLR لتحفز الاستجابات المناعية الخلطية والخلوية (Salem-Bekhit *et al.*, 2021) .

كما أعزى الباحث Eko وآخرون، (2015) الزيادة المعنوية بنسبة الخلايا الحبيبية Granulocyte في دم الحيوانات التي مُنعّت تحت الجلد بلقاح BG من سلالات H1 *V. cholerae* المتآزر مع المواد المساعدة

إلى القدرة العالية للقاح على تحفيز العديد من الخلايا البلعمية بعد ارتباطه المتخصص بها وفي تقديم مستضدات الخلايا التغصنية وتحرر أنواع مختلفة من الإنترلوكينات والسموم التحسسية Anaphlytoxins .

أما الزيادة الطردية لخلايا الدم البيض وحيدة النوى Monocyte المقرونة بالارتفاع في معدلات الأجسام المضادة في مصل الجرذان المحقونة باللقاح البكتيري BGs ، فقد فسرها بعض الباحثين في ضوء قدرة اللقاح البكتيري على تحفيز افراز العامل المنخر للأورام TNF القادر على تحفيز فعالية بقية عناصر الجهاز المناعي مثل تحفيز الخلايا البائية اللمفية على إنتاج الأضداد وزيادة اعداد الخلايا احادية النواة التي تؤدي دوراً مهماً في عملية البلعمة وتقديم المستضد للخلايا البائية (Sheweita *et al.*, 2019) ، وبذلك تكون كمؤشر لبدء ارتشاح الخلايا التغصنية أو الخلايا البلعمية إلى الورم وارتفاع في نسبة الخلايا المعبرة عن بروتينات MHCII في انسجة كل من الورم والطحال عند العلاج والمهمة في توليها لمسؤولية تقديم المحددات المستضدية على سطح الخلية ليتم تمييزها من قبل الخلايا التائية .

3.2.4 الفحوصات المناعية Immunological tests

1.3.2.4 قياس مستوى مستقبل الشبيه بالتول الرابع TLR-4 TLR-4 level measurement

تم قياس مستوى الـ TLR-4 في أربع مجاميع من الجرذان : السيطرة السالبة ، السيطرة الموجبة ، المستحثة - الملقحة ، والمستحثة - الملقحة (تجربة التحدي البكتيري) ، وتمت القياسات في أربعة نقاط زمنية مختلفة : قبل التلقيح (0) يوم ، بعد 14 يوم من التلقيح الأول ، بعد 28 يوم (14 يوم من التلقيح الثاني)، وبعد 42 يوم (14يوم من التلقيح الثالث) ، تم تحليل البيانات باستخدام المتوسطات والخطأ القياسي (Mean ±SE)، بالإضافة إلى حساب قيمة الاحتمالية (p-value) وأقل فرق معنوي (LSD).

بينت النتائج الملاحظة حسب التسلسل الزمني في الجدول (4-6) والملحق (2) أنه قبل التلقيح لم تظهر هناك فروق معنوية بين المجاميع الأربع (p-value = 0.087)، إذ كانت القيمة (P>0.05) ، هذا يشير إلى أن مستوى TLR-4 كان متشابهًا في كل المجاميع قبل بدء التلقيح ، أقل فرق معنوي (LSD) كان (1.763) مما يعني أن أي فرق بين المتوسطات أقل من هذه القيمة يعد غير معنوي .

كما بينت النتائج أنه بعد مرور 14 يوم من التلقيح الأول لم تظهر هناك فروق معنوية بين المجاميع الاربع (p-value = 0.28) القيمة كانت أعلى من (0.05) ، مما يدل على أن التلقيح الأول لم يؤثر بشكل كبير على مستوى TLR-4 مقارنة بالمجاميع الأخرى ، أقل فرق معنوي (LSD) كان (0.731) (غير معنوي) ، مما يشير إلى أن الاستجابة المناعية قد تكون في مرحلة التطور وهذا يعكس طبيعة استجابة الجهاز المناعي التي قد تستغرق بعض الوقت للوصول إلى ذروتها بعد التلقيح .

عند النظر إلى البيانات بعد 14 يوم من التلقيح الثاني (28 يوم)، كذلك لم تكن هناك فروق معنوية بين المجاميع (p-value = 0.5559) ، القيمة كانت أعلى من (0.05) ، مما يشير إلى أن التلقيح الثاني لم يُحدث تغييرًا كبيرًا في مستوى TLR-4، أقل فرق معنوي (LSD) كان(0.82)(غير معنوي) .

كذلك بينت النتائج أنه بعد مرور 14 يوم من التلقيح الثالث (42 يوم) لم تظهر فروق معنوية بين المجاميع (p-value = 0.08368)، على الرغم من أن القيمة كانت قريبة من الحد المعنوي (0.05) ، أقل فرق معنوي (LSD) كان(0.871) ، هذا يشير إلى أن التلقيح الثالث قد يكون له تأثير طفيف لكنه غير مؤكد إحصائيًا.

عند تحليل النتائج احصائياً عن طريق اختبار توكي للمقارنات المتعددة Tukey's multiple comparisons test للتسلسل الزمني للتلقيح ، لم تظهر النتائج فروقًا معنوية بين المجاميع في معظم الأوقات ، باستثناء بعض الحالات التي كانت فيها قيم p-value قريبة من الحد المعنوي مثلاً ان القيمة (p-value = 0.047) في المجموعة المستحثة تشير إلى وجود دلالة إحصائية عند مستوى معنوية (P<0.05) خلال برنامج التلقيح الكامل ، كذلك يمكن ملاحظة أن المتوسطات في المجموعات (المستحثة - الملقحة) كانت تميل إلى الارتفاع مع مرور الوقت مقارنة بالسيطرة السالبة ، لكن هذه الزيادة لم تكن كافية لتحقيق دلالة إحصائية.

جدول (4-6) قياس مستوى المعيار المناعي TLR-4 (ml /ng) في مصل الدم للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والملقحة بلقاح STGs مقارنة مع مجموعة السيطرة وحسب التسلسل الزمني للتلقيح

المجاميع / التسلسل الزمني للتلقيح	السيطرة السالبة Mean ±SE	السيطرة الموجبة Mean ±SE	المستحثة ـ الملقحة Mean ±SE	المستحثة – الملقحة (تجربة التحدي البكتيري) Mean ±SE	قيمة الاحتمالية p-value	اقل فرق معنوي LSD
قبل التلقيح (0) يوم	1.84±0.111 B a	1.923±0.73 B b	3.2±0.1 B a	2.65± 0.25 B a	0.087	N.S.
بعد 14 يوم من التلقيح الاول	1.7±0.285 A a	2.68±0.57 A a	2.48±0.322 A a	2.92± 0.322 A a	0.28	N.S.
بعد 14 يوم من التلقيح الثاني (28 يوم)	1.66±0.26 A a	2.965±0.42 A a	2.66±0.322 A a	3.38± 0.39 A a	0.05559	N.S.
بعد 14 يوم من التلقيح الثالث (42 يوم)	1.65±0.26 A a	3.0375±0.368 A a	2.19±0.322 A a	2.58± 0.32 A a	0.08368	N.S.
قيمة الاحتمالية p-value	0.142	0.047*	0.085	0.094		
اقل فرق معنوي LSD	N.S.	0.71	N.S.	N.S.		

***تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية (P< 0.05)**
SE = الخطأ القياسي
تدل الحروف الكبيرة المختلفة في الاتجاه الافقي على وجود فروقات معنوية بين مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح
تدل الحروف الصغيرة المختلفة في الاتجاه العمودي على وجود فروقات معنوية بين التسلسل الزمني للتلقيح لكل محموعة على انفراد
N.S. = غير معنوي

الواضح من نتائج الدراسة الحالية إلى أن اللقاح البكتيري يمكن أن يعزز الاستجابة المناعية لدى الجرذان المصابة بسرطان القولون مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة ، وقد أشارت العديد من الأبحاث العلمية إلى دور العلاج البكتيري في تنشيط اشارات الـTLR-4 في خلايا سرطان القولون ، إذ بَيّن Lee وآخرون ، (2008) خلال دراسته على دور مستقبل TLR-4 في توسط استجابات المضيف المضادة للورم والمستحثة بوساطة بكتيريا *S. enterica* serovar Choleraesuis ان البكتيريا تعمل على زيادة إنتاج IFN-γ والكيموكينات القابلة للتحريض بواسطة الانترفيرون كـ CXCL9 و CXCL10 في الفئران البرية ، وانعدم تأثير ذلك في الفئران التي تعاني من نقص في TLR-4 ، مما يشير إلى دور TLR-4 في تحفيز الاستجابة المناعية المضادة للأورام المعتمدة على الخلايا التائية $CD4^+$ و$CD8^+$. عُلل سبب ذلك أن السالمونيلا تعمل على عكس الطبيعة المثبطة مناعياً داخل الـ TME بوساطة تغيير شلالات الإشارة الاساسية لبيئة الورم ولنمط التعبير الجيني العام ، ويقترن هذا بزيادة ارتشاح وتنشيط الخلايا المناعية الخاصة بالورم ، بما في ذلك الخلايا البلعمية والعدلات والخلايا القاتلة الطبيعية وخلايا $CD4^+$ T و $CD8^+$ و/أو إعادة تنشيط الخلايا المؤثرة المعطلة وظيفياً (Pangilinan & Lee ,2021) .

وذكر Chettab وآخرون،(2023) إن متعدد السكريد الشحمي LPS هو المكون الرئيسي للغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة لصبغة جرام الذي يعزز من نضوج الخلايا التغصنية واستقطاب Macrophage (M1) عن طريق تنشيط مسارات الإشارات التي يتوسطها TLR-4 وبالتالي تنشيط الاستجابات المناعية والالتهابية للتأثير على تطور الورم .

وفي دراسة أُجريت من قبل Groza وآخرون، (2018) عن دور الأشباح البكتيرية BGs كمساعد للعلاج الكيميائي Oxaliplatin لسرطان القولون والمستقيم ، أوضحت النتائج ان BGs تمتلك القدرة على توفير إشارات تحفيزية لخلايا أخرى غير الخلايا التي تقدم المستضد ، وفسر ذلك في ضوء قدرة خلايا سرطان القولون في أن تعبر بشكل عام عن الـ TLR-4 ، ومن ثم قد يكون للـ LPS الموجود على سطح BG القدرة على تنشيط إشارات TLR-4 بشكل مباشر في هذه الخلايا مما يؤدي هذا لاحقاً إلى تنشيط إشارات NF-kB الالتهابية وإجهاد الشبكة الإندوبلازمية وتحريض مركبات الاوكسجين التفاعلية ROS ، فضلاً عن ذلك تعتمد آلية تنشيط الخلايا التغصنية بواسطة الـ BGs عبر PAMPs على التحريض المباشر لإشارات Pattern Recognition Receptors (على سبيل المثال TLR- 4) والتي توجد بشكل عام في الخلايا المقدمة للمستضد (Schijns *et al*., 2014; Muhammad *et al*., 2012) .

إن الأساس الجزيئي للتفاعل بين الخلايا البكتيرية والمناعية هو ما يسمى بالأنماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs) مثل متعدد السكريد الدهني (LPS) أو الليكتين أو ثلاثي أسيل الببتيد الدهني المستقر على سطح الخلية البكتيرية ، إذ يتم التعرف على هذه المكونات البكتيرية المحفوظة بواسطة خلايا المضيف المناعية عن طريق الارتباط بمستقبلات تمييز الأنماط (PRRs) والتي تعد عائلة مستقبلات (TLR) الأكبر والأهم منها (Tang *et al*., 2012)، وتوجد مستقبلات تمييز الأنماط المناسبة بشكل أساسي على الخلايا البلعمية والخلايا الشجيرية (DCs) بالإضافة الى تواجدها على الخلايا السرطانية ، إذ

يمكنها تنشيط الإشارات المسببة للالتهابات Proinflammatory signals ، إلا إن العيب الرئيسي في العلاج بالبكتيريا الحية هو السمية فضلًا عن صعوبة التحكم في شدة قابليتها على الاستعمار (Dzutsev *et al*., 2017) لذلك مكنت استراتيجية استخدام الاشباح البكتيرية BGs في التغلب على هذه العيوب ، إذ تعتمد فقط على مكونات الـ PAMPs وبالتالي الخصائص المناعية الخارجية للبكتيريا بطريقة يمكن التحكم فيها (Groza *et al*., 2018). فتعمل الـ (PAMPs) على تنشيط الاستجابات المناعية الفطرية والتكيفية ، إذ يؤدي تحفيز TNF و IFN-γ و IL-12 إلى تجنيد وتنشيط الخلايا التغصنية والتي قد تقوم عند الهجرة إلى العقد الليمفاوية بتقديم مستضدات الورم إلى الخلايا التائية بكفاءة (Chorobik & Marcinkiewicz ,2011) .

يساهم الالتهاب في تنظيم تطور السرطان واستجابته للعلاج ، والذي إما ان يعزز أو يثبط تطور الورم ، مما قد يُظهر تأثيرات معاكسة على النتائج العلاجية ، فيسهل الالتهاب المزمن من تطور الورم ومقاومته للعلاج ، في حين أن تحريض التفاعلات الالتهابية الحادة غالبًا ما يحفز نضوج الخلايا الشجيرية (DCs) وتقديم المستضد مما يؤدي إلى استجابات مناعية مضادة للورم ، فضلاً عن ذلك ، تسلك مسارات إشارات متعددة كمنظمات محورية لبدء الإلتهاب وحله مثل : العامل النووي كابا B (NF-kB) ، محولات الاشارة ومنشطات النسخ (JAK-STAT)، مسارات الـ (TLR) ، بروتين كيناز المنشط بالميتوجين (MAPK)، العوامل الالتهابية بما في ذلك السيتوكينات {مثل الإنترلوكين (IL)، والإنترفيرون (IFN)، وعامل نخر الورم (TNF-α)}، والكيموكينات {مثل ربيطات كيموكين (CCLs) وربيطات كيموكين (CXCLs)}، وعوامل النمو {مثل عامل نمو بطانة الأوعية الدموية (VEGF)، وعامل النمو بيتا (TGF-β)} ، بالإضافة إلى المستقلبات الايضية الالتهابية بما في ذلك البروستاجلاندين Prostaglandins ، والليوكوترينات Leukotrienes، والثرومبوكسان Thromboxane ، والوسطاء المتخصصين في حل الالتهاب (SPM) (Zhao *et al*., 2018).

2.3.2.4 قياس مستوى بروتين مستقبل الموت المبرمج PDL-1 PDL-1 level measurement

عند النظر إلى نتائج الدراسة الحالية في الجدول (4-7) والملحق (3) ، نجد حسب التسلسل الزمني للتلقيح انه قبل التلقيح كانت هناك فروق معنوية بين المجاميع (p-value = 0.02209) ، إذ أظهرت المجموعتان الثالثة والرابعة أعلى مستويات للـ PDL-1 بمعدل وخطأ قياسي بلغ (995.855 ± 17.51) Pg/ml و(997.565 ± 4.06) Pg/ml على التوالي ، بينما كانت السيطرة الموجبة الأقل بمعدل وخطأ قياسي بلغ (362.83 ±30.134) Pg/ml ، أقل فرق معنوي (LSD) كان (275.83) مما يدل على أن الفروق بين المجموعات كانت كبيرة بما يكفي لاعتبارها ذات دلالة إحصائية.

كما بينت النتائج انه بعد مرور 14 يوم من التلقيح الاول شهدت تسجيل فروق معنوية بين المجموعات (p-value = 0.0057) ، كذلك أظهرت المجموعتان الثالثة والرابعة أعلى مستويات للـ PDL-1 بمعدل

وخطأ قياسي بلغ (3.22 ± 1137.3)Pg/ml و (3.22 ± 1159.2)Pg/ml على التوالي، بينما كانت السيطرة السالبة الأقل بمعدل وخطأ قياسي بلغ (21.5 ± 647.15)Pg/ml ، أقل فرق معنوي (LSD) كان (189.76).

بينت النتائج انه بعد مرور 14يوم من التلقيح الثاني (28) يوم كانت هناك فروق معنوية بين المجموعات (p-value = 0.0015)، وأظهرت المجموعة الثالثة أعلى مستوى للـ PDL-1 بمعدل وخطأ قياسي بلغ (20.10 ± 1243.11)Pg/ml ، بينما كانت السيطرة السالبة الأقل بمعدل وخطأ قياسي بلغ (523.04 ± 22.48) Pg/ml، أقل فرق معنوي (LSD) كان (365.46) ، هذه النتائج تعكس تأثير اللقاح في تعزيز الاستجابة المناعية.

عند النظر الى البيانات بعد 14يوم من التلقيح الثالث (42) يوم كانت هناك فروق معنوية بين المجموعات (p-value = 0.01894) ، وأظهرت المجموعة الرابعة أعلى مستوى للـ PDL-1 بمعدل وخطأ قياسي بلغ (3.22 ±1019.73) Pg/ml ، بينما كانت السيطرة السالبة الأقل بمعدل وخطأ قياسي بلغ (21.122±590.603)Pg/ml ، أقل فرق معنوي (LSD) كان(213.74).

عند تحليل النتائج احصائياً لاختبار المقارنات المتعددة ، أظهرت النتائج وجود فروقًا معنوية بين المجموعات في جميع الأوقات ، حيث كانت قيم (p-value < 0.05) في جميع الحالات ، هذا يشير إلى أن التلقيح بلقاح STGs وتجربة التحدي البكتيري قد أثرت بشكل كبير على مستوى PDL-1 في مصل الجرذان المستحدث فيها سرطان القولون.

جدول (4-7) قياس مستوى المعيار المناعي PDL-1 (Pg/ ml) في مصل الدم للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والملقحة بلقاح STGs مقارنة مع مجموعة السيطرة وحسب التسلسل الزمني للتلقيح

المجاميع / التسلسل الزمني للتلقيح	السيطرة السالبة Mean ±SE	السيطرة الموجبة Mean ±SE	المستحثة ـ الملقحة Mean ±SE	المستحثة – الملقحة (تجربة التحدي البكتيري) Mean ±SE	قيمة الاحتمالية p-value	اقل فرق معنوي LSD
قبل التلقيح (0) يوم	722.83± 10.85 A a	362.83 ± 30.134 B b	995.855 ± 17.51 A c	997.565 ± 4.06 A c	0.02209*	275.83
بعد 14 يوم من التلقيح الاول	647.15± 21.5 B ab	952.505 ± 9.04 A a	1137.3 ± 3.22 A b	1159.2± 3.22 A a	0.0057*	189.76
بعد 14 يوم من التلقيح الثاني (28 يوم)	523.04± 22.48 B c	1036.43 ± 42.4 A a	1243.11 ± 20.10 A a	1059.91± 3.22 A b	0.0015*	365.46
بعد 14 يوم من التلقيح الثالث (42 يوم)	590.6033± 21.122 B bc	978.88 ± 9.30 A a	929.9 ± 3.22 A d	1019.73± 3.22 A bc	0.01894*	213.74
قيمة الاحتمالية p-value	0.041*	0.72	0.0034*	0.028*		
اقل فرق معنوي LSD	77.45	88.35	53.56	48.97		

***تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية (P< 0.05)**
SE = الخطأ القياسي
تدل الحروف الكبيرة المختلفة في الاتجاه الافقي على وجود فروقات معنوية بين مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح
تدل الحروف الصغيرة المختلفة في الاتجاه العمودي على وجود فروقات معنوية بين التسلسل الزمني للتلقيح لكل محموعة على انفراد
N.S. = غير معنوي

اشارت العديد من الدراسات العلمية إلى تأثير البكتيريا كعلاج مناعي على بعض المعايير المناعية في حالات السرطانات سواء كانت كعلاج بالبكتيريا المضعفة جينياً أو المقتولة والمستخدمة كلقاح ، ففي دراسة AL-Saafeen وآخرون ، (2022) عن دور السالمونيلا المضعفة في تعزيز العلاج المناعي للـ PDL-1 المحاصر في نموذج لسرطان القولون والمستقيم ، وفيها تم تحليل تأثير جرعة مخفضة من السالمونيلا في القدرة التعبيرية لجزيئات نقاط المراقبة المثبطة للمناعة المتمثلة بـ PD-1 وPD-L1 على الخلايا التائية الورمية باستخدام اختبار التدفق الخلوي Flow cytometry ، أظهرت النتائج أن إعطاء جرعة السالمونيلا أدى إلى انخفاض كبير في نسب الخلايا اللمفاوية المتسللة إلى الورم كالخلايا التائية $CD4^+$ TILs و$CD8^+$ المعبرة عن جزيئات PD-1 ليصل إلى متوسط ما يقارب 23% و 7% بين $CD4^+$ TILs و إلى ما يقارب 51% و33% بين خلايا $CD8^+$ TILs، وبالنظر إلى هذه النسب مجتمعة ، فإن النسبة المئوية المنخفضة للخلايا التائية التي تعبر عن ربيطات ligands وجزيئات المراقبة المثبطة داخل أنسجة الورم يمكن أن تساهم

في عكس العوامل المثبطة التي تفرض على الخلايا التائية وبالتالي تنشيط المناعة المضادة للسرطان ، وفُسر ارتباط انخفاض تنظيم PDL-1 الناجم عن السالمونيلا في أنسجة الورم بتثبيط مسار إشارات AKT/mTOR/p70S6K بعد علاج الورم المستحث في الفئران بالسالمونيلا المضعّفة . وأشار Liu وآخرون ،(2024) في دراسته عن سرطانات المسالك البولية كسرطان المثانة وسرطان الخلايا الكلوية وسرطان البروستات ،إلى دور مستقبل (PD-1) و (PDL-1) الرئيسي في تعديل الاستجابة المناعية وعدّها من الجزيئات الاساسية التي يحفز ارتباطها الى موت الخلايا التائية أو خمولها ، وبالتالي تسهيل الهروب المناعي للأورام .

يعد الجهاز المناعي ضروريًا للكشف عن وتدمير الخلايا غير الطبيعية ، بما في ذلك الخلايا السرطانية ، وغالباً ما تُظهر سرطانات الإنسان تصاعد في تعبيرها لجزيئه التثبيط المناعي (PDL-1) والتي عند ارتباطها مع المستقبل الخاص بها (PD-1) الموجود على الخلايا التائية النشطة فإنها تسهل من تهرب الخلايا السرطانية من مراقبة الجهاز المناعي للمضيف ، عن طريق تطوير اليات التحمل المناعي وتنظيمها السلبي للمناعة التكيفية المتمثلة بتثبيط نشاط الخلايا التائية المؤثرة (Effector T cells) التي تخضع لتغيرات مختلفة كتراجع في كلاً من تكاثرها وبقاءها وإنتاجها للسيتوكينات مما يجعلها منهكة تدريجياً وغير قادرة على قتل الخلايا السرطانية ، المقرون مع تعزيز لوظيفة الخلايا التائية (Tregs) المثبطة للمناعة في الدم المحيطي والبيئة المحيطة بالورم (Payandeh *et al.* , 2020) ، لذلك تمكّن المعاملة السريرية بالمثبطات القائمة على الاجسام المضادة من تثبيط تفاعل PD-1/PD-L1 وبالتالي يسمح بإعادة تنشيط الخلايا التائية السامة للقضاء على الخلايا السرطانية المتقدمة (Lin *et al*., 2024; Lin *et al*., 2023) . كما أظهرت لقاحات السرطان العلاجية نتائج واعدة بوساطة إثارة استجابات الخلايا التائية الجديدة de novo التي تستهدف مستضدات الورم ، بما في ذلك المستضدات المرتبطة بالورم Tumor-associated والمستضدات الخاصة بالورم Tumorspecific بهدف تضخيم وتنويع خزين الخلايا التائية الخاصة بالورم (Fan *et al*., 2023) .

بَيّن Parvez وآخرون ،(2023) أن تنظيم تعبيرPD-L1 يتم عبر شبكة معقدة لآليات أولية غير مناعية تُسهم بزيادة التعبير عنه كالتشوهات الجينية والتنظيم بواسطة microRNAs وتنشيط مسارات وعوامل استنساخ الجينات المسرطنة وتحويرات ما بعد عملية الترجمة للحمض النووي ، في حين تتضمن الآليات الثانوية المتعلقة بالمناعة في المقام الاول هو تنشيط لمسارات الاشارات الالتهابية التي تحفزها العديد من العوامل الذائبة الناتجة من الخلايا المناعية الموجودة داخل البيئة الدقيقة للورم(TME) .

3.3.2.4 قياس مستوى عامل النخر الورمي –الفا Measurement of Tumor Necrosis Factor-alpha(TNF-α)level

عند النظر إلى نتائج الدراسة الحالية من خلال الجدول (4-8) والملحق (4) التي تتعلق بقياس مستويات الـ TNF-α في اربع مجموعات من جرذان التجربة ، أظهرت النتائج انه لم تكن هناك فروق معنوية بين

المجاميع (p-value = 0.37) ، وان قيمة الـ LSD كانت (88.58) مما يشير إلى أن الفروق بين المجاميع كانت أقل من هذا الحد وبالتالي فهي غير معنوية ، تشير هذه النتيجة إلى أن المجاميع الاربعة كانت متشابهة في مستويات TNF-α قبل بدء التلقيح (0 يوم) .

بعد مرور 14 يوم من التلقيح الأول ، لوحظ تسجيل فروق معنوية عالية بين المجاميع (p-value = 0.0001) مما يدل على وجود دلالة إحصائية قوية (P<0.05)، سجلت السيطرة الموجبة أعلى مستوى لتعبير TNF-α بمعدل وخطأ قياسي بلغ (525.78±13.7)Pg/ml ، مما يدل على حصول استجابة التهابية قوية نتيجة لتطور الورم فكان فعالًا في زيادة التعبير عن TNF- α، سجلت المجموعة الرابعة أيضًا مستوى مرتفعًا بمعدل وخطأ قياسي بلغ (379.74±3.75) Pg/ml مما يدل على أن التحدي البكتيري عزز من الاستجابة المناعية ، قيمة الـ LSD كانت (112.65) مما يدل على أن الفروق بين المجاميع كانت أكبر من هذا الحد، وبالتالي فهي معنوية.

بعد 28 يوم من التلقيح استمرت الفروق المعنوية بين المجاميع (p-value = 0.0001) مما يدل على وجود دلالة إحصائية قوية (P<0.05)، حافظت المجموعة الرابعة على أعلى مستوى لها بمعدل وخطأ قياسي بلغ(333.9±3.22) Pg/ml ، تليها المجموعة الثالثة بمعدل وخطأ قياسي بلغ(288±3.22) Pg/ml ، قيمة الـ LSD كانت (55.37) مما يشير إلى أن الفروق بين المجاميع كانت أكبر من هذا الحد وبالتالي فهي معنوية. تشير هذه النتائج إلى أن التلقيح المتكرر عزز الاستجابة المناعية، خاصة في المجموعة التي تعرضت للتحدي البكتيري.

وأخيرًا ، بعد 42 يوم من التلقيح كانت الفروق بين المجاميع معنوية (p-value = 3.23 E-05) مما يدل على وجود دلالة إحصائية قوية (P<0.05)، السيطرة الموجبة سجلت أعلى مستوى بمعدل وخطأ قياسي بلغ (247.33±16.911) Pg/ml ، بينما انخفضت مستويات TNF-α في المجموعات الأخرى ، قيمة الـ LSD كانت (62.67) مما يدل على أن الفروق بين المجاميع كانت أكبر من هذا الحد وبالتالي فهي معنوية. يشير هذا إلى أن تأثير التلقيح بدأ يتراجع مع مرور الوقت، لكن المجموعة التي تعرضت للتحدي البكتيري حافظت على استجابة مناعية أعلى مقارنة بالسيطرة السالبة.

عند تحليل النتائج احصائياً لاختبار المقارنات المتعددة ، نجد أن مجموعة السيطرة السالبة بينت إلى عدم وجود فرق معنوي في الاستجابة المناعية (P>0.05)، أما مجموعة السيطرة الموجبة فقد أظهرت وجود دلالة إحصائية واضحة عند مستوى معنوية (0.05) في الاستجابة الالتهابية.

جدول (4-8) قياس مستوى المعيار المناعي TNF-α (ml /Pg) في مصل الدم للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون والملقحة بلقاح STGs مقارنة مع مجموعة السيطرة وحسب التسلسل الزمني للتلقيح

المجاميع / التسلسل الزمني للتلقيح	السيطرة السالبة Mean ±SE	السيطرة الموجبة Mean ±SE	المستحثة ـ الملقحة Mean ±SE	المستحثة – الملقحة (تجربة التحدي البكتيري) Mean ±SE	قيمة الاحتمالية p-value	اقل فرق معنوي LSD
قبل التلقيح (0) يوم	187.68± 8.96 A a	135.67± 7.097 A c	203.97± 5.36 A b	241.1± 3.4 A b	0.37	N.S.
بعد 14 يوم من التلقيح الاول	146.18± 35.48 C a	525.78± 13.7 B a	319.45± 2.39 A a	379.74± 3.75 A a	0.0001*	112.65
بعد 14 يوم من التلقيح الثاني (28 يوم)	140.77± 27.11 D a	285.83± 5.46 C b	288± 3.22 B a	333.9± 3.22 A a	0.0001*	55.37
بعد 14 يوم من التلقيح الثالث (42 يوم)	113.68± 11.66 B a	247.33± 16.911 A b	204.3± 3.22 A b	200.95± 3.22 A b	3.23 E-05*	62.67
قيمة الاحتمالية p-value	0.456	0.026*	0.047*	0.038*		
اقل فرق معنوي LSD	N.S.	44.62	72.46	46.27		

***تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية (P< 0.05)**
SE = الخطأ القياسي
تدل الحروف الكبيرة المختلفة في الاتجاه الافقي على وجود فروقات معنوية بين مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح
تدل الحروف الصغيرة المختلفة في الاتجاه العمودي على وجود فروقات معنوية بين التسلسل الزمني للتلقيح لكل مجموعة على انفراد
N.S. = غير معنوي

لوحظ بوساطة نتائج الدراسة الحالية أن العلاج باللقاح البكتيري يعزز من الاستجابة المناعية في الجرذان المستحثة بسرطان القولون إذ أظهرت مستويات مرتفعة من TNF-α ، بينما كانت استجابة مجموعة السيطرة السالبة منخفضة مما يعكس فعالية الاستجابة المناعية ، الدلالات الإحصائية القوية في مدة التجربة تشير إلى أهمية هذه العلاجات في تحسين الاستجابة المناعية ضد السرطان ، توافقت هذه النتيجة مع العديد من الدراسات العالمية الاخرى ، حيث ذكر Hong وآخرون ، (2013) أن لقاح السلالة المعوية الموهنّة المؤتلف Recombinant Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine (RASV) أظهر نشاطًا مضادًا للأورام يعتمد على الخلايا التائية $CD8^+$ بعد حقنه داخل الورم ، ووجد أن العلاج بلقاح RASV قد زاد بشكل كبير من الخلايا الكابتة المشتقة من النخاع العظمي Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC) ، وإن نسبة كبيرة من هذه الخلايا تمثل مجاميع خلوية ثانوية مضادة للورم مسؤولة عن إفراز TNF-α .

في دراسة Ektate وآخرون ،(2018) عن دور العلاج الكيميائي المناعي لسرطان القولون باستخدام الليبوزومات الحساسة للحرارة المحملة بالسالمونيلا (الروبوتات الحرارية) باستخدام اختبار ELISA للكشف عن مستويات السايتوكينات TNF-α و IL1-β و IL-10 بعد العلاج ، بينت النتائج حصول ارتفاع كبير في مستوى السيتوكين TNF-α بمعدل وانحراف معياري بلغ (316±53) ng/ml في مصل مجموعات الفئران المصابة بالأورام والمعالجة بالسالمونيلا مقارنة بمجموعة السيطرة غير المعالجة (58.3±1.15) ng/ml، و اوضحت النتائج حصول ارتفاع في التعبير عن TNF-α وانخفاض في التعبير عن IL-10 في الخلايا البلعمية نظرًا لأن الخلايا البلعمية والخلايا الشجيرية هي المنتج الرئيسي لـ TNF-α وتنشيطها يؤدي عادةً إلى تحويل النمط الظاهري للخلايا البلعمية من M2 الداعمة لنشوء الورم إلى M1 .

كما بين Kocijancic وآخرون ، (2017) أن متعدد السكريد الشحمي (LPS) لبكتيريا السالمونيلا يساهم في تنشيط وتجنيد الخلايا المناعية والإنتاج اللاحق لـ TNF-α مما يؤدي إلى تأخير وإعاقة نمو الورم . وفي دراسة أُجريت من قبل Zhang وآخرون(2018) عن العلاج المناعي للسرطان المعتمد على قتل الخلايا السرطانية المصابة بالسالمونيلا الحية المضعفّة ، اوضحت النتائج أن الكائنات الحية الدقيقة التي تستعمر الأورام وتعزز التفاعل الالتهابي في بيئة الورم تعمل على تعزيز استجابات المضيف المضادة للورم . وفي دراسة Hongوآخرون،(2013) تم حقن سلالة بكتيريا *S. Typhimurium* داخل خط خلايا الورم البشري CT26 المحقونة سابقاً تحت جلد الفئران البرية Wt وبعد أن وصل حجم الورم إلى ما يقارب 200-100 ملم^3 ، أظهرت نتائج ناجحة في تثبيط نمو الورم بشكل كبير ، فقد ساعدت على حصول تحول وظيفي مهم في النمط الظاهري لفئة فرعية Subpopulation من الكريات البيضاء Myeloid derived suppressor cells (MDSC) المتسللة إلى الورم وتحولها إلى الخلايا العدلة المحررة لعامل النخر الورمي TNF-α ، كذلك ساهم هذا العلاج بخفض نسبة الخلايا التنظيمية Trg التي قد تعزز من نمو الورم . وبينت نتائج الدراسة Vinod وآخرون ، (2017) ان الخلايا البلعمية الفأرية تستجيب مناعياً بإفراز مجموعة متنوعة من الكيموكينات السيتوكينية (TNF-α و IL-1 و IL-6 و IL-10 و IL-12) ومستقبلات سطح الخلية وجزيئات الإشارة داخل بيئة الورم ، كذلك أدت الحضانة المشتركة لـ *S. Typhimurium* مع الخلايا البلعمية الفأرية إلى تعزيز إنتاج الجزيئات الضد مايكروبية المعتمدة على الأكسجين مثل الأكسجين الفائق وبيروكسيد الهيدروجين وأكسيد النيتريك (NO) لقتل بكتيريا السالمونيلا داخل الخلايا الورمية ، وبأسلوب يتماشى مع النمط البري لـ *S. Typhimurium* ، فقد مكنت أشباح السالمونيلا STG المستحثة بواسطة العامل NaOH بتنشيط الخلايا البلعمية لإفراز كل من السيتوكينات المؤيدة للالتهابات Pro-inflammatory والمضادة للالتهاباتAnti-inflammatory بواسطة التعبير الجيني لكل من TNF-α وIL-1β وiNOS وIL-6 وIL-10 .

في دراسة أُجريت من قبل Badie وآخرون، (2021) إذ تم فيها تحقيق التطفير في الـ DppGpp *Salmonella* بحيث لا تهاجم هذه السالمونيلا الطافرة ولا تتكاثر داخل خلايا الثدييات ولكنها تُظهر تأثيراتها المضادة للأورام عن طريق تحفيز التعبير عن السيتوكينات المؤيدة للالتهابات مثل TNFa و IL-1β من

الخلايا البلعمية والعدلة . وأوضح Saleh وآخرون، (2023) في دراسته عن الفعل التآزري لأشباح البروبيوتيك (LAGs) ghosts *Lactobacillus acidophilus* الحاوية على الـProdigiosin ضد خلايا سرطان القولون والمستقيم إلى أن غشاء هذه الـ LAGs المنتجة يمتاز بسلامة عالية واستقرار نسبي في ظل الظروف الفسيولوجية ، فضلاً الى اعتماده كنظام توصيل مضاد لسرطان القولون والمستقيم يجمع بين السلامة والنشاط الحيوي وألفة الـ LAGs لخلايا القولون مع قدرة الـ Prodigiosin في تفعيل الموت الخلوي المبرمج .

4.3.2.4 التغيرات في مستوى المعايير المناعية TNF-αو PDL-1 و TLR-4 لتجربة التحدي البكتيري
Changes in the level of immune parameters TNF-α, PDL-1 and TLR-4 in bacterial challenge experiment

بينت النتائج الملاحظة في الجدول (4-9) والملحق (5) المتعلقة بتقييم مستويات بعض المعايير المناعية في ثلاث مجموعات من جرذان التجربة عن وجود زيادة معنوية في مستوى PDL-1 في مجموعة السيطرة الموجبة (المستحثة بالسرطان) بمعدل وخطأ قياسي بلغ (7.85±1128.48) Pg/ml مقارنة بالمجموعات الاخرى التي اظهرت انخفاض في مستويات هذا المعيار حيث تشكل هذه الزيادة فارقاً معنوياً عند مستوى دلالة ($P<0.05$) وبلغت القيمة الاحتمالية (p-value) بين المجموعات (0.04231) مما يدل على وجود دلالة احصائية ، تشير هذه النتائج إلى أن معاملة الجرذان المستحثة – الملقحة بالبكتيريا الحية قد يكون له تأثير ايجابي في تقليل مستويات هذا المعيار المناعي مما يعكس حصول تعديل في الاستجابة المناعية . أما بالنسبة للمعيار المناعي TLR-4 فقد اظهر زيادة معنوية ($P<0.05$) في المجموعة الثالثة (المستحثة بالسرطان – الملقحة – المعاملة بالبكتيريا الحية) بمعدل وخطأ قياسي بلغ (0.39±3.135)ng/ml مقارنة مع المجموعة الاولى والثانية التي اظهرت انخفاض بهذا المعيار وبلغت القيمة الاحتمالية بين المجموعات (0.0392) مما يدل على وجود دلالة احصائية قوية وتشير هذه النتائج على أن المعاملة بالبكتيريا الحية تعزز من مستويات TLR-4 وبالتالي تحفيز الاستجابة المناعية . وفيما يخص المعيار المناعي TNF-α كذلك اظهر زيادة معنوية ($P<0.05$) في ذات المجموعة الثالثة بمعدل وخطأ قياسي بلغ(41.58±243.65) Pg/mlمقارنة مع المجموعتين الاولى والثانية وبلغت قيمة الاحتمالية بين المجموعات (0.03562) مما يدل على وجود دلالة احصائية واضحة و تشير هذه النتائج إلى أن العلاج باللقاح والبكتيريا الحية يعزز من مستوى TNF-α مما يعكس استجابة مناعية قوية.

جدول (4-9) قياس مستوى المعايير المناعية TNF-α و PDL-1 و TLR-4 في مصل الدم للجرذان المستحث فيها سرطان القولون -الملقحة بلقاح STGs والمعاملة بالبكتيريا الحية مقارنة مع الجرذان المستحثة بسرطان القولون –الملقحة و جرذان مجموعة السيطرة الموجبة (حسب قيمة الاحتمالية بين مجاميع الدراسة)

المجاميع / المعايير المناعية	السيطرة الموجبة Mean ±SE	المستحثة - الملقحة Mean ±SE	المستحثة – الملقحة (المعاملة بالبكتيريا الحية) Mean ±SE	قيمة الاحتمالية p-value
PDL-1 (Pg/ml)	1128.48± 7.85 A	1075.25 ±14.785 B	763.38 ±28.92 C	0.04231*
TLR-4 (ng/ml)	2.21±0.24 B	2.175±0.235 B	3.135± 0.39 A	0.0392*
TNF-α (Pg/ml)	153.55± 3.85 B	221.05± 5.45 AB	243.65± 41.58 A	0.03562*

***تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية (P< 0.05)**
SE = الخطأ القياسي
تدل الحروف الكبيرة المختلفة في الاتجاه الافقي على وجود فروقات معنوية

تشير النتائج بشكل عام إلى أن العلاج باللقاح البكتيري والبكتيريا الحية له تأثير إيجابي على المعايير المناعية TNF-α وPDL-1 وTLR-4 في الجرذان المصابة بسرطان القولون ، في حين أظهرت مجموعة السيطرة الموجبة مستويات مرتفعة من PDL-1 ، فإن العلاج بالبكتيريا الحية أدى إلى تقليل هذه المستويات مما يعكس تأثيرًا محتملًا في تحسين الاستجابة المناعية. كما أن المستويات المرتفعة من TNF-α وTLR-4 في المجموعات المعالجة تشير إلى استجابة مناعية معززة مما يدل على فعالية هذه العلاجات.

كانت نتائج هذه الدراسة مقاربة للعديد من الدراسات والتي بينت تأثير اللقاح البكتيري في التحفيز المناعي ضد انواع مختلفة من السرطانات وارتباط تأثيره في حالة مواجهة الحيوان المستحث بالسرطان والممنع بهذا اللقاح البكتيري مع الخلايا الحية لذات البكتيريا ، حيث ذكرChorobik وآخرون، (2013) أن الحيوانات التي حقنت بالرواشح البكتيرية Bacterial filtrates كـ بكتيريا الـ *Salmonella typhi* قد تطور لديها نخرًا نزفيًا Hemorrhagic necrosis عند إعادة حقنها re-challenge بالبكتيريا ، وعلل سبب ذلك إلى التحفيز القوي لتحرر السيتوكينات القبل الالتهابية Proinflammatory بما في ذلك عامل نخر الورم (TNF) بواسطة السموم الداخلية ومنتجات بكتيرية أخرى ، وبذلك تسبب متلازمة الصدمة هذه في حدوث تأثير علاجي في الحيوانات الحاملة للورم ، وبين كذلك إلى أنه قد تم استخدام لقاح الـ *Bacillus* Calmette-Guerin (BCG) في إضعاف بكتيريا السل البقري *Mycobacterium bovis* لعقود من الزمان كلقاح يحمي من مرض السل ، وعُدّ أيضاً أحد أنجح العلاجات المناعية للسرطان . وقدمت دراسة Chenوآخرون، (2019) آليات إضافية لتفسير زيادة عدد الخلايا التائية المعاد تنشيطها الخاصة بالورم ، وعلى وجه الخصوص أظهرت أن للتنظيم السلبي للـ PDL-1 الورمي بوساطة السالمونيلا قد ساهم في إعادة تنشيط الخلايا التائية الخاصة بالورم ، وتم تقييم دور هذا التنظيم السلبي لـ PDL-1 في زيادة نشاط الخلايا

التائية عن طريق إجراء تجربة زراعة مشتركة باستخدام نماذج الفئران الحاملة للورم ، إذ بينت النتائج أن عدد الخلايا التائية $CD8^+$ المنشطة زاد بشكل كبير بينما انخفض عدد الخلايا التائية الخاضعة للموت الخلوي المبرمج.

اشار العديد من الباحثين إلى القدرة العالية للقاح البكتيري في تعزيز استجابة المضيف المناعية المضادة للورم وتعديل الاستجابة المناعية ، كما في دراسة أُجريت من قبل Amara وآخرون، (2013a) على دور BGs المستحثة كيميائيًا المهم في المناعة ، اوضحت النتائج أن لسطح أشباح الـ STGs تراكيب ومكونات مستضدية محفوظة (مواد تعمل كمحفزات مناعية) التي تملك القدرة على تحفيز كل من الاستجابة المناعية (الخلطية والخلوية) في كل من مجاميع الجرذان الممنعة ، ونتيجة لذلك يجب أن تعمل الأشباح على تعزيز الاستجابة المناعية للمستضد المستهدف ، ويعود السبب في ذلك الى سلوك الجهاز المناعي بتعرفه على هذه المكونات كمستضدات غريبة ، مما يؤدي إلى تحفيز الاستجابات المناعية (Kang *et al*., 2022) ، ويعزز وجود هياكل سطح الـ BGs السليمة من قابليتها التمنيعية ، مما يولد استجابات مناعية قوية (Li *et al*., 2021) .

يمكن لـ BGs تنشيط الاستجابات المناعية الفطرية من خلال التعرف على الأنماط الجزيئية المرتبطة بالممرض (PAMPs) على سطحها (Abenavoli *et al*., 2019). يتم التعرف على المكونات مثل LPS وجزيئات سطح البكتيريا الأخرى بواسطة مستقبلات التعرف على الأنماط (PRRs) على الخلايا المناعية ، مثل الخلايا البلعمية والخلايا الشجيرية ويؤدي هذا التعرف إلى إفراز السيتوكينات المؤيدة للالتهابات وتجنيد المزيد من الخلايا المناعية (Ciesielska *et al*., 2021)، ، مما يعزز الاستجابة المناعية ضد المستضد المستهدف (Pathria *et al*., 2019) ، تحفز BGs أيضًا الاستجابات المناعية التكيفية من خلال تنشيط الخلايا البائية والتائية ، يسهل وجود المستضدات على السطح أو داخل BGs تقديم المستضد إلى الخلايا المناعية ، مما يؤدي إلى تكوين أجسام مضادة خاصة بالمستضد بواسطة الخلايا البائية (Hajam *et al*. 2017,) وتنشيط الخلايا التائية (Dobrovolskiene *et al*., 2018) ، يؤدي هذا في النهاية إلى إنتاج أجسام مضادة محددة وخلايا B الذاكرة والخلايا التائية السامة للخلايا ، مما يساهم في المناعة طويلة المدى ، يساعد هذا التأثير المساعد في تضخيم الاستجابة المناعية وتحسين فعالية اللقاح (Kumar *et al*., 2019).

واعتماداً على خصائص المكونات البكتيرية المحتفظ بها في BGs ونوع المستضد المقدم ، يمكنها أن تحرف الاستجابة المناعية في اتجاه معين ، على سبيل المثال ، يمكن لـ BGs التي تحتوي على مكونات بكتيرية محددة أن تعزز استجابة Th1 التي تتميز بالمناعة الخلوية (Cao *et al*., 2018) ، أو استجابة Th2 التي تتميز بإنتاج الأجسام المضادة (Senevirathne *et al*., 2021)، لذلك ، يمكن لمستضدات الجراثيم المستحثة كيميائيًا أن تعزز المناعة ، وتنشط الاستجابات المناعية الفطرية والتكيفية ، وتظهر خصائص مساعدة ، وتعدل الاستجابة المناعية. تجعل هذه الميزات منها وسائل قيمة في تطوير اللقاحات ، في العلاج المناعي لتحسين فعالية اللقاحات وتخصيص الاستجابات المناعية لمسببات الأمراض أو الأمراض المحددة.

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1- احتفظت اشباح السالمونيلا STGs المنتجة بوساطة معاملتها كيميائياً بمواد بسيطة باستخدام بروتوكول SLRP بمستضداتها السطحية و خصائصها المورفولوجية السليمة ، وأظهرت قابلية تلازنية للمصل مع المستضدات السطحية للسالمونيلا الحية بعد اتباع البرنامج الكامل للتلقيح .

2 - ارتبط التلقيح تحت الجلد بالـ STGs بشكل كبير باستجابات مناعية ملحوظة مقارنة بالتلقيح عن طريق الفم ، من خلال الاستبعاد الواضح للنمو الجرثومي في الأوساط الزرعية للعينات المأخوذة من الدم ومتجانس الكبد والبراز لدى الجرذان الملقحة .

3 - إن أستحداث سرطان القولون بوساطة مادة الـ (AOM) تم خلال مدة (20)اسبوع وأدى إلى ظهور تغيرات في المظهر العياني والنسجي للقولون تمثل بظهور بؤر الخبىء الشاذ وكذلك إحداث تغيرات نسيجية كبيرة .

4 - أدى التلقيح باستخدام STGs إلى تحفيز الاستجابات المناعية الخلوية عن طريق زيادة مستويات التعبير عن السيتوكينات α - TNF و 4 -TLR في الجرذان الملقحة والمستحثة بسرطان القولون مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .

5 - تسبب التلقيح باستخدام STGs بانخفاض مستوى التعبير في البروتين المناعي PDL-1 في الجرذان الملقحة والمستحثة بسرطان القولون والمستقيم مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي أظهرت استجابة ملحوظة لتأثير المرض على مستويات الـ PDL-1 .

6 - ظهر التأثير الواضح للتلقيح بالـ STGs على مقاييس الاستجابة المناعية حيث حصلت زيادة ملحوظة في كل من العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض بين مجاميع الدراسة إلى جانب الارتفاع الحاصل في عدد كل من الخلايا الحبيبية والخلايا احادية النواة (في مجموعة الجرذان المستحثة بالسرطان والملقحة بالـ STGs) بعد اصابتها بجرثومة الـ *S. Typhymurium* .

7 - إن اشباح بكتيريا الـ *S. Typhymurium* المستحثة كيميائيًا يمكن أن تمثل لقاحًاً واعدًا ساهم في تعزيز الاستجابة المناعية حتى في حالة وجود سرطان القولون ، النتائج تشير إلى إمكانية استخدام اللقاح كعلاج مساعد في تحسين الحالة المناعية للجرذان المصابة بالسرطان .

التوصيات Recommendations

استكمالاً للدراسة والبحث حول الجوانب المتعلقة بجرثومة *S. Typhymurium* ، توصي الدراسة بما يأتي :

1- تقييم معلمات الخلايا التائية ($CD4^+$ و$CD8^+$) باستخدام تحليل التدفق الخلوي Flow Cytometry analysis على الحيوانات المختبرية المستحثة بسرطان القولون والملقحة بأشباح السالمونيلا STGs .

2- امكانية استخدام الأشباح البكتيرية BGs في مجال علاج سرطان القولون كأنظمة مشتركة In combination مع المضادات الحيوية او العلاجات الكيميائية الخاصة بسرطان القولون ، أو كنواقل للقاحات الحمض النووي DNA ، أو كنواقل للعلاجات النانوية .

3- دراسة تأثير لقاح أشباح السالمونيلا STGs على معايير مناعية جديدة في سرطان القولون والمستقيم المستحث في الحيوانات المختبرية مع بيان تأثيره على وظائف الخلايا اللمفاوية .

4- تقدم لقاحات الأشباح البكتيرية BGs قيمة وقائية وعلاجية ذات تأثير محسن لمناعة الجسم وبذلك يتطلب الحاجة إلى دراسة تطبيقها على أنواع سرطانية اخرى التي تمتاز باختلاف مناعتها وتعقيد البيئة المحيطة بالورم وآليات مقاومة العلاج المناعي .

5- دراسة تأثير أنواع بكتيرية اخرى سالبة لصبغة غرام لها الالفة Affinity على التعايش بالقولون نفسه ، و التقصي عن دورها المناعي .

6- دراسة تأثير لقاح أشباح السالمونيلا STGs على الجينات الورمية Oncogenes كـ (*Kras*) والجينات الكابتة للورم Tumor suppressor gene كـ (*P53*) في خلايا سرطان القولون والمستقيم .

7- إستحداث سرطان القولون والمستقيم Colorectal cancer في الجرذان بأتباع بروتوكول معتمد على استعمال المادة المسرطنة Azoxymethane بالاشتراك مع مادة Duxtran Sulfate Sodium (DSS) لغرض تقليل الزمن المتطلب للإستحداث .

المصـــــادر

References

References المصادر

المصادر العربية

الابرص ، محمد قاسم .(2020).الدليل الشامل حول السرطان . بيت الحكمة ، بيروت ، ISBN:9781735647715 ، 193صفحة .

الاعرجي ، نور سليم هاتف .(2023). التحري المظهري والجزيئي لبكتيريا *Salmonella typhimurium* وتأثير بعض الجسيمات النانوية على عوامل ضراوتها .رسالة ماجستير .جامعة القادسية – كلية التربية – قسم علوم الحياة .

الحسن، احمد ابراهيم محمود (2019) .معالجة موضوعات السرطان في الصحف الاردنية اليومية :دراسة تحليلية . رسالة ماجستير .كلية الاعلام – جامعة اليرموك – الاردن.

الحلبي ، مروان وجماعته .(2018). علم الوراثة Medical Genetics. الجمهورية العربية السورية / وزارة التعليم العالي .

الراوي ، زينب سامي حبيب .(2003). دراسة تشخيصية لجرثومة (*Salmonella typhimurium*) المعزولة من المرضى والابقار .رسالة ماجستير .جامعة بغداد ،كلية الطب البيطري ، فرع الاحياء المجهرية .

كرسوع ، مريم عيسى حسين .(2012). مرض السرطان في قطاع غزة .رسالة ماجستير .كلية الآداب- الجامعة الاسلامية– غزة – فلسطين.

مصطفى ، سهى وليد (2020) . التلوث البيئي وأثره في ازدياد إصابات الأطفال بمرض السرطان في محافظة البصرة . مجلة ابحاث البصرة للعلوم الانسانية .العدد 4 – المجلد 45 .

المصادر الاجنبية

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.H. & Pillai, S. (2012). Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System, Elsevier Health Sciences; 239-243.

Abbood, I.S. & Aziz, I.H. (2018). Genetic variation in BRAF gene among Iraqi colorectal cancer patients. *Iraqi J Biotechnol*.;17(3):78-84.

Abenavoli, L.; Scarpellini, E.; Colica, C.; Boccuto, L.; Salehi, B.; Sharifi-Rad, J.; Aiello,V.; & *et al*., (2019). Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients*;11(11):2690. doi: 10.3390/nu11112690.

Abu-Bader, Soleman H. (2021). Using statistical methods in social science research: With a complete SPSS guide.3rd ed.:544 pp .

Abudabos, A. M.; Aljumaah, M. R.; Alkhulaifi, M. M.; Alabdullatif, A.; Suliman, G. M. & Sulaiman, A. R. A. (2020) . Comparative effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on live performance, blood metabolites and intestinal features in broiler inoculated with *Salmonella* infection during the finisher phase. *Microbial Pathogenesis*;139:103870.

Abudoulrahman, K.K.; Mustafa, M.A. & Abduljabbar, A.A. (2019). The Effect of Heat Stress on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Local Quail Hens Supplemented with Onion and Garlic Oils. *Tikrit J. Agric. Sci*.; 19: 103–110.

Aganja, R.P.; Sivasankar, C.; Senevirathne, A. & Lee, J.H.(2022). *Salmonella* as a Promising Curative Tool against Cancer. *Pharmaceutics*; 14: 2100. https://doi.org/10.3390/ pharmaceutics14102100.

Agrawal, N.; Bettegowda, C.; Cheong, I.; Geschwind, J. F.; Drake, C. G.; Hipkiss, E. L.; & *et al*. (2004). Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ;101: 15172–15177. doi: 10.1073/pnas.0406242101.

Ahmad, R.; Singh, J.K.; Wunnava, A.; Al-Obeed, O.; Abdulla, M. & Srivastava, S.K. (2021). Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways. *Int J Mol Med*.;47(3):14. doi: 10.3892/ijmm.2021.4847.

Akimoto, N.; Ugai, T.; Zhong, R.; Hamada, T.; Fujiyoshi, K.; Giannakis, M.; & *et al*. (2021). Rising incidence of early-onset colorectal cancer - a call to action. *Nat Rev Clin Oncol.*;18(4):230-243. doi: 10.1038/s41571-020-00445-1.

Al Alwan, N.A.S. (2022). General Oncology Care in Iraq. In: Al-Shamsi, H.O., Abu-Gheida, I.H., Iqbal, F., Al-Awadhi, A. (eds) Cancer in the Arab World. *Springer*, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7945-2_5.

Al Obeed, O.A.; Alkhayal, K.A.; Al Sheikh, A.; Zubaidi, A.M; Vaali-Mohammed, M-A.; Boushey, R.; & *et al*. (2014).Increased expression of tumor necrosis factor- is associated with advanced colorectal cancer stages. *World J Gastroenterol*;20:18390–6, http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18390.

Al-Azawi, S.; Jassim, I. H.; Alkhuzaee, Q. A., & Naemah, A. J. (2021). New Strategy Of Surface Antigen For (BrMGs) Prepared By SLRP. *Biochemical & Cellular Archives*; 21(2):4981p.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. (2022). Innate immunity. In: Molecular biology of the cell. 4th ed. Garland Science.

Ali, R. H.; Ali, M. E. & Samir, R. (2023). Production and Characterization of Bacterial Ghost Vaccine against *Neisseria meningitidis*. Vaccines; 11(1): 37. DOI: 10.3390/vaccines11010037 .

Aljarshawi, M.; Albadree, H.; Bahar, H. & Al-Imam, A. (2020). Misleading presentation of colorectal cancer in an otherwise healthy patient. *J Faculty Med Baghdad*.;62(4):132-138. doi: 10.32007/jfacmedbagdad.6241800.

Alotaibi, A.G.; Li, J.V. & Gooderham, N.J. (2023). Tumour Necrosis Factor-Alpha (TNF-α)-Induced Metastatic Phenotype in Colorectal Cancer Epithelial Cells: Mechanistic Support for the Role of MicroRNA-21. *Cancers*; 15: 627. https:// doi.org/10.3390/cancers15030627.

Al-Ramadi, B.K.; Fernandez-Cabezudo, M.J.; El-Hasasna, H.; Al-Salam, S.; Attoub, S.; Xu, D. & Chouaib, S. (2008). Attenuated bacteria as effectors in cancer immunotherapy. *Ann New York Acad Sci.*;1138:351–357. doi: 10.1196/annals.1414.036.

Alrubaie, A.; Alkhalidi, N. & Abd-Alhusain, S. (2019).A clinical study of newly-diagnosed colorectal cancer over 2 years in a gastroenterology

center in Iraq. *J Coloproctol (Rio de Janeiro)*.;39:217-222. doi: 10.53350/pjmhs22163328.

Al-Saafeen, B.H.; Al-Sbiei, A.; Bashir, G.; Mohamed, Y.A.; Masad, R.J.; Fernandez-Cabezudo, M.J. & Al-Ramadi, B.K. (2022). Attenuated *Salmonella* potentiate PD-L1 blockade immunotherapy in a preclinical model of colorectal cancer. *Front Immunol*.;13:1017780. doi: 10.3389/fimmu.2022.1017780. PMID: 36605208; PMCID: PMC9807881.

Amara, A. A. (2011). Experimental design for simultaneous production of PHB, mesophilic proteases and lipases. *IIUM Engineering*; 12(2): 155–184.

Amara, A. A. A. F.(2023). Bacterial and Microbial Ghosts Preparation. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* ;48(2): 39607-39616.

Amara, A. A. A. F. & El-Baky, N. A. (2022). Evacuation of Yeast and Fungal Cells Using the Sponge-like Protocol: A New Approach for Fungal Control. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; 12(4): 199–200. https://doi.org/10.7324/japs.2022.120421.

Amara, A.A.; Salem-Bekhit, M.M. & Alanazi, F.K. (2013a). Sponge-like: a new protocol for preparing bacterial ghosts. *Sci World J*; 1-10. ID 545741.

Amara, A.A.; Salem-Bekhit, M.M. & Alanazi, F.K. (2013b): Preparation of bacterial ghosts for *E. coli* JM109 using: sponge-like reduced protocol. *Asian J Biol Sci*; 6: 363–369.

Amara, A. A.; Neama, A. J.; Hussein, A.; Hashish, E. A. & Sheweita, S. A.(2014). Evaluation the surface antigen of the *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ghosts prepared by ―SLRP. *The Scientific World Journal* ; ID 840863 :1-6.

Amin, M.B.; Greene, F.L.; Edge, S.B.; Compton, C.C.; Gershenwald, J.E.; & *et al.* (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*.;67(2):93-99. doi: 10.3322/caac.21388.

Amro, A.A.; Salem-Bekhit, M.M. & Alanazi, F.K. (2014). Plackett-Burman randomization method for bacterial ghosts preparation form *E. coli*

JM109. *Saudi Pharm J.*;22:273–9. https:// doi. org/ 10. 1016/j. jsps. 2013. 06. 002.

Anderson, C.J.; Clark, D.E.; Adli, M. & Kendall, M.M. (2015). Ethanolamine signaling promotes *Salmonella niche* recognition and adaptation during infection. *PLoS Pathog* ; 11: e1005278 .

Arango-Varela, S.S. ; Luzardo-Ocampo, I. & Maldonado-Celis, M.E.(2022). Andean berry (Vaccinium meridionale Swartz) juice, in combination with Aspirin, displayed antiproliferative and pro-apoptotic mechanisms in vitro while exhibiting protective effects against AOM-induced colorectal cancer in vivo. *Food Res. Int.*; 157: 111244. doi: 10.1016/j.foodres.2022.111244.

Archambault, A.N.; Su, Y.R.; Jeon, J.; Thomas, M.; Lin, Y.; Conti, D.V.; & *et al.* (2020). Cumulative Burden of Colorectal Cancer-Associated Genetic Variants Is More Strongly Associated With Early-Onset vs Late-Onset Cancer. *Gastroenterology*.;158(5):1274-1286.e12. doi: 10.1053/j.gastro.2019.12.012.

Arnesen, H.; Müller, M.H.B.; Aleksandersen, M.; Østby, G.C.; Carlsen, H.; Paulsen, J.E. & Boysen, P. (2021). Induction of colorectal carcinogenesis in the C57BL/6J and A/J mouse strains with a reduced DSS dose in the AOM/DSS model. *Lab Anim Res*.;37(1):19. doi: 10.1186/s42826-021-00096-y.

Badie, F.; Ghandali, M.; Tabatabaei, S.A.; Safari, M.; Khorshidi, A. & Shayestehpour M. (2021). Use of *Salmonella* Bacteria in Cancer Therapy: Direct, Drug Delivery and Combination Approaches. *Front. Oncol.*; 11:624759. doi: 10.3389/fonc.2021.624759.

Bahy, R.; Gaber, A.; Zedan, H. & Mabrook, M. (2023). New typhoid vaccine using sponge-like reduced protocol: development and evaluation. *Clinical and Experimental Vaccine Research*; 12(1):70-76.

Bakowski, M.A.; Braun, V. & Brumell, J.H. (2008). *Salmonella* containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*. ; 9:2022–2031.

Banday, M.Z.; Balkhi, H.M.; Hamid, Z.; Sameer, A.S.; Chowdri, N.A. & Haq, E. (2016). Tumor necrosis factor-α (TNF-α)-308G/A promoter polymorphism in colorectal cancer in ethnic Kashmiri population - A case control study in a detailed perspective. *Meta Gene*.;9:128-36. doi: 10.1016/j.mgene.2016.06.001.

Baron, F & Finegold, S. (1994). Diagnostic Microbiology 7th ed. The C.V. Mosby company, Baltimore.

Batah, A. M., & Ahmad, T. A. (2020). The development of ghost vaccines trials. *Expert review of vaccines*; 19(6): 549-562 . https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1777862 .

Beilmann-Lehtonen, I.; Böckelman, C.; Mustonen, H.; Koskensalo, S.; Hagström, J. & Haglund, C. (2020). The prognostic role of tissue TLR2 and TLR4 in colorectal cancer. *Virchows Arch*.;477(5):705-715. doi: 10.1007/s00428-020-02833-5.

Bhatia , R. & Ichhpujani, R.L.(2008). Essential Of Medical Microbiology . Jaypee Brother Medical Publishers(P)Ltd . 4th ed. : 458-461.

Bird, R.P .(1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. Cancer Lett.; 37: 147-151.

Boussiotis, V.A. (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*.;375(18):1767-1778. doi: 10.1056/NEJMra1514296.

Boutilier, A.J. & Elsawa, S.F. (2021). Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* ;22:6995. doi: 10.3390/ijms22136995.

Bretthauer, M.; Kaminski, M.F.; Løberg, M.; Zauber, A.G.; Regula, J.; Kuipers, E.J.; & *et al*. (2016). Population-Based Colonoscopy Screening for Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*.;176(7):894-902. doi: 10.1001/jamainternmed.2016.0960.

Brown, A.E. & Auburn, U. (2012). Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in general Microbiology Complete Version. 12th Ed. McGraw- Hill.

Burnett-Hartman, A.N.; Lee, J.K.; Demb, J. & Gupta, S. (2021). An update on the epidemiology, molecular characterization, diagnosis, and screening strategies for early-onset colorectal cancer. *Gastroenterology*.;160(4):1041-1049. doi: 10.1053/j.gastro.2020.12.068.

Cammarota, R.; Bertolini, V.; Pennesi, G.; Bucci, E.O.; Gottardi, O.; Garlanda, C.; & *et al*. (2010).The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med*.;8:112.

Cancer Registry of Iraq Annual Report 2022. Iraqi Cancer Board, Ministry of Health, Republic of Iraq, 2022. https:// *iqcaboard @moh.gov.iq* .

Cao, J.; Zhang, J.; Ma, L.; Li, L.; Zhang, W. & Li, J. (2018).Identification of fish source *Vibrio alginolyticus* and evaluation of its bacterial ghosts vaccine immune effects.. *Microbiologyopen*.;7(3):e00576. doi: 10.1002/mbo3.576.

Carvalho, S.B.; Peixoto, C.; Carrondo, M.J.T. & Silva, R.J.S. (2021). Downstream Processing for Influenza Vaccines and Candidates: An Update. *Biotechnol. Bioeng*.; 118: 2845–2869.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2023). Drug-Resistant Non typhoidal Salmonella. https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/nt-salmonella-508.pdf .

Chakrabarti, S.; Peterson, C.Y.; Sriram, D. & Mahipal, A. (2020).Early stage colon cancer: Current treatment standards, evolving paradigms, and future directions. *World J Gastrointest Oncol*; 12(8): 808-832.

Chaudhary, J. H.; Nayak, J. B.; Brahmbhatt, M. N. & Makwana, P. P. (2015). Virulence genes detection of *Salmonella serovars* isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Veterinary world*; 8(1): 121.

Chen, F.W.; Sundaram, V.; Chew, T.A. & Ladabaum, U .(2017). Advanced-Stage Colorectal Cancer in Persons Younger Than 50 Years Not Associated With Longer Duration of Symptoms or Time to Diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* ;15: 728–737 e723.

Chen, J.; Qiao, Y.; Tang, B.; Chen, G.; Liu, X.; Yang, B.; & *et al*.(2017) . Modulation of *Salmonella* tumor-colonization and intratumoral anti-angiogenesis by triptolide and its mechanism . *Theranostics*. ;7:2250–2260. doi: 10.7150/thno.18816.

Chen, Q.; Li, T. & Yue, W. (2018). Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: based on biomarkers. *Onco Targets Ther*;11:4673– 83.

Chen, H.; Ji, H.; Kong, X.; Lei, P.; Yang, Q.; Wu, W. & *et al*. (2021). Bacterial ghosts-based vaccine and drug delivery systems. *Pharmaceutics*; 13(11): 1892.

Chen, M. C.; Pangilinan, C.R. & Lee, C. H. (2019). Salmonella Breaks Tumor Immune Tolerance by Downregulating Tumor Programmed Death-Ligand 1 Expression. *Cancers*; 12: 57. doi: 10.3390/cancers12010057.

Chen, X.; Tao, Y.; He, M.; Deng, M.; Guo, R.; Sheng, Q.; & *et al*. (2021). Co-delivery of autophagy inhibitor and gemcitabine using a pH-activatable core-shell nanobomb inhibits pancreatic cancer progression and metastasis. *Theranostics* ;11: 8692–8705. doi: 10.7150/thno.60437.

Chen, Z.; Yong, T.; Wei, Z.; Zhang, X.; Li, X.; Qin, J. & *et al*. (2024). Engineered Probiotic-Based Personalized Cancer Vaccine Potentiates Antitumor Immunity through Initiating Trained Immunity. *Adv Sci* (Weinh).;11(3):e2305081. doi: 10.1002/advs.202305081.

Chesbrough, M. (2012). District Laboratory Practice in Tropical Countries. 2nd edition update (part 2), Cambridge university press.

Chettab, K.; Fitzsimmons, C.; Novikov, A.; Denis, M.; Phelip, C.; Mathé, D.; & *et al*. (2023). A systemically administered detoxified TLR4 agonist displays potent antitumor activity and an acceptable tolerance profile in preclinical models. *Front Immunol.*; 14: 1066402.

Choe, E.; Kazmierczak, R.A. & Eisenstark, A. (2014). Phenotypic evolution of therapeutic *Salmonella enterica* serovar typhimurium after invasion of TRAMP mouse prostate tumor. *mBio* ; 5: e01182–14.

Chorobik, P. & Marcinkiewicz, M. (2011). Therapeutic vaccines based on genetically modified *Salmonella*: a novel strategy in cancer immunotherapy. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* **;**121(12): 461–466.

Chorobik, P.; Czaplicki, D.; Ossysek, K. & Bereta, J. (2013).*Salmonella* and cancer: from pathogens to therapeutics. *Acta Biochim Pol*.;60(3):285-97.

Ciesielska, A.; Matyjek, M. & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*.;78(4):1233-1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.

Cobb, B.A. ;Wang, Q.; Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. (2004).Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell*; 117: 677–687.

Coico ,R. & Sunshine, G.(2009). Immunology : a short course . Wiley-Black Well . 6th ed. :309-311.

Collee , J. G. ; Marmion , B. P. ; Fraser , A. G. and Simmons , A. (1996). Mackie and McCartney medical microbiology . 14th ed., The Churchill Livingstone . Inc. USA.

Collins, C.H. & Lyne; P.M. (1987). Microbiological Methods. 5th ed. Butteworths Co. puplishers Ltd. U.K.

Cruickshank, R. (1965). Medical Microbiology, E. and S. Livingstone, London, UK, 11th edition.

Culling, C. F. A.(1981). Handbook of histopathological and histochemical techniques.3rd edition. Butter Worth.p:712-720.

Davidsohn, I.(2001). Clinical diagnosis by laboratory methods.15th ed. Saunders company. London. Toronto .

de Waard, R.; Claassen, E.; Bokken, G.C.; Buiting, B.; Garssen, J. & Vos, J.G. (2003). Enhanced immunological memory responses to *Listeria monocytogenes* in rodents, as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *Lactobacillus casei* Shirota ingestion. *Clin Diagn Lab Immunol*.;10(1):59-65. doi: 10.1128/cdli.10.1.59-65.2003.

Dejager, L.; Pinheiro, I.; Bogaert, P.; Huys, L. & Libert, C. (2010). Role for neutrophils in host immune responses and genetic factors that modulate resistance to *Salmonella enterica serovar* Typhimurium in the inbred mouse strain SPRET/Ei. Infection and immunity; 78(9): 3848-3860.

Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M. & Wallace, M.B. (2019) . Colorectal cancer. *Lancet*.;394(10207):1467-1480. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.

DeNardo, D.G., & Ruffell, B. (2019). Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* ;19:369–382. doi: 10.1038/s41577-019-0127-6.

Dentovskaya, S.V.; Vagaiskaya, A.S.; Platonov, M.E.; Trunyakova, A.S.; Kotov, S.A.; Krasil'nikova, E.A. & *et al*. (2021).Peptidoglycan-Free Bacterial Ghosts Confer Enhanced Protection against *Yersinia pestis* Infection. *Vaccines* (Basel).;10(1):51. doi: 10.3390/vaccines10010051.

DiGiandomenico, A.; Rao, J. & Goldberg, J.B. (2004). Oral Vaccination of BALB/c Mice with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Expressing *Pseudomonas aeruginosa* O Antigen Promotes Increased Survival in an Acute Fatal Pneumonia. *Model. Infect. Immun*.; 72: 7012–7021.

Dillon, A. & Lo, D.D. (2019).M cells: Intelligent engineering of mucosal immune surveillance. *Front. Immunol.*; 10: 1499.

Dobrovolskienė, N,.; Pašukonienė, V.; Darinskas, A.; Kraśko, J.A.; Žilionytė, K.; Mlynska, A. & *et al.* (2018).Tumor lysate-loaded Bacterial Ghosts as a tool for optimized production of therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines. *Vaccine*;36(29):4171-4180. doi: 10.1016/j.vaccine. 2018.06.016.

Dzutsev, A.; Badger, J.H.; Perez-Chanona, E.; Roy, S.; Salcedo, R.; Smith, C.K. & *et al*. (2017). Microbes and cancer. *Annu Rev Immunol*.;35:199–228. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052133. PMID:28142322.

Ebrahimzadeh , S.; Ahangari , H.; Soleimanian , A.; Hosseini , K.; Ebrahimi , V.; Ghasemnejad , T.; & *et al.* (2021). Colorectal cancer treatment using bacteria: focus on molecular mechanisms. *BMC Microbiology* ; 21:218 https://doi.org/10.1186/s12866-021-02274-3.

Edinger, M.; Iftimi, L. D.; Markl, D.; Al-Sharabi, M.; Bar-Shalom, D.; Rantanen, J.; & *et al.* (2019).Quantification of Inkjet-Printed Pharmaceuticals on Porous Substrates Using Raman Spectroscopy and Near-Infrared Spectroscopy. AAPS *Pharm. Sci. Tech*. ; 20: 1–12.

Eko, F.O.; Mania-Pramanik, J.; Pais, R.; Pan, Q.; Okenu, D.M.N.; Johnson, A. & *et al*. (2015).*Vibrio cholerae* ghosts (VCG) exert immunomodulatory effect on dendritic cells for enhanced antigen presentation and induction of protective immunity. *BMC Immunol*.;15(584):1–12. https:// doi. org/ 10. 1186/ s12865-014-0056-x.

Ektate, K.; Munteanu, M.C.; Ashar, H.; Malayer, J. & Ranjan, A. (2018). Chemo-immunotherapy of colon cancer with focused ultrasound and *Salmonella*-laden temperature sensitive liposomes (thermobots). *Sci Rep*.;8(1):13062. doi: 10.1038/s41598-018-30106-4.

El-Baky, N. A.; Abdel Rahman, R. A.; Sharaf, M. M. & Amara, A. A. A. F. (2021). The development of a phytopathogenic fungi control trial: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* infection in jojoba tissue culture as a model. *The Scientific World Journal*; 2021:1-8.

Elnekave, E.; Hong, S. L.; Lim, S.; Boxrud, D.; Rovira, A.; Mather, A. E. & *et al*. (2020). Transmission of multidrug-resistant *Salmonella enterica*

subspecies *enterica* 4, [5], 12: i:-sequence type 34 between Europe and the United States. *Emerging infectious diseases*; 26(12): 3034.

Elzouki, A.N.; Habel, S.; Alsoaeiti, S.; Abosedra, A. & Khan, F. (2014). Epidemiology and clinical findings of colorectal carcinoma in two tertiary care hospitals in Benghazi, Libya. *Avicenna J Med*.;4(4):94-8.

Enejiyon, S.O.; Adabara, N.U.; Wuna, M.M. & Fasasi ,R.A. (2020). *Salmonella typhimurium* as a potential anticancer agent: A Review. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases* ;10(2):98-113. http://dx.doi.org/10.4038/sljid.v10i2.8289.

Eng, S. K.; Pusparajah, P.; Ab Mutalib, N. S.; Ser, H. L.; Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*; 8(3): 284–293. https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243.

Eyvazi, S.; Vostakolaei, M.A.; Dilmaghani, A.; Borumandi, O.; Hejazi, M.S.; Kahroba, H. & *et al*. (2020).The oncogenic roles of bacterial infections in development of cancer. *Microb Pathog*.;141:104019. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104019.

Fàbrega, A. & Vila, J. (2013).*Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.*; 26: 308–341.

Fan, Y.; Bai, T.; Tian, Y.; Zhou, B.; Wang, Y. & Yang, L. (2021). H_2O_2-Inactivated *Salmonella typhimurium* RE88 Strain as a New Cancer Vaccine Carrier: Evaluation in a Mouse Model of Cancer. *Drug Des Devel Ther*.;15:209-222. doi: 10.2147/DDDT.S282660.

Fan, T.; Zhang, M.; Yang, J.; Zhu, Z.; Cao, W, & Dong, C. (2023). Therapeutic cancer vaccines: advancements, challenges, and prospects. *Signal Transduct Target Ther*.;8(1):450. doi: 10.1038/s41392-023-01674-3.

Farashi-Bonab, S. & Khansari, N. (2019).*Salmonella*-Based Anticancer Vaccines and Their Efficacy. *Vaccin. Res. Open J*.; 4(1): 5-11. doi: 10.17140/VROJ-4-111.

Farhad, R.M.; Saleh, E.S. & Alsammarraie, A.Z. (2023).Clinicopathological features of colorectal cancer in the Iraqi population focusing on age and early-onset of malignancy: A descriptive cross-sectional study. *Al-Rafidain J Med Sci*.;5:86-91. doi: https://doi.org/10.54133/ajms.v5i.158.

Fattinger, S.A.; Sellin, M.E. & Hardt, W.D. (2021).*Salmonella* effector driven invasion of the gut epithelium: Breaking in and setting the house on fire. *Curr. Opin. Microbiol.*; 64: 9–18.

Feasey, N. A.; Dougan, G.; Kingsley, R. A.; Heyderman, R. S. & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*; 379(9835): 2489-2499.

Felgner, S.; Kocijancic, D.; Frahm, M.; Curtiss, R.; Erhardt, M. & Weiss, S. (2016). Optimizing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for bacteria-mediated tumor therapy. *Gut Microbes* ;7: 171–177. doi: 10.1080/19490976.2016.1155021.

Felgner, S.; Kocijancic, D.; Frahm, M.; Heise, U.; Rohde, M.; Zimmermann, K. & *et al*. (2018) .Engineered *Salmonella enterica* serovar Typhimurium overcomes limitations of anti-bacterial immunity in bacteria-mediated tumor therapy. *Oncoimmunology*.;7(2):e1382791.

Felgner, S.; Spöring, I.; Pawar, V.; Kocijancic, D.; Preusse, M.; Falk, C. & *et al*.. (2020). The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy. *Int J Cancer* ;147(2):448–60.

Felix, A. & Callow, B. R. (1943). Typing of paratyphoid B bacilli by means of VI bacteriophage: a report to the medical research council. *British Medical Bulletin*; 1(8): p. 91.

Fleming, M.; Ravula, S.; Tatishchev, S.F.; & Wang, H.L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*.;3(3):153-173. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891..030.

Forbes, B. A.; Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. (2007). Bailey and Scott, S. Diagnostic Microbiology . 12th ed. Mosby . inc . U.S.A.

Forbes, N. S.; Coffin, R. S.; Deng, L.; Evgin, L.; Fiering, S.; Giacalone, M. & *et al*. (2018). White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention. *J. Immunother. Cancer* ;6:78. doi: 10.1186/s40425-018-0381-3.

Galán, J.E. (2021).*Salmonella typhimurium* and inflammation: A pathogen-centric affair. *Nat. Rev. Microbiol.* ; 19: 716–725.

Ganai, S.; Arenas, R. B.; Sauer, J. P.; Bentley, B. & Forbes, N. S. (2011). In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis. *Cancer gene therapy* ;18: 457–466.

Ganeshpurkar, A.; Ganeshpurkar, A.; Pandey, V.; Agnihotri, A.; Bansal, D. & Dubey, N. (2014). Harnessing the potential of bacterial ghost for the effective delivery of drugs and biotherapeutics. *Int. J. Pharm. Investig.*; 4: 1–4.

García-Álvarez, R. & Vallet-Regí, M. (2022). Bacteria and cells as alternative nano-carriers for biomedical applications. *Expert Opin Drug Deliv.*;19(1):103-118. doi: 10.1080/17425247.2022.2029844.

Gorjifard, S. & Goldszmid, R.S. (2016). Microbiota-myeloid cell crosstalk beyond the gut. *J Leukoc Biol*;100:865e79.

Gossé, F.; Guyot, S.; Roussi, S.; Lobstein, A.; Fischer, B.; Seiler, N. & *et al.* (2005).Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*; 26(7):1291-5. doi: 10.1093/carcin/bgi074.

Grassl, G.A. & Finlay, B.B. (2008). Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*.; 24:22–26.

Grille, S. ; Moreno, M. ; Bascuas, T. ; Marqués, J.M. ; Muñoz, N. ; Lens, D. & *et al.* (2014).*Salmonella enterica* serovar typhimurium immunotherapy for B-cell lymphoma induces broad anti-tumour immunity with therapeutic effect . *Immunology* ;143(3):428–437.*https://doi.org/10.1111/imm.12320* .

Groza, D.; Gehrig, S.; Kudela, P.; Holcmann, M.; Pirker, C.; Dinhof, C. & *et al*.. (2018). Bacterial ghosts as adjuvant to oxaliplatin chemotherapy in colorectal carcinomatosis.*Oncoimmunology*.;7(5):e1424676. doi: 10.1080/2162402X.2018.1424676.

Grupper, A.; Sharon, N.; Finn, T.; Cohen, R.; Israel, M. & Agbaria, A. (2021). Humoral Response to the Pfizer BNT162b2 Vaccine in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. ;16(7):1037-1042. doi: 10.2215/CJN.03500321.

Guard, J. (2022). Through the Looking Glass: Genome, Phenome, and Interactome of *Salmonella enterica*.*Pathogens*;11:581. https://doi.org/10.3390/pathogens11050581.

Guo, Y.; Chen, Y.; Liu, X.; Min, J.J.; Tan, W. & Zheng, J.H. (2020) .Targeted cancer immunotherapy with genetically engineered oncolytic *Salmonella typhimurium*. *Cancer Lett* ;469:102–10. 10.1016/j.canlet.2019.10.033.

Hajam, I.A.; Dar, P.A.; Won, G. & Lee, J.H. (2017). Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Vet. Res*.; 48: 1-13. https:// doi. org/10. 1186/ s13567- 017- 0442-5.

Harley, J. & Prescott, L. (1996). Laboratory Exercises in Microbiology. 3rd edition. WCB/McGrow-Hill, USA.

Hendler, R. & Zhang, Y.(2018). Probiotics in the Treatment of Colorectal Cancer. Medicines (Basel).;5(3):101. doi: 10.3390/medicines5030101.

Hernandez-Luna, M.A. & Luria-Perez, R. (2018). Cancer immunotherapy: priming the host immune response with live attenuated *Salmonella enterica*. *J Immunol Res* ; 2018: 2984247.

Hiroshima, Y.; Zhang, Y.; Zhao, M.; Zhang, N.; Murakami, T.; Maawy, A. & *et al.* (2015).Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R in combination with trastuzumab eradicates HER-2-positive cervical cancer cells in patient-derived mouse models . *PLoS One*. ;10:e0120358. doi: 10.1371/journal.pone.0120358.

Holay, M.; Guo, Z.; Pihl, J.; Heo, J.; Park, J.H.; Fang, R.H.& *et al.* (2021). Bacteria-Inspired Nanomedicine. *ACS Appl Bio Mater*.; 4(5):3830-3848. doi: 10.1021/acsabm.0c01072.

Hong, E.H.; Chang, S.Y.; Lee, B.R.; Pyun, A.R.; Kim, J.W.; Kweon, M.N. & *et al.* (2013). Intratumoral Injection of Attenuated *Salmonella* Vaccine Can Induce Tumor Microenvironmental Shift from Immune Suppressive to Immunogenic. *Vaccine*, 31, 1377–1384.

Horiuchi, Y.; Nakamura, A.; Imai, T. & Murakami, T. (2024).Infection of tumor cells with *Salmonella typhimurium* mimics immunogenic cell death and elicits tumor-specific immune responses. *PNAS Nexus*.;3(1): 484pp. doi: 10.1093/pnasnexus/pgad484.

Hossain, M.M.M.; Ehsan, A.; Rahman, M.A.; Chowdhury, M.B.R. & Haq, M. (2012). Responses of monosex nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) to intraperitoneal challenge by *Streptococcus iniae* after vaccination with ghosts of the bacterium. *Bangl Vet*.; 29: 31-7.

Hougen, H.P.; Jensen, E.T. & Klausen , B. (1989). Experimental *Salmonella typhimurium* infections in rats. I: Influence of thymus on the course of infection. *APMIS*.; 97: 825-32.

Huaizhu,W.; Prince, J.E.; Brayton, C.F.; Shah, C.; Zeve, D.; Gregory, S.H. & *et al.* (2003).Host resistance of CD18 knockout mice against

systemic infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*.;71(10):5986-93. doi: 10.1128/IAI.71.10.5986-5993.2003.

Huang, F.; Qianhui, S.; Zhaojie, Q.; Jianglin, T.; Zhengding, S.; Yongqi, H. & *et al.* . (2020).Anticancer actions of azurin and its derived peptide p28. *Protein J*.; 39(2):182-9.

Ibrahem, S.; Ahmed, H. & Zangana, S.(2022). Trends in colorectal cancer in Iraq over two decades: incidence, mortality, topography and morphology. *Ann Saudi Med*; 42(4): 252-261. DOI: 10.5144/0256-4947.2022.252.

Igarashi, K.; Kawaguchi, K.; Kiyuna, T.; Miyake, K.; Miyake, M.; Li, S. & *et al.* (2018).Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R combined with recombinant methioninase and cisplatinum eradicates an osteosarcoma cisplatinum-resistant lung metastasis in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model: decoy, trap and kill chemotherapy moves toward the clinic . *Cell Cycle*.;17:801–809. doi: 10.1080/15384101.2018.1431596.

Jabbar, A.A.; Ibrahim, I.A.A.; Abdullah, F.O.; Aziz, K.F.; Alzahrani, A.R.; Abdulla, M.A. (**2023).** Chemopreventive Effects of Onosma mutabilis against Azoxymethane- Induced Colon Cancer in Rats via Amendment of Bax/Bcl-2 and NF-_B Signaling Pathways. *Curr. Issues Mol. Biol*.; 45: 885–902. https:// doi.org/10.3390/cimb45020057 .

Janku, F.; Zhang, H.H.; Pezeshki, A.; Goel, S.; Murthy, R.; Wang-Gillam, A. & *et al*.(2020). Intratumoral injection of clostridium novyi-nt spores in patients with treatment- refractory advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*.;27:96–106.

Jawalagatti, V.; Kirthika, P. & Lee, J.H. (2022a). Targeting primary and metastatic tumor growth in an aggressive breast cancer by engineered tryptophan auxotrophic Salmonella Typhimurium. *Mol. Ther. Oncolytics.* ;25:350–363.

Jawalagatti, V.; Kirthika, P. & Lee, J.H. (2022b). Oral mRNA Vaccines against Infectious Diseases—A Bacterial Perspective [Invited]. *Front. Immunol.* ;13:884862. doi: 10.3389/fimmu.2022.884862.

Jawetz, E.; Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S.; Morese, S.A. & Mietzner, T.A. (2013). Jawetz-Melnick and Adelberg‘s Medical Microbiology. 26^{ed}. *McGraw Hill Com.*, Singapore.

Ji, S.; Moon, E. S.; Noh, H. B.; Park, H. J.; Kim, S.; Oh, S.; & *et al*.(2022). Protective immunity against *listeria monocytogenes* in rats, provided by HCL-and NaOH-induced *listeria monocytogenes* bacterial ghosts (LMGs) as vaccine candidates. *International Journal of Molecular Sciences*; 23(4): 1946.

Jing, X.; Yang, F.; Shao, C.; Wei, K.; Xie, M.; Shen, H. & *et al*.(2019).Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol. Cancer*. ;18:157. doi: 10.1186/s12943-019-1089-9.

Johnson, R.L. & Fleet, J.C. (2013).Animal models of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* .**;**32: 39–61. https://doi.org/10.1007/s10555-012-9404-6.

Jorge, N.A.N.; Cruz, J.G.V.; Pretti, M.A.M.; Bonamino, M.H.; Possik, P.A. & Boroni, M. (2020).Poor clinical outcome in metastatic melanoma is associated with a microRNA-modulated immunosuppressive tumor microenvironment. *J Transl Med*. . ;18:56. doi: 10.1186/s12967-020-02235-w.

Jurescu, A.; V˘aduva, A.; Vit, A. O.; Gheju, A.; Cornea, R.; L˘azureanu, C. & *et al*. (2023). Colorectal Carcinomas: Searching for New Histological Parameters Associated with Lymph Node Metastases. *Medicina*; 59: 1761. https://doi.org/10.3390/ medicina59101761.

Kadhim, A. A. (2020). Isolation and Identification *Salmonella* ssp from Local and Imported Chicken Meat by using VIDAS®-Up *Salmonella*. *Journal of Madenat Alelem University College*; 12(2): 156-163.

Kaimala, S.; Mohamed, Y.A.; Nader, N.; Issac, J.; Elkord, E.; Chouaib, S. & *et al*. (2014).*Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity . *Cancer Immunol Immunother*. . ;63:587–599. doi: 10.1007/s00262-014-1543-x.

Kaimala, S.; Al-Sbiei, A.; Cabral-Marques, O.; Fernandez-Cabezudo, M.J. & Al-Ramadi, B.K. (2018). Attenuated Bacteria as Immunotherapeutic Tools for Cancer Treatment. *Front Oncol*.;8:136. doi: 10.3389/fonc.2018.00136.

Kallas, P.; Kang, H.; Valen, H.; Haugen, H. J.; Andersson, M. & Hulander, M. (2020). Effect of silica nano-spheres on adhesion of oral bacteria and human fibroblasts. *Biomaterial investigations in dentistry*; 7(1): 134-145.

Kang, S. R.; Nguyen, D. H.; Yoo, S. W. & Min, J. J. (2022). Bacteria and bacterial derivatives as delivery carriers for immunotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 181:114085. doi: 10.1016/j.addr.2021.114085.

Karagöz, A. ; Acar , S. & Körkoca , H. (2015). Characterization of *Klebsiella* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and determination of antimicrobial resistance with VITEK 2 advanced expert system (AES). *Turkish Journal of Medical Sciences*; 45(6):1335-1344. https://doi.org/10.3906/sag-1401-32.

Karpiński, T.M.; Finglas, P.M. & Toldra, F. (2016). Encyclopedia of Food and Health. Bacteriocins. Germany: *Elsevier*.

Kaur, J.; Jain, S.K. & Malik, R.K. (2021).*Salmonella* pathogenesis: where do we stand and what do we aim to achieve? Reviews in Medical Microbiology.;32(2):71–84.

Kaur, S. & Kaur, S. (2015). Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front Pharmacol.*;6:272. doi: 10.3389/fphar.2015.00272.

Keshta, A. T.; Mohammed ,F. Z.; Hassan ,M. A. & Sheweita, S. A.(2023). Production and Evaluation of the Immunogenicity of an *Enterobacter aerogenes* Ghost Vaccine in a Mouse Model. *Egypt. J. Chem.* ; 66(10): 539 - 547 pp.

Keum, N. & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*;16(12):713-732. doi: 10.1038/s41575-019-0189-8.

Keung, E.Z.; Fairweather, M. & Raut, C.P. (2016).Surgical Management of Metastatic Disease . *Surg. Clin. North Am.* ;96:1175–1192. doi: 10.1016/j.suc.2016.05.010.

Kim, S. H.; Castro, F.; Paterson, Y. & Gravekamp, C. (2009). High efficacy of a *listeria*-based vaccine against metastatic breast cancer reveals a dual mode of action. *Cancer Res.* ;69: 5860–5866. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-4855.

Kim, G.; Baik, S.H.; Lee, K.Y.; Hur, H.; Min, B.S.; Lyu, C.J. & *et al*.(2013).Colon carcinoma in childhood: Review of the literature with four case reports. *Int J Colorectal Dis.*;28(2):157-64.

Kim, S.E.; Paik, H.Y.; Yoon, H.; Lee, J.E.; Kim, N. & Sung, M.K. (2015). Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World journal of gastroenterology*.;21(17):5167-75.

Kim, H.J.; Kim, H.; Lee, J.H. & Hwangbo, C. (2023). Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. *Immun Ageing*.;20(1):67. doi: 10.1186/s12979-023-00383-3.

Kiyuna, T.; Murakami, T.; Tome, Y.; Kawaguchi, K.; Igarashi, K.; Zhang, Y. & *et al.* (2016).High efficacy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R on a doxorubicin- and dactolisib-resistant follicular dendritic-cell sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft PDOX nude mouse model . *Oncotarget*.;7:33046–33054. doi: 10.18632/oncotarget.8848.

Koc, A. M.; Celik, S. U. & Akyol, C. (2019) . Colon Cancer . In : Current Trends in Cancer Management . *IntechOpen* : 1–26 . http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81597.

Kocijancic, D.; Felgner, S.; Frahm, M.; Komoll, R. M.; Iljazovic, A.; Pawar, V. & *et al.* (2016). Therapy of solid tumors using probiotic Symbioflor-2: restraints and potential. *Oncotarget* ;7: 22605–22622. doi: 10.18632/ oncotarget.8027.

Kocijancic, D.; Leschner, S.; Felgner, S.; Komoll, R. M.; Frahm, M.; Pawar, V. & *et al.* (2017).Therapeutic Benefit of *Salmonella* Attributed to LPS and TNF-α Is Exhaustible and Dictated by Tumor Susceptibility. *Oncotarget*; 8: 36492–36508. *doi: https://doi.org/10.18632/oncotarget.16906*.

Koller, V.J.; Dirsch, V.M.; Beres, H.; Donath, O.; Reznicek, G.; Lubitz, W. & et al. (2013). Modulation of bacterial ghosts--induced nitric oxide production in macrophages by bacterial ghost-delivered resveratrol. *FEBS J*.;280(5):1214-25. doi: 10.1111/febs.12112.

Kowalczyk, M.; Siermontowski, P.; Mucha, D.; Ambroży, T.; Orłowski, M.; Zinkiewicz, K. & *et al.* (2016).Chromoendoscopy with a standard‐resolution colonoscope for evaluation of rectal aberrant crypt foci. *PLoS One*; 11: e0148286.

Krtolica, A.; Parrinello, S.; Lockett, S.; Desprez, P-Y. & Campisi, J. (2001) . Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumori-genesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.;98(21):12072.

Kuan, Y.D. & Lee, C.H. (2016).*Salmonella* overcomes tumor immune tolerance by inhibition of tumor indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression . *Oncotarget.* ;7:374–385. doi: 10.18632/oncotarget.6258.

Kudo, S.E.; Ichimasa, K.; Villard, B.; Mori, Y.; Misawa, M.; Saito, S.; & *et al.* (2021).Artificial Intelligence System to Determine Risk of T1 Colorectal Cancer Metastasis to Lymph Node. *Gastroenterology*; 160: 1075–1084.e2.

Kuipers, E.J.; Rösch, T. & Bretthauer, M. (2013). Colorectal cancer screening-optimizing current strategies and new directions. *Nat Rev Clin Oncol*.;10(3):130-42.

Kuipers, E.J.; Grady, W.M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T.; Sung, J.J.; Boelens, P.G. & *et al.* . (2015).Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* ;1:15065. doi: 10.1038/nrdp..65.

Kumar, H.; Kawai, T. & Akira, S. (**2009).**Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* ; 420: 1–16.

Kumar, S.; Sunagar, R. & Gosselin, E. (2019). Bacterial protein toll-like receptor agonists: a novel perspective on vaccine adjuvants. *Front Immunol* ;10: 1144. https:// doi. org/ 10. 3389/ fimmu. 2019. 01144.

Kumar, V.; Abbas, A. K.; Aster, J. C. & Deyrup, A. T.(2021). Gastrointestinal System, In: ROBBINS ESSENTIAL PATHOLOGY. *Elsevier* ; 1st Ed. :205-220 .ISBN: 978-0-323-64025-1.

Labani-Motlagh, A.; Ashja-Mahdavi, M. & Loskog, A. (2020). The tumor microenvironment: a milieu hindering and obstructing antitumor immune responses. *Front Immunol*.;11:940. doi: 10.3389/fimmu.2020.00940.

Lafta, I.J. (2017). Crude Anthrax Protective Antigen Enhances Immunity For *Salmonella Typhimurium* in Mice. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*.;59(2):179-85. https://doi.org/10.32007/jfacmedbagdad.592133**.**

Laliani, G.; Ghasemian Sorboni, S.; Lari, R.; Yaghoubi, A.; Soleimanpour, S.; Khazaei, M. & *et al.* (2020). Bacteria and cancer: Different sides of the same coin. *Life Sci* ; 246:117398. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117398.

Lalsiamthara, J. ;Won ,G. & Lee, J.H. (2018).Effect of immunization routes and protective efficacy of *Brucella* antigens delivered via *Salmonella*

vector vaccine, *J. Vet. Sci*. ;19: 416–425. https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.3.416.

Lamichhane, B.; Mawad, A.M.M.; Saleh, M.; Kelley, W.G.; Harrington, P.J.; Lovestad, C.W. & *et al*. (2024). Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. *Antibiotics* ; *13*: 76. https://doi.org/10.3390/antibiotics13010076.

Lázaro-Gorines, R.; Ruiz-de-la-Herrán, J.; Navarro, R.; Sanz, L.; Álvarez-Vallina, L.; Martínez-Del-Pozo, A. & *et al*. (2019). A novel Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Targeted Trimeric Immunotoxin shows significantly enhanced Antitumor Activity in Human Colorectal Cancer Xenografts. Sci Rep. ;9(1):11680.

Lee, C.H. ;Wu, C. L. & Shiau, A. L. (2008). Toll-like Receptor 4 Mediates an Antitumor Host Response Induced by *Salmonella Choleraesuis*. *Clin. Cancer Res.*; 14: 1905–1912.

Lee, C.H.; Hsieh, J.L.; Wu, C.L.; Hsu, H.C. & Shiau, A.L. (2011). B cells are required for tumor-targeting *Salmonella* in host . *Appl Microbiol Biotechnol.*;92:1251–1260. doi: 10.1007/s00253-011-3386-0.

Lee, C.H. (2012). Engineering bacteria toward tumor targeting for tumor treatment: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*; 93:517–523 *doi: http://doi.org/10.1007/s00253-011-3695-3*.

Lewies, A.; Du Plessis, L.H. & Wentzel, J.F. (2018). The cytotoxic, antimicrobial and anticancer properties of the antimicrobial peptide Nisin Z alone and in combination with conventional treatments. *Cytotoxicity*.;21. https://doi. org/10.5772/intechopen.71927.

Li, W. & Li, CB. (2003). Lack of inhibitory effects of lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *World J Gastroenterol*.; Nov;9(11):2469-73. doi: 10.3748/wjg.v9.i11.2469.

Li, J.; Yang, F.;Wei, F. & Ren, X. (2017). The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget*. ; 8(39) :66656-66667. doi: 10.18632/oncotarget.19105.

Li, B.; Wang, Y.; Yin, L.; Huang, G.; Xu, Y.; Su, J. & *et al*.(2019). Glucocorticoids promote the development of azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colorectal carcinoma in mice. *BMC Cancer*; 19(1):94. doi: 10.1186/s12885-019-5299-8.

Li, Z.; Wang, Y.; Liu, J.; Rawding, P.; Bu, J.; Hong, S. & *et al*.(2021). Chemically and Biologically Engineered Bacteria-Based Delivery Systems for Emerging Diagnosis and Advanced Therapy. *Adv Mater*.;33(38):e2102580. doi: 10.1002/adma.202102580.

Li, C.; Wang, L.; Zhao, J.; Wei, Y.; Zhai, S.; Tan, M.; & *et al*.(2022). Lonicera rupicola Hook.f.et Thoms flavonoids ameliorated dysregulated inflammatory responses, intestinal barrier, and gut microbiome in ulcerative colitis via PI3K/AKT pathway. *Phytomedicine*; 104: 154284.

Liang, K.; Liu, Q.; Li, P.; Luo, H.; Wang, H. & Kong, Q. (2019). Genetically engineered *Salmonella typhimurium*: recent advances in cancer therapy . *Cancer Lett.*;448:168–181. doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.037.

Lin, Q.; Wang, X. & Hu, Y. (2023). The opportunities and challenges in immunotherapy: Insights from the regulation of PD-L1 in cancer cells. *Cancer Lett*. ;10;569:216318. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216318. Epub 2023 Jul 15. PMID: 37454966.

Lin X, Kang K, Chen P, Zeng Z, Li G, Xiong W, & *et al.* (2024).Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers. *Mol Cancer*.;23(1):108. doi: 10.1186/s12943-024-02023-w. PMID: 38762484; PMCID: PMC11102195.

Ling, D. ; Jia, X.; Wang, K.; Yan, Q.; Yuan, B.; Du, L. & *et al*. (2023). Cancer cell membrane-coated bacterial ghosts for highly efficient paclitaxel delivery against metastatic lung cancer, *Acta Pharm Sin B*.; 14(1):365-377. DOI: 10.1016/j.apsb.2023.08.012.

Liu, Q.; Guan, Y. & Li, S. (2024). Programmed death receptor (PD-)1/PD-ligand (L)1 in urological cancers : the "all-around warrior" in immunotherapy. *Mol Cancer*.;23(1):183. doi: 10.1186/s12943-024-02095-8. doi: 10.1186/s12943-024-02121-9.

Low, E.E.; Demb, J.; Liu, L.; Earles, A.; Bustamante, R.; Williams, C.D. & *et al*. (2020).Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*;159(2):492-501.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.004.

Lu, Y.; Mei, N.; Ying, Y.; Wang, D.; Li, X.; Zhao, Y. & *et al*. (2024). Bacteria-Based Nanoprobes for Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine*.;19:759-785. doi: 10.2147/IJN.S438164.

Lubitz, P.; Mayr, U.B. & Lubitz, W. (2009). Applications of bacterial ghosts in biomedicine. *Adv Exp Med Biol* ;655: 159–170. https:// doi. org/10. 1007/ 978-1- 4419- 1132-2_ 12.

Ma, Y.; Cui, L.; Wang, M.; Sun, Q.; Liu, K. & Wang, J. (2021). A Novel and Efficient High-Yield Method for Preparing Bacterial Ghosts. *Toxins* (Basel) ;13(6):420. doi: 10.3390/toxins13060420.

Machado, V.F.; Feitosa, M.R.; da Rocha, J.J.R. & Féres, O. (2016).A Review of Experimental Models in Colorectal Carcinogenesis. *J. Coloproctology* ; 36: 53–57.

MacLennan, C.A.; Grow, S.; Ma, L.F. & Steele, A.D. (2022). The *Shigella* Vaccines Pipeline. *Vaccines* (Basel).;10(9):1376. doi: 10.3390/vaccines10091376.

Mahmoud, N.N. (2022). Colorectal Cancer: Preoperative Evaluation and Staging. *Surg Oncol Clin N Am*.;31(2):127-141. doi: 10.1016/j.soc.2021.12.001.

Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Pradilla Dieste, A.; Cerrada, E. & Rodriguez Yoldi, M.J. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*.;18(1):197. doi: 10.3390/ijms18010197.

Martinez, F. O. & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*; **6**: 13 .

Masso-Welch, P.; Girald Berlingeri, S.; King-Lyons, N.D.; Mandell, L,. Hu, J.; Greene, C.J. & *et al.* (2019).LT-IIc, a bacterial type II heat-labile enterotoxin, induces specific lethality in triple negative breast cancer cells by modulation of autophagy and induction of apoptosis and necroptosis. *Int J Mol Sci*.;20(1):85.

Mayr, U.B.; Haller, C.; Haidinger, W.; Atrasheuskaya, A.; Bukin, E.; Lubitz, W. & *et al.*(2005).Bacterial Ghosts as an Oral Vaccine: A Single Dose of *Escherichia coli* O157:H7 Bacterial Ghosts Protects Mice against Lethal Challenge. *Infect. Immun*.; 73: 4810–4817.

Meester, R.G.S.; Mannalithara, A.; Lansdorp-Vogelaar, I. & Ladabaum U. (2019). Trends in Incidence and Stage at Diagnosis of Colorectal Cancer in Adults Aged 40 Through 49 Years, 1975-2015. *JAMA*; 321: 1933–1934.

Mellor, K.C.; Blackwell, G.A.; Cawthraw, S.A.; Mensah, N.E.; Reid, S.W.J.; Thomson, N.R.; & *et al*.. (2022) . Contrasting long-term dynamics of antimicrobial resistance and virulence plasmids in *Salmonella typhimurium* from animals. *Microb. Genom.*; 8: 000826.

Melssen, M.M.; Petroni, G.R.; Chianese-Bullock, K.A.; Wages, N.A.; Grosh, W.W.; Varhegyi, N. & *et al*. (2019). A multipeptide vaccine plus toll-like receptor agonists LPS or polyICLC in combination with incomplete Freund's adjuvant in melanoma patients. *J Immunother Cancer*;7(1):163. doi: 10.1186/s40425-019-0625-x.

Meryud, A. A.; Mohammud, H. M. & Mohammed, M. J. (2022).Epidemiology of Colonic Cancer in Baghdad City, Iraq. Iranian Journal of War & Public Health.;14(3):331-337.

Mesa-Pereira, B.; Medina, C.; Camacho, E.M.; Flores, A. & Santero, E. (2015) . Improved cytotoxic effects of *Salmonella*-producing cytosine deaminase in tumour cells . *Microb Biotechnol*.;8:169–176. doi: 10.1111/1751-7915.12153.

Michael, J. D. & John, C. (2019). Biomarkers for Predicting Response to Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients, *Clinical Chemistry*, 65 (10) : 1228–1238, https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.303644.

Moghadam, M. N.; Rahimi, E.; Shakerian, A. & Momtaz, H. (2023). Prevalence of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* isolated from poultry meat: virulence and antimicrobial-resistant genes. *BMC Microbiol*.;23(1):168. doi: 10.1186/s12866-023-02908-8.

Moon, J.Y.; Kim, S.Y.; Kim, W.K.; Rao, Z.; Park, J.H.; Mun, J.Y. & *et al.* (2017). Protective efficacy of a *Salmonella Typhimurium* ghost vaccine candidate constructed with a recombinant lysozyme-PMAP36 fusion protein in a murine model. *Can J Vet Res*.;81(4):297-303.

Moon, J.; Kim, S.; Kim, W.; Rao, Z.; Park, J.; Park, B. & *et al*.(2020).Protective efficacy of the recombinant lysozyme-PMAP36 fusion protein-inactivated *Salmonella Typhimurium* vaccine candidate *via* oral immunization in a murine model. *Can J Vet Res*.;84(3):241-244.

Muhammad, A.; Champeimont, J.; Mayr, U.B.; Lubitz, W. & Kudela, P. (2012). Bacterial ghosts as carriers of protein subunit and DNA-encoded antigens for vaccine applications. *Expert Rev Vaccines*.;11:97–116. doi:10.1586/erv.11.149. PMID:22149712.

Murakami, T.; Hiroshima, Y.; Zhao, M.; Zhang, Y.; Chishima, T.; Tanaka, K. & *et al.* (2015). Therapeutic efficacy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R on human colorectal cancer liver metastasis in orthotopic nude-mousemodels. *Oncotarget.*;6:31368–31377. doi: 10.18632/oncotarget.5187.

Neophytou, C.M.; Panagi, M.; Stylianopoulos, T. & Papageorgis, P. (2021). The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancers.* ;13:2053. doi: 10.3390/cancers13092053.

Ng, O. (2016). Iron, microbiota and colorectal cancer. Wien Med Wochenschr.;166(13-14):431-436. doi: 10.1007/s10354-016-0508-4.

Nguyen, H.T. & Duong, H.Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett*.;16(1):9-18. doi: 10.3892/ol.2018.8679.

Nguyen, L.H.; Liu, P.H.; Zheng, X.; Keum, N.; Zong, X.; Li, X. & *et al*.(2018). Sedentary Behaviors, TV Viewing Time, and Risk of Young-Onset Colorectal Cancer. *JNCI Cancer Spectr*.;2(4):pky073. doi: 10.1093/jncics/pky073.

Noor, M.; Riaz, S. & Saleem, F. (2023) . Determination of antibiotic resistance of *Salmonella spp*. isolated from ice cream. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 20(01), pp. 131–138. doi: 10.34016/pjbt.2023.20.01.783.

Ntomi, V.; Foukas, P.; Papaconstantinou, D.; Antonopoulou, I.; Pikoulis, A.; Panagiotides, I. & *et al*.,. (2021).The clinical significance of PD-L1 in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*.;45(6):92. doi: 10.3892/or.2021.8043.

Oblak, A. & Jerala, R. (2011). Toll-like receptor 4 activation in cancer progression and therapy. *Clin Dev Immunol*. ;2011:609579. doi: 10.1155/2011/609579.

Odze, R.D.; Nagtegaal, I.D.; Arends, M. & Salto-Tellez, M. (2019). Colorectal Adenocarcinoma: Tumours of the Colon and Rectum. In World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System, 5th ed.; WHO Classification of Tumours Editorial Board, Ed.; IARC Press: Lyon, France,; Volume 1, pp. 177–187.

Pandey, M.; Choudhury, H.; Vijayagomaran, P.A.; Lian, P.N.P.; Ning, T.J.; Wai, N.Z. & *et al*. (2022). Recent Update on Bacteria as a

Delivery Carrier in Cancer Therapy: From Evil to Allies. *Pharm. Res.* ;39:1115–1134. doi: 10.1007/s11095-022-03240-y.

Pangilinan, C.R. & Lee, C. H. (2021). Highlights of Immunomodulation in *Salmonella*-Based Cancer Therapy. *Biomedicines*, 9, 1566. https:// doi.org/10.3390/biomedicines9111566.

Pangilinan, C.R.; Wu, L.H. & Lee, C.H. (2021).*Salmonella* Impacts Tumor-Induced Macrophage Polarization, and Inhibits SNAI1-Mediated Metastasis in Melanoma. *Cancers.* ;13:2894. doi: 10.3390/cancers13122894.

Panteli, J.T.; Van Dessel, N. & Forbes, N.S. (2020). Detection of tumors with fluoromarker-releasing bacteria. *Int J Cancer* 146(1):137–49. 10.1002/ijc.32414.

Park, H.J.; Oh, S.; Vinod , N.; Ji, S.; Noh, H.B. ; Koo, J.M. & *et al.*(2016).Characterization of Chemically-Induced Bacterial Ghosts (BGs) Using Sodium Hydroxide-Induced *Vibrio parahaemolyticus* Ghosts (VPGs). *Int J Mol Sci.*;17(11):1904. https:// doi. org/ 10. 3390/ ijms1 71119 04.

Park, SY. (2023). Chemically induced bacterial ghosts: a novel approach for advancing biomedical applications. *Mol. Cell. Toxicol.* ;19: 657–665 https://doi.org/10.1007/s13273-023-00389-4.

Parvez, A.; Choudhary, F.; Mudgal, P.; Khan, R.; Qureshi, K.A.; Farooqi, H. & *et al.* (2023). PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment. *Front. Immunol.*; 14:1296341. doi: 10.3389/fimmu.2023.1296341.

Pathria, P.; Louis, T.L. & Varner, J.A. (2019). Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol.*;40(4):310-327. doi: 10.1016/j.it.2019.02.003.

Payandeh, Z.; Khalili, S.; Somi, M.H.; Mard-Soltani, M.; Baghbanzadeh, A,; Hajiasgharzadeh, K. & *et al.* (2020) .PD-1/PD-L1-dependent immune response in colorectal cancer. *J Cell Physiol* ;235:5461–75. doi: 10.1002/jcp.29494

Phipps, O.; Brookes, M. J. & Al-Hassi, H. O. (2021). Iron deficiency, immunology, and colorectal cancer. *Nutr Rev.* 1; 79(1): 88–97. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa040.

Piao, X. M.; Kim, Y. U.; Byun, Y. J.; Zheng, C. M.; Moon, S. M.; Kim, K., & *et al.* (2022). Expression of RPL9 predicts the recurrence of non-muscle invasive bladder cancer with BCG therapy. *Urol. Oncol.* ;40: 197.e1–197.e9. doi: 10.1016/j.urolonc.2021.12.009.

Plackett, P. & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, ; 37 : 305–325.

Pourghazian, N.; Sankaranarayanan, R.; Alhomoud, S. & Slama, S. (2019). Strengthening the early detection of common cancers in the eastern Mediterranean region. *East Mediterr Health J*.;25(11):767–8.

Rabea ,S.; Yassin, A. S. ; Mohammed ,A. F. ; Salem- Bekhit, M. M. ; Alanazi, F. K. & *et al.* (2022). Immunological characterization of the chemically prepared ghosts of *Salmonella Typhimurium* as a vaccine candidate. *BMC Veterinary Research*; 18:72. https://doi.org/10.1186/s12917-021-03112-4 .

Rabea, S.; Salem-Bekhit, M.M.; Alanazi, F.K.; Yassin, A.S.; Moneib, N.A. & Hashem, A.E.M. (2018). A novel protocol for bacterial ghosts' preparation using tween 80. *Saudi Pharm J*.;26:232–7. https:// doi. org/ 10. 1016/J. JSPS. 2017. 12. 006.

Rahardjo, W. L.; Labeda, I. ; Lusikooy, R. M. & Faruk, M. (2021). The relationship of tumor necrosis factor alpha levels in plasma toward the stage and differentiation degree in colorectal cancer. *Medicina Clínica Práctica*; 4: 100224. 10.1016/j.mcpsp.2021.100224.

Ramesh, K.; Goyal1, R. & Solanki, P. (2013). Anticancer Activity of Acetone Extract of Quercus Infectoria Olivier Fagaceae in 1,2 Dimethyl Hydrazine Induced Colon Cancer. *International Journal of Cancer Studies& Research*; 2:102.

Rasheed, M.N.; Al-Khafji, Z.M. & Yaseen, N.Y. (2012). Study the Effect of *Lactobacillus acidophilus* Local isolate and its Components as colon anticancer induced in rats. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*;5(2):183-190.

Rehman, A.U.; Hashmi, M.A.; Tehseen, Y.; Khan, A.; Khan, S.S.; Iqbal, J. & *et al.* (2017).Antidiabetic flavonol glycosides from Eryngium caeruleum. *Rec Nat Prod.*;11(2):229–34.

Riedel, S. ; Morse, S.A. ; Mietzner, T. & Miller, S.(2019). Jawetz , Melnick & Adelberg's Medical Microbiology . McGraw-Hill LANGE Education ;28th Ed. : 245-250.

Roberts, N.J.; Zhang, L.; Janku, F.; Collins, A.; Bai, R-Y.; Staedtke, V. & *et al.* (2014).Intratumoral injection of Clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses. *Sci Transl Med*.;6:249 ra111-249ra111.

Rommasi, F.(2022). Bacterial-Based methods for cancer treatment: What we know and where we are .*Oncol. Ther*.;10:23-54.https://doi.org/10.1007/s40487-021-00177-x.

Saccheri, F.; Pozzi, C.; Avogadri, F.; Barozzi, S.; Faretta, M.; Fusi, P. & *et al.* (2010).Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci Transl Med*.;2:44ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.3000739.

Safi, M.; Al Balaa, B.; Qasem, S.; Al Hallab, L. & Al-Mariri, A. (2022).Isolation and identification of *Salmonella* typhimurium in retail meat sources by multiplex polymerase chain reaction. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*.; 9(4):152-156. doi:10.34172/ajcmi.2022.3042.

Saleh, N.; Mahmoud, H.E.; Eltaher, H.; Helmy, M.; El-Khordagui, L. & Hussein, AA. (2023). Prodigiosin-Functionalized Probiotic Ghosts as a Bioinspired Combination Against Colorectal Cancer Cells. *Probiotics Antimicrob Proteins*.;15(5):1271-1286. doi: 10.1007/s12602-022-09980-y.

Salem-Bekhit, M.M.; Youssof, A.M.E.; Alanazi F.,K.; Aleanizy, F.S.; Abdulaziz, A.; Taha, E.I. & *et al.*(2021).Bacteria from infectious particles to cell based anticancer targeted drug delivery systems. *Pharmaceutics*; 13:1984.

Santaolalla, R.; Sussman, D.A.; Ruiz, J.R.; Davies, J.M.; Pastorini, C.; Espana, C.L. & *et al.* (2013).TLR4 activates the β-catenin pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS ONE*.;8: e63298.

Schijns, V.; Tartour, E.; Michalek, J.; Stathopoulos, A.; Dobrovolskiene, N.T. & Strioga, M.M. (2014). Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *Cytotherapy*.;16:427–39. doi:10.1016/j.jcyt.2013.09.008. PMID:24280238.

Sedighi, M.; Zahedi, B.A.; Hamblin, M.R.; Ohadi, E.; Asadi, A.; Halajzadeh, M. & *et al.* (2019). Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities. *Cancer Med*.;8(6):3167-3181. doi: 10.1002/cam4.2148.

Seiwert, N.; Heylmann, D.; Hasselwander, S. & Fahrer, J. (2020). Mechanism of colorectal carcinogenesis triggered by heme iron from red meat. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.*;1873(1):188334. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188334

Seker-Polat, F.; Pinarbasi Degirmenci, N.; Solaroglu, I. & Bagci-Onder, T. (2022). Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers*; 14: 443.

Semenov, A.V.; van Overbeek, L.; Termorshuizen, A.J. & van Bruggen, A.H. (2011). Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Luria-Bertani broth, farm-yard manure and slurry. *J. Env. Manag.* ;92:780–787. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.10.031.

Semlali, A.; Parine, N.R.; Arafah, M.; Mansour, L.; Azzi, A.; Shaharni, O.A. & *et al*. (2016).Expression and polymorphism of toll-like receptor 4 and effect on NF-κB mediated inflammation in colon cancer patients. *PLoS ONE.*;11:e0146333.

Sena, P. Fioresi, R.; Faglioni, F.; Losi, L.; Faglioni, G. & Roncucci, L.(2019). Deep learning techniques for detecting preneoplastic and neoplastic lesions in human colorectal histological images. *Oncol Lett.*;18(6):6101-6107. doi: 10.3892/ol.2019.10928.

Şenel, S. & Kılıckap, S. (2010). Anti-tumor necrosis factor therapy and cancer. *Cumhuriyet Med J*; 32: 132-6.

Senevirathne, A.; Hewawaduge, C. & Lee, J.H. (2021). Immunization of chicken with flagellin adjuvanted *Salmonella enteritidis* bacterial ghosts confers complete protection against chicken salmonellosis. *Poult Sci* ; 100: 101205. https:// doi. org/ 10. 1016/j. psj. 2021. 101205.

Shafiee, F.; Aucoin, M.G. & Jahanian, NA. (2019). Targeted diphtheria toxin based therapy: a review article. *Front Microbiol.*;10:2340. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02340.

Sheorey, H. & Darby, J. (2008). Searching for *Salmonella*. Australian Family Physician. 37:806–810.

Sheweita, S.A.; Batah, A.M.; Ghazy, A.A.; Hussein, A. & Amara, A.A.A.(2019). New Strain of *Acinetobacter Baumannii* and Characterization of Its Ghost as a Candidate Vaccine. *J. Infect. Public Health*; 12: 831–842.

Sheweita, S.A.; Amara, A.A.; Gamal, H.; Ghazy, A.A.; Hussein, A. & Bahey-El-Din, M. (2022). Bacterial Ghosts of *Pseudomonas aeruginosa* as a Promising Candidate Vaccine and Its Application in Diabetic Rats. *Vaccines*; 10: 910. https://doi.org/10.3390/ vaccines10060910.

Siegel, R.L.; Jakubowski, C.D.; Fedewa, S.A.; Davis, A. & Azad, N.S. (2020). Colorectal Cancer in the Young: Epidemiology, Prevention, Management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* ;40: 1–14.

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E. & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* ;72: 7–33. doi: 10.3322/caac.21708.

Silva-Valenzuela, C.A.; Desai, P.T.; Molina-Quiroz, R.C.; Pezoa, D.; Zhang, Y.; Porwollik, S. & *et al.* (2016).Solid tumors provide niche-specific conditions that lead to preferential growth of *Salmonella* . *Oncotarget.* ;7:35169–35180. doi: 10.18632/oncotarget.9071.

Song, S.; Vuai, M.S. & Zhong, M. (2018). The role of bacteria in cancer therapy–enemies in the past, but allies at present. *Infec Agents Cancer*.;13(1):9. https:// doi.org/10.1186/s13027-018-0180-y.

Stegantseva, M.V.; Shinkevich, V.A.; Tumar, E.M. & Meleshko, A.N. (2020). Multi-antigen DNA vaccine delivered by polyethylenimine and *Salmonella enterica* in neuroblastoma mouse model . *Cancer Immunol Immunother.* ;69:2613–2622. doi: 10.1007/s00262-020-02652-2.

Stern, C.; Kasnitz, N.; Kocijancic, D.; Trittel, S.; Riese, P.; Guzman, C.A. & *et al.* (2015).Induction of $CD4^+$ and $CD8^+$ Anti-Tumor Effector T Cell Responses by Bacteria Mediated Tumor Therapy. *Int. J. Cancer*; 137: 2019–2028.

Stoffel, E.M.; Koeppe, E.; Everett, J.; Ulintz, P.; Kiel, M.; Osborne, J. & *et al.* (2018). Germline Genetic Features of Young Individuals With Colorectal Cancer. *Gastroenterology*.;154(4):897-905.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2017.11.004.

Stritzker, J.; Weibel, S.; Seubert, C.; Götz, A.; Tresch, A.; van Rooijen, N. & *et al.* (2010).Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility. *Int J Med Microbiol.* ;300:449–456. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.02.004.

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; & *et al.* (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*; *71*(3): 209–249.

Suvarna, S. K.; Layton, C.; & Bancroft, J. D. (2013). Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. *In Elsevier* : 11–36. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4226-3.00002-0 .

Suzuki, R.; Kohno, H.; Sugie, S.; Nakagama, H. & Tanaka, T. (2006). Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*.;27(1):162-9. doi: 10.1093/carcin/bgi205.

Swanson, L.; Katkar, G.D.; Tam, J.; Pranadinata, R.F.; Chareddy, Y.; Coates, J. & *et al*.. (2020).TLR4 signaling and macrophage inflammatory responses are dampened by GIV/Girdin. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;117(43):26895-26906. doi: 10.1073/pnas.2011667117.

Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C.B.; Zeh, H.J. & Lotze, M.T. (2012).PAMPs and DAMPs: signal0 s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*.;249:158–75. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.

Tang, B.; Elbediwi, M.; Nambiar, R.B.; Yang, H.; Lin, J. & Yue, M. (2022). Genomic Characterization of Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* in Duck, Chicken, and Pig Farms and Retail Markets in Eastern China. *Microbiol. Spectr.*; 10(5): e0125722.

Tang, S.P.; Mao, X.; Chen, Y.; Yan, L.; Ye, L. & Li, S. (2022). Reactive Oxygen Species Induce Fatty Liver and Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Inflammation and Cell Death. *Front. Immunol*.; 13: 870239.

Tarhriz, V.; Eyvazi, S.; Shakeri, E.; Hejazi, M.S. & Dilmaghani, A. (2020). Antibacterial and antifungal activity of novel freshwater bacterium *Tabrizicola aquatica* as a prominent natural antibiotic available in Qurugol Lake. *Pharmaceutical Sci*.;26(1):88–92. https://doi.org/10.34172/PS.2019.56.

Teklemariam, A.D.; Al-Hindi, R.R.; Albiheyri, R.S.; Alharbi, M.G.; Alghamdi, M.A.; Filimban, A.A.R. & *et al*.. (2023).Human Salmonellosis: A Continuous Global Threat in the Farm-to-Fork Food Safety Continuum. Foods.;12(9):1756. doi: 10.3390/foods12091756.

Thakur, R.; Suri, C.R. & Rishi, P. (2022). Contribution of typhoid toxin in the pathogenesis of *Salmonella* Typhi. *Microb. Pathog.*; *164*: 105444.

Tian, S.; Xiang, M.; Huang, Y. ; Yang, Z. ; Li, B. &Liu, X. (2024). Flagellin-B-expressing *Salmonella Typhimurium* Improves the Efficacy of Anti-PD- 1 Therapy by Remodeling the Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. Research Square:1-22. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3836504/v1.

Trumpi, K.; Frenkel, N.; Peters, T.; Korthagen, N. M.; Jongen, J. M. J.; Raats, D. & *et al.* (2018). Macrophages induce "budding" in aggressive human colon cancer subtypes by protease-mediated disruption of tight junctions. *Oncotarget*; *9*(28):19490-19507. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24626

Valle, L.; Vilar, E.; Tavtigian, S.V. & Stoffel, E.M .(2019).Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol* ;247: 574–588.

Vaure, C. & Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*; 5: 316. doi:10.3389/fimmu.2014.00316.

Vendrell, A.; Gravisaco, M.J.; Goin, J.C.; Pasetti, M.F.; Herschllik, L.; Toro, J.D. & *et al.* (2013). Therapeutic effects of *Salmonella typhi* in a mouse model of T-cell lymphoma. *J. ImmunoTher.* ;36:171–180. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182886d95.

Venning, F.A.; Claesson, M.H. & Kissow, H. (2013). The Carcinogenic Agent Azoxymethane (AOM) Enhances Early Inflammation-induced Colon Crypt Pathology. *J Cancer Sci Ther.*; 5: 377-383. doi:10.4172/1948-5956.1000229.

Vinod , N.; Oh , S.; Kim , S.; Choi, CW; Kim, SC; Jung, CH. (2014). Chemically induced *Salmonella enteritidis* ghosts as a novel vaccine candidate against virulent challenge in a rat model. Vaccine.; 32: 3249±55. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.090 .

Vinod, N.; Oh, S.; Park, H. J.; Koo, J. M.; Choi, C. W.; & Kim, S. C. (2015). Generation of a Novel *Staphylococcus aureus* Ghost Vaccine and Examination of Its Immunogenicity against Virulent Challenge in Rats. *Infect Immun ;* 83(7): 2957-2965.

Vinod, N.; Noh, H.B.; Oh, S.; Ji, S.; Park, H.J.; Lee, K-S. & *et al.* (2017). A *Salmonella typhimurium* ghost vaccine induces cytokine expression *in vitro* and immune responses *in vivo* and protects rats against homologous

and heterologous challenges. *PLoS ONE*; 12(9): e0185488. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185488 .

Vuik, F.E.R.; Nieuwenburg, S.A.V.; Bardou, M.; Lansdorp-Vogelaar, I.; Dinis-Ribeiro, M.; Bento, M.J. & *et al*. (2019).Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*.;68(10):1820.

Walcher, P.; Cui, X.; Arrow, J.A.; Scobie, S.; Molinia, F.C.; Cowan, P.E. & *et al*. (2008).Bacterial ghosts as a delivery system for zona pellucida-2 fertility control vaccines for brushtail possums (Trichosurus vulpecula). *Vaccine*; 26: 6832–6838.

Wang, D.; Wei, X.; Kalvakolanu, D.V.; Guo, B. & Zhang, L. (2021). Perspectives on Oncolytic *Salmonella* in Cancer Immunotherapy-A Promising Strategy. *Front Immunol*.;12:615930. doi: 10.3389/fimmu.2021.615930.

Wang, H.; Chen, T.; Wan, L.; Lu, J.; Wei, H.; Deng, K.Y. & *et al.* (2020).Attenuated *Salmonella* engineered with an apoptosis-inducing factor (AIF) eukaryotic expressing system enhances its anti-tumor effect in melanoma *in vitro* and *in vivo* . *Appl Microbiol Biotechnol.* ;104:3517–3528. doi: 10.1007/s00253-020-10485-3.

Wang, X. & Lu, C. (2009). Mice orally vaccinated with *Edwardsiella tarda* ghosts are significantly protected against infection. *Vaccine*; 27: 1571–1578.

Wculek, S.K.; Cueto, F.J.; Mujal, A.M.; Melero, I.; Krummel, M.F. & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.*;20(1):7-24. doi: 10.1038/s41577-019-0210-z.

Wei, S.C.; Duffy, C.R. & Allison, J.P. (2018). Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov*;8:1069 – 86.

WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean. (2017). Early detection of cancers common in the Eastern Mediterranean Region. *Licence*: CC BYNC- SA 3.0 IGO. Series; 40 :29-33.

WHO. (2020) .Global health estimates 2020: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2019. Geneva: World Health Organization.

WHO. (2021). International Agency for Research on Cancer. The Global Cancer Observatory.

Wibisono, F.M.; Wibisono, F.J.; Effendi, M.H.; Plumeriastuti, H.; Hidayatullah, A.R.; Hartadi, E.B. & *et al.* .(2020).A Review of Salmonellosis on Poultry Farms: Public Health Importance. *Syst. Rev. Pharm.* ; *11*: 481–486.

Witold, K.; Anna, K.; Maciej, T. & Jakub, J. (2018). Adenomas - Genetic factors in colorectal cancer prevention. *Rep Pract Oncol Radiother*.;23(2):75-83. doi: 10.1016/j.rpor.2017.12.003.

Witte, A.; Wanner, G.; Bläsi, U.; Halfmann, G.; Szostak, M. & Lubitz, W. (1990). Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E. *J. Bacteriol*.; 172: 4109–4114.

Won, G., Senevirathne, A., & Lee, J. H. (2020). *Salmonella Enteritidis* ghost vaccine carrying the hemagglutinin globular head (HA1) domain from H1N1 virus protects against salmonellosis and influenza in chickens. Vaccine; 38(28): 4387-4394.

Xi, Y. & Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*.;14(10):101174. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101174.

Xian, T.H.; Sinniah, K.; Yean, C.Y.; Krishnamoorthy, V.; Bahari, M.B.; Chan, Y.Y. & *et al.* (2020).Immunogenicity and protective efficacy of a live, oral cholera vaccine formulation stored outside-the-cold-chain for 140 days. *BMC Immunol*.; 21: 1–11.

Xie, S.; Zhang, P.; Zhang, Z.; Liu, Y.; Chen, M.; Li, S. & *et al.* (2021).Bacterial navigation for tumor targeting and photothermally-triggered bacterial ghost transformation for spatiotemporal drug release. *Acta Biomater*.; 131: 172–184.

Xiong, S.; Qi, Z.; Ni, J.; Zhong, J.; Cao, L. & Yang, K. (2020). Attenuated *Salmonella typhimurium*-mediated tumour targeting imaging based on peptides. *Biomater Sci* ;8(13):3712–9. 10.1039/D0BM00013B.

Xu, H.; Zhang, W.; Zhang, K.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Zhang, W. & *et al.* (2021). Characterization of *Salmonella* serotypes prevalent in asymptomatic people and patients. *BMC Infectious Diseases*; 21(1): 1-9.

Xue, X. & Shah, YM.(2013). Intestinal iron homeostasis and colon tumorigenesis. *Nutrients*.;5:2333–2351.

Yang, J.; Wu, Z.; Chen, Y.; Hu, C.; Li, D.; Liao, Y. & *et al.* (2020).A novel radio-sensitization method for lung cancer therapy: enhanced

radiosensitization induced by antigens/antibodies reaction after targeting tumor hypoxia using Bifidobacterium.. DOI:10.21203/rs.3.rs-22035/v1 .

Yang, Y.; Wan, C.; Xu, H.; Aguilar, Z.P.; Tan, Q. Xu, F. & *et al*. (2013). Identification of an outer membrane protein of *salmonella enterica* serovar Typhimurium as a potential vaccine candidate for salmonellosis in mice. *Microbes Infect*.;15:388–98. https:// doi. org/ 10. 1016/j. micinf. 2013. 02. 005.

Yang, Z.; Zou, L.; Yue, B.; & Hu, M. (2023).*Salmonella typhimurium* may support cancer treatment: a review. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai).;55(3):331-342. doi: 10.3724/abbs.2023007.

Yesudhas, D.; Gosu, V.; Anwar, M.A. & Choi, S. (2014). Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front Immunol*.;5:334. doi: 10.3389/fimmu.2014.00334.

Yoon, W.; Park, Y.; Kim, S.; Park, Y. & Kim, C.Y. (2021). Combined therapy with microRNA-expressing *Salmonella* and irradiation in melanoma . *Microorganisms*. ;9:2408. doi: 10.3390/microorganisms9112408.

Yu, W.; Zhang, J.; Chen, Z.; Wang, S.; Ruan, C.; Zhou, W. & *et al*.(2020). Inhibitory Effect of a Microecological Preparation on Azoxymethane/Dextran Sodium Sulfate-Induced Inflammatory Colorectal Cancer in Mice. *Front. Oncol*. 10:562189. doi: 10.3389/fonc.2020.562189.

Zauber, A.G.; Winawer, S.J.; O'Brien, M.J.; Lansdorp-Vogelaar, I.; van, B.M.; Hankey, B.F. & *et al*. (2012). Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med*.; 366(8):687–96.

Zhang, R.; Billingsley, M.M. & Mitchell, M.J. (2018).Biomaterials for vaccine-based cancer immunotherapy. *J Control Release*.;292:256-276.

Zhang, X.; Qi, C.; Guo, Y.; Zhou, W. & Zhang, Y. (2016). Toll-like Receptor 4-Related Immunostimulatory Polysaccharides: Primary Structure, Activity Relationships, and Possible Interaction Models. *Carbohydr. Polym*.; 149: 186–206.

Zhao, C.; He, J.; Cheng, H.; Zhu, Z. & Xu, H. (2016). Enhanced therapeutic effect of an antiangiogenesis peptide on lung cancer *in vivo* combined with *salmonella* VNP20009 carrying a Sox2 shRNA construct . *J Exp Clin Cancer Res*. ;35:107. doi: 10.1186/s13046-016-0381-4.

Zhao, C.; Wood, M.W.; Galyov, E.E.; HoÈpken, U.E.; Lipp, M.; Bodmer, H.C. & *et al*. (2006).*Salmonella typhimurium* infection triggers dendritic cells and macrophages to adopt disyinct migration patterns *in vivo*. *Eur J Immunol*.; 36: 2939±50. https://doi.org/10.1002/eji.200636179 .

Zhao, P. & Zhang, Z. (2018).TNF-α promotes colon cancer cell migration and invasion by upregulating TROP-2. *Oncol Lett*.;15(3):3820-3827. doi: 10.3892/ol.2018.7735.

Zhao, H., Wu, L., Yan, G. ;Chen , Y.; Zhao, M.; Wu, Y. & *et al.* (2021). Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Sig Transduct Target Ther* **;**6: 263. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5

Zheng, J.H.; Nguyen, V.; Jiang, S.N.; Park, S.H.; Tan, W.; Hong, S.H. & *et al*. (2017).Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin. *Sci Transl Med* ; 9: eaak9537.

Zhou, M.; Tang, Y.; Xu, W.; Hao, X.; Li, Y.; Huang, S. & *et al.* (2023). Bacteria-based immunotherapy for cancer: a systematic review of preclinical studies. *Front. Immunol*. ;14:1140463. doi: 10.3389/fimmu.2023.1140463.

Zhou, S.; Gravekamp, C.; Bermudes, D. & Liu, K. (2018). Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. *Nat Rev Cancer* ;18(12):727–43. 10.1038/s41568-018-0070-z .

Zhu H, Rollier, C.S. & Pollard, A.J. (2021). Recent advances in lipopolysaccharide-based glycoconjugate vaccines. *Expert Review of Vaccines;* 20: 1515-1538.

Zhu, H.; Li, Z.; Mao, S.; Ma, B.; Zhou, S.; Deng, L. & *et al*. (2011). Antitumor effect of sFlt-1 gene therapy system mediated by *Bifidobacterium Infantis* on Lewis lung cancer in mice. *Cancer Gene Ther*. ;18: 884–896. doi: 10.1038/ cgt.2011.57.

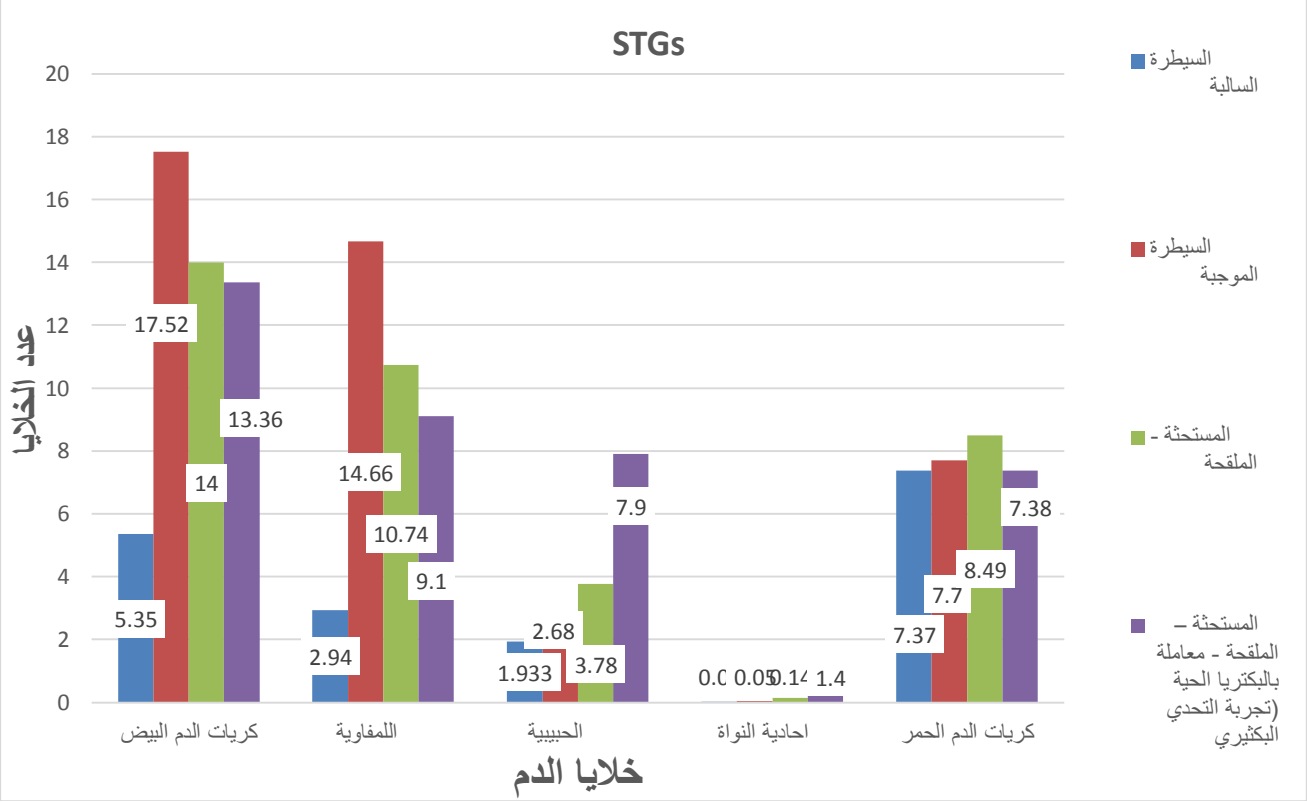
Zhu, S.; Feng, Y.; Rao, P.; Xue, X.; Chen, S.; Li, W. & *et al.* (2014).Hepatitis B virus surface antigen as delivery vector can enhance *Chlamydia trachomatis* MOMP multi-epitope immune response in mice. *Appl. Microbiol. Biotech*.; 98: 4107–4117.

Zi-Yang, Y.; Kaixun, Z.; Dongling, L.; Zhou, Y.; Chengbin, Z.; Jimei, C. & *et al*. (2020).Carcinoembryonic antigen levels are increased with

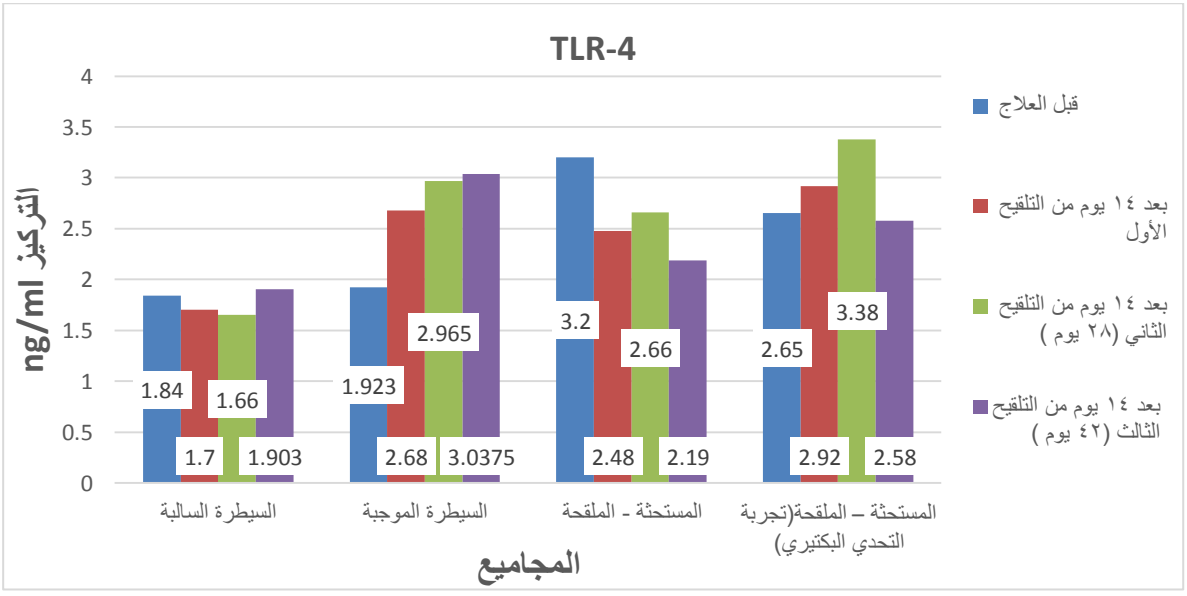
pulmonary output in pulmonary hypertension due to congenital heart disease. *J Int Med Res.* ;48(11):300060520964378.

الملاحـــق

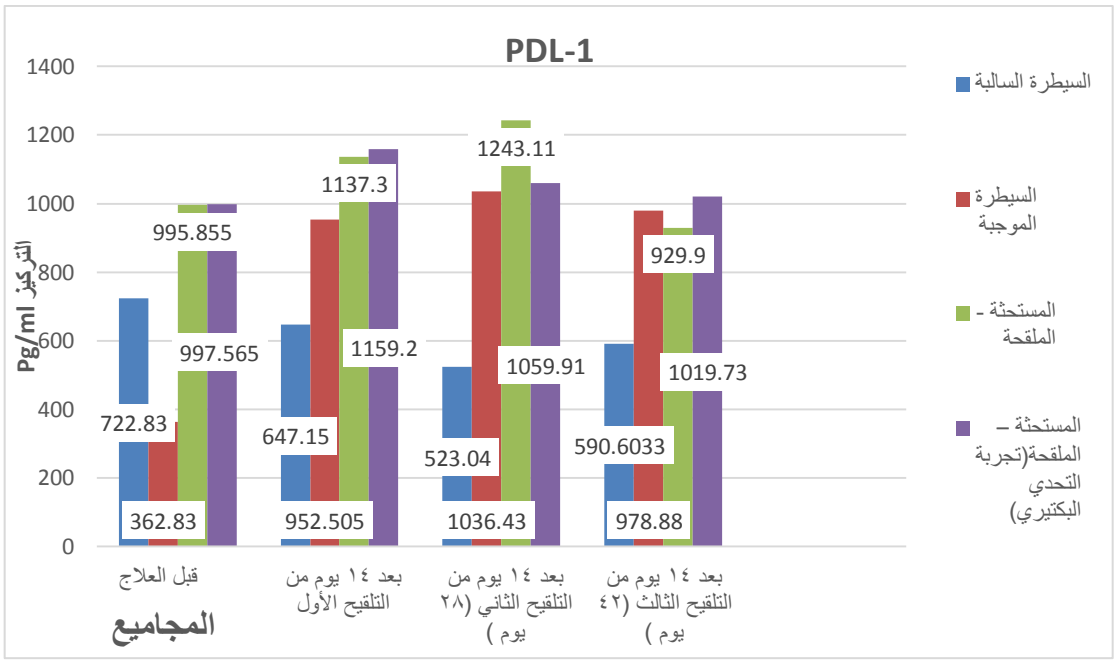
Appurtenances



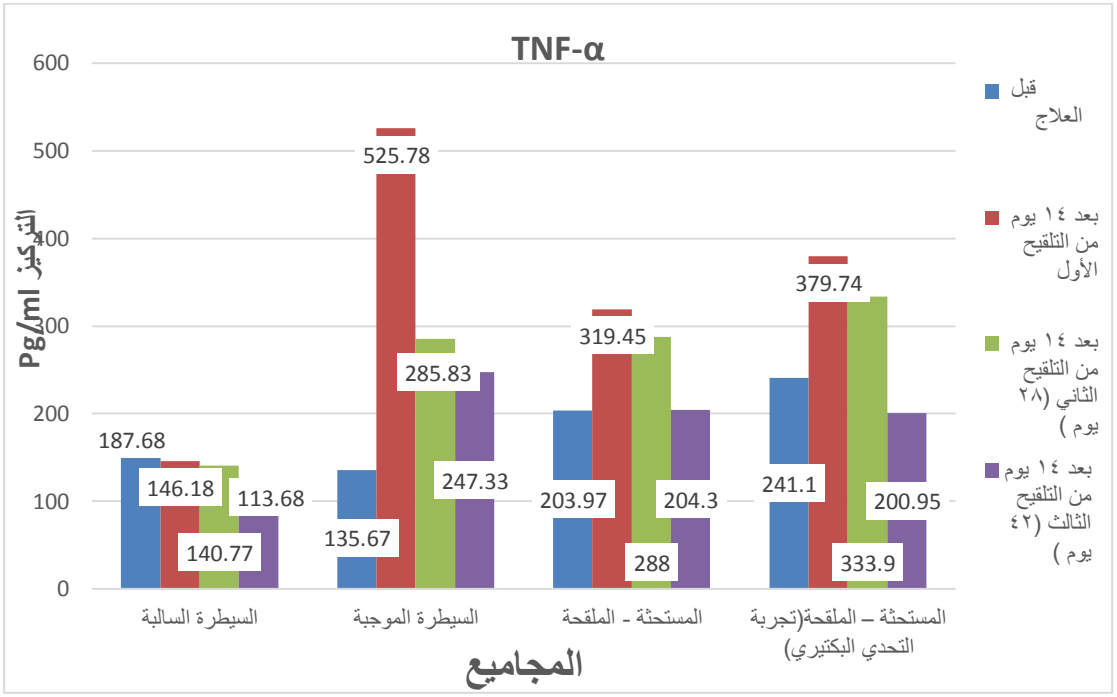
ملحق (1) تأثير التلقيح ب STGs في العدد الكلي والتفريقي لخلايا الدم البيض وكريات الدم الحمر في الجرذان البيض



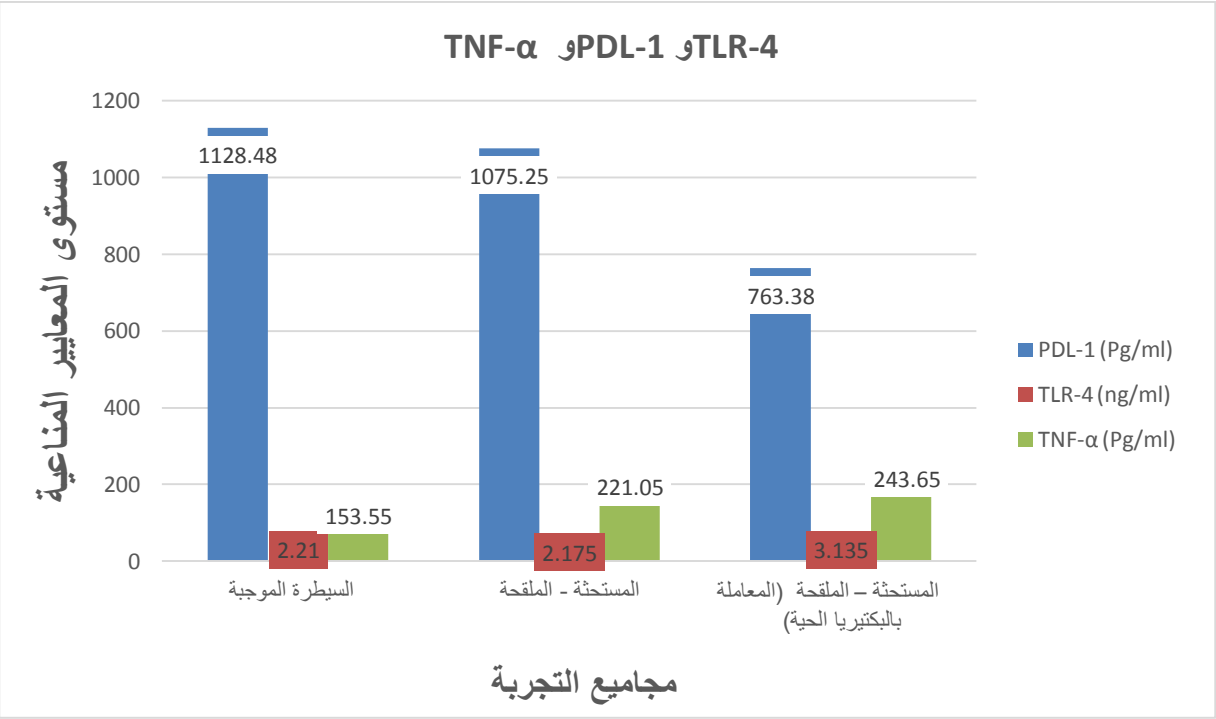
الملحق (2) مستوى المعيار المناعي TLR-4 في مصل جرذان مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح



الملحق (3) مستوى المعيار المناعي PDL-1 في مصل جرذان مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح



الملحق (4) مستوى المعيار المناعي TNF-α في مصل جرذان مجاميع الدراسة حسب التسلسل الزمني للتلقيح



الملحق (5) مستوى المعايير المناعية TNF-α و PDL-1 و TLR-4 في مصل الدم للجرذان المستحدث فيها سرطان القولون -الملقحة بلقاح STGs والمعاملة بالبكتيريا الحية مقارنة مع الجرذان المستحثة بسرطان القولون – الملقحة و جرذان مجموعة السيطرة الموجبة (حسب قيمة الاحتمالية بين مجاميع الدراسة)

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed January 10, 2023 5:47:58 PM CST

Patient Name: Rana Abdul Hamza Patient ID: 5120231
Location: Physician:
Lab ID: 5120231 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Salmonella ser.Typhimurium

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	5.80 hours	**Status:** Final
Selected Organism	94% Probability	**Salmonella ser.Typhimurium**	
	Bionumber:	0017610545466211	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	+
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	+	64	lLATa	-			

الملحق (6) تقرير الفايتك للعزلة البكتيرية

Summary

The current study aimed to investigate the immunostimulatory role of *Salmonella Typhimurium* ghosts (STGs) vaccine to reduce the effect of Azoxymethan (AOM)-induced colorectal cancer in male albino rats *(Rattus rattus*), which were used as a model to achieve the experiments of the current study, which were conducted in the laboratories of Biology Department belong to both the College of Education for Pure Sciences and the College of Science / University of Kerbala, and in the animal house of the College of Pharmacy / University of Kerbala, and in the training center of the Iraqi Biotechnology Company in Al-Qadisiyah Governorate for the period from the beginning of February 2023 to the beginning of November 2023.

The study included the use of (41) male albino rats, and included two axes. The first axis represented the initial evaluation to the locally prepared vaccine safety and its immunogenicity by studying the immune response of the vaccinated rats and comparing it with the unvaccinated rats, as well as testing the complete vaccination program. The second axis included investigating the immunomodulatory activity of the prepared vaccine on colorectal cancer induced rats before, during and after treatment with the complete vaccination program with (STGs) by measuring the expression level of some immune parameters represented by Toll like receptor- 4 (TLR-4), Programmed cell death ligand- 1 (PDL-1), and Tumor necrosis factor- alpha (TNF-α), in addition to studying some changes in histological and blood parameters.

S. Typhimurium ghosts were prepared from the activated bacterial isolate provided by the Al-Amin Center for Advanced Biotechnology and Research / Najaf, using the Sponge Like Reduced Protocol (SLRP) as a vaccine and to evaluate its efficiency in stimulating or modifying the immune response of laboratory rats (6 rats with an average weight of 150 grams were allocated for the experiment). The agglutination ability test was performed for *S. Typhimurium* cells and STGs using standard antisera. The results showed that agglutination appeared clearly by the presence of granular aggregation on the glass slide when using standard antibodies with the prepared *S. Typhimurium* cells and STGs, while the agglutination ability was absent in the negative control group. The

scanning electron microscope imaging results also revealed that these ghost cells which containing micropores are characterized by having intact and high-quality outer shells.

The full vaccination program (42 days) was tested and the experiment included the use of (15) rats with an average weight of 150 grams, divided into 3 groups, each group (5) rats included (the control group, the oral vaccination group, and the subcutaneous injection group). The STGs vaccine was used with Freund's adjuvant (1:1) at a dose of 100 µl/rat. The serum was collected from each animal before each vaccine dose and after the end of the vaccination program (14, 28, and 42 days). Then the ability of the antibodies present in the serum to interact with the live *S. Typhimurium* antigen was measured using the agglutination ability test. The positive agglutination result appeared on the glass slide by the presence of milky-colored granular fog that included the subcutaneous vaccination group, which gave a clear clump (within one minute) for the antibody reaction with the antigen after treatment with the STGs vaccine compared to the tests of the oral vaccination group.

When studying the effect of the prepared STGs vaccine on some histological, blood and immunological parameters for colorectal induced rats , the experiment included the use of (20) male white rats with weights ranging between (75-50) grams and ages of (5-4) weeks, they were divided into four groups with (5) rats for each group, the first group was considered the negative control group, and the second group was the positive control group that was injected with (AOM) at a rate of (15 mg/kg of animal weight) once a week for two consecutive weeks, the third group was the group of animals that were injected with a single dose subcutaneously with equal volumes (1:1) of STGs + Freund's adjuvant at a dose of (100 µl /rat) after (20) weeks from the date of the second injection of the carcinogenic (AOM) substance, then the full vaccination program continued (14, 28 and 42 days) ,while the fourth group represented the group of animals treated with carcinogenic (AOM) substance, which they were subjected to interference with live bacteria by subcutaneous injection with (1) ml of the bacterial suspension of live *S. Typhimurium* bacteria at a concentration of (1×10^8 cells/ml) once after the completion of the complete vaccination program. Blood samples were collected during

the experiment and tissues were collected after sacrificing the animals at the end of the experiment to evaluate the required standards.

Gross changes were observed in the colon tissue of the positive control group, represented by the loss of its normal appearance, in addition to the appearance of multiple masses of polyps. In the histopathological sections, severe infiltration of inflammatory cells between the crypts was observed, with marked hyperplasia in the glandular foci of the mucosal layer compared to the negative control group. As for the third group, histopathological changes in the colon mucosa and significant hyperplasia in the lymphoid tissue with infiltration of inflammatory cells and damage to the crypts of the mucosa layer were observed. The cross-section of the liver tissue of the fourth group showed simple sinusoidal congestion, degeneration of some hepatocytes, and irregularity of the sinuses accompanied by infiltration of some inflammatory cells in the portal area compared to the positive control group. The cross-section of the spleen tissue of the fourth group also showed small clusters of white pulp lymphocytes scattered across the red pulp, accompanied by slight infiltration of inflammatory cells compared to the positive control group.

The immune response measurements in the blood showed a significant increase ($P<0.05$) in the total number of white blood cells among the four study groups, as it reached its highest value in the positive control group with a mean and standard error of (17.52 ± 0.28 cells/mm^3 blood), while the granulocytes showed a significant increase ($P<0.05$) in the rate and standard error of (7.9 ± 1.92cells/mm^3 blood) in the fourth group when compared with the experimental groups, in addition to a significant increase ($P<0.05$) in the rate and standard error of monocyte cells in the same group when compared with the experimental groups, while the red blood cells showed a non-significant increase ($P>0.05$) in all four experimental groups and recorded a probability value between the groups of (0.28).

When estimating the expression levels of the immune parameters (TLR-4, PDL-1 and TNF-α), the results showed that there was no statistical significance at a significance level ($P>0.05$) between the four groups at most times regarding the study to the effect of the vaccine on the expression levels of the immune parameter TLR-4 in the serum of

the rat groups, except that the averages in the groups (induced - vaccinated) tended to rise over time compared to the negative control, but it was not sufficient to achieve statistical significance. The results showed that the expression level of PDL-1 increased according to the vaccination serial time, and there were significant differences between the groups at all times at a significance level of $P<0.05$, the third group showed high levels during the entire vaccination program compared to the other groups, which also indicates a clear significant increase ($P<0.05$) compared to the negative control group, which indicated the presence of non-significant differences ($P>0.05$), while the results recorded a clear variation in the levels of TNF-α between the different groups over the vaccination period, the negative control group did not show a significant difference in the immune response ($P>0.05$), while the positive control group showed a clear statistical significance at the significance level (0.05) in the inflammatory response, the most prominent being the third and fourth groups that showed a statistically significant effect on the immune response.

We conclude from the above that subcutaneous vaccination using *S. Typhimurium* ghost vaccine (STGs) in rats can generate a strong cellular immune response to reduce bacterial colonization in infected rats, and also provides complete protection against live strain bacteria, thus these chemically induced bacterial ghosts can be used as a promising vaccine. We also conclude that the induction of colorectal cancer in male white rats by sub-peritoneally injecting them with AOM can lead to changes in some histopathological, blood and immune parameters when injected subcutaneously with *S. Typhimurium* ghost vaccine, and it had an immunostimulatory effect with colorectal cancer.

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Kerbala / College of Education Pure Science

Department of Biology

The role of *Salmonella Typhimurium* ghost bacteria in the immunomodulation of induced colorectal cancer in male albino rats

A Thesis

Submitted to Council of the College of Education Pure Science– University of Kerbala , in a Partial Fulfillment of the Requirements for the Ph.D. Degree in Biology–Zoology

Written by:

Rana Abdul Hamza Abdul Zahra Abd Zaid AL-Qarraawe

B.Sc. Biology/ Kerbala University,2003

M.Sc. Biology/Kerbala University,2014

Supervised by:

Assist. Prof. Dr. Hiyam Abdul Ridha AL-Awad

January 2025 A.D. **Rajab 1446 A.H.**