

دراسة مستضدية  
جرثومة Enteropathogen  
*Escherichia coli* في الأرانب المحليه  
*Oryctolagus cuniculus*

رسالة مقدمة  
الى مجلس كلية العلوم - جامعة بابل  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم  
في علوم الحياة/علم الحيوان

قدمها  
شاكر حماد محمد العلواني

ذو الحجه ١٤٢٧ هـ

كانون الثاني ٢٠٠٦ م

**Study of Antigenicity of  
Enteropathogen  
*Escherichia coli* in local  
Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)**

A THESIS  
SUBMITTED TO THE COUNCIL OF THE COLLEGE OF  
SCIENCES  
UNIVERSITY OF BABYLON  
IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
OF FOR THE DEGREE  
OF MASTER OF SCIENCE  
IN  
BIOLOGY- ZOOLOGY

BY

**Shakir Hammad Mohammad Al-Alwany**

**Tho-Alhija ١٤٢٧**

**January ٢٠٠٦**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَلَوْ لَا فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ وَرَحْمَتُهُ لَهَمَّتْ طَائِفَةٌ مِنْهُمْ أَنْ يُضِلُّوكَ وَمَا يُضِلُّونَ إِلَّا أَنْفُسَهُمْ وَمَا يَضُرُّكَ مِنْ شَيْءٍ وَأَنْزَلَ اللَّهُ عَلَيْكَ الْكِتَابَ وَالْحِكْمَةَ وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُن تَعْلَمُ وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا ﴾

صدق الله العلي العظيم

﴿سورة النساء- الآية ١١٣﴾

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

- در نطق فيها روح الله نوحه...

در کرمی وسیع النساء والارض وده نوحه

در خانه الانب والامام وبنظنه نوره

- در نور الهمی در صور اخری وشریخ اعرش الله صبرنا ونبينا المعصني محمد بن

عبدالله صلى الله عليه وآله وصحبه وسلم والذبي نوح العلم اوله بنوره

فضله العالم علي العابد كفضلي علي اوني اصحابي

- در من علمني له الحياه كمنح وجهها..... والدي العزيز

- در من علمني وهما علي وحق در الحزن والرائي..... والدي الحنون

- در الاخصاء المديونة بقرنها..... زور معاوني اخواني والخواني

- در كل فطره روح تربنه صالح علي ارض الوطن في بيته الله

در الترانه الفرح

الهمي جهدي المتواضع

فاخر

١٤٢٦ هـ - ٢٠٠٥ م

## فكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين يوايه نعمه وجزيل عطاياه والصلاة والسلام على سيدنا محمد واله وأصحابه الاطهار .  
الآن وقد وصلت الى المراحل الأخيرة من مرحلة مشروع البحث أمرى من الوفاء أن أتقدم بخالص شكري وتقديري الى  
أستاذي الفاضل المشرف على البحث الأستاذ المساعد الدكتور علاء جواد حسن لمجوده المخلصة وملاحظاته القيمة  
وتوجيهاته السديدة التي أغنت البحث وأوصلته الى هذه النهاية الناضجة .

كما أتقدم بوافر الشكر والتقدير الى عمادة كلية العلوم جامعة بابل على كل ما أبدت من مساعدة  
في توفير متطلبات البحث والى رئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيهم من اساتذة وموظفين لمساعدتهم لي في أنجاء  
البحث وكذلك الى رئاسة قسم علوم الكيمياء ومنتسبيه لمساعدتهم اياي في فرغ مشروع البحث  
بالترجائيات والمواد الكيميائية اللازمة للإنجاز .

كما أتقدم بالشكر والتقدير الى كل من د . حسن فاضل ود . مرباب عمران الجيلادي ود . علي محسن  
ود . امال مرزقة لمديد العون لي وابداء ملاحظاتهم وآرائهم في أنجاء هذا البحث .

ولا يفوتني ان أتقدم بفاثق الشكر والتقدير الى زملائي طلبة الدراسات العليا من دون استثناء واطمئن  
بالذكر الأستاذ مر حيم طعمة المعموري والأستاذ فاخر مكطوف والست شيما عبيد والست ايفان لمديد العون  
لي في أنجاء هذا البحث .

شكر وتقدير الى مكتبة قسم علوم الحياة لرفد مشروع البحث بكافة المصادر واطمئن الدراسات  
العليا لكتابة وإنجاز هذا البحث .

وفي الحتام علي قد أسهمت في عمل نافع مراجياً الله سبحانه وتعالى أن يكون مقبولاً وذافائدة للجميع .  
وعذراً كل العذر عن كل خطأ عن جهل . . . او غفلة وان العصمة لله وحده جل جلاله .

والله ولي التوفيق

شاكراً

١٤٢٧ هـ - ٢٠٠٦ م

## الخلاصة Summary

تم الحصول على عزلة لجرثومة الاشريشية القولونية (*Escherichia coli*) من براز طفل رضيع بعمر ٨ اشهر مصاب بالإسهال وراقد في مستشفى الولادة والأطفال في مدينة الحلة. شخّصت العزلة اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات والخلايا، وكذلك أكدت الفحوصات الكيموحيوية والمصلية عائلية هذه العزلة لجرثومة *E. coli*، اذ بدأت الدراسة من تشرين الاول ٢٠٠٤ حتى تشرين الاول ٢٠٠٥.

فصلت مستضدات عزلة *E. coli* (المستضد المقتول والجسمي والسوطي) ومزجت مع المساعد المناعي (الكامل وغير الكامل لفريند) ومنعت بها الأرانب المحلية *Oryctolagus cuniculus* بعمر ستة اشهر. تمت متابعة الاستجابة المناعية الخلوية والتغيرات النسجية لأطحال الأرانب الممنعة بتلك المستضدات.

اظهرت النتائج ان هنالك فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) في الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة معبراً عنها بفرط الحساسية الأنية بين مستضدات *E. coli* (المقتولة والجسمية والسوطية) وبين نموذج السيطرة وكان المستضد السوطي الاكثر تأثيراً فيها اذ بلغ قطر التفاعل ١٩.٤ ملم.

دلّت النتائج ان هنالك فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) في الاستجابة المناعية الخلوية معبراً عنها بفرط الحساسية الأنية بين مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية ونموذج السيطرة وكان المستضد السوطي هو الاكثر تأثيراً اذ بلغ قطر التفاعل ٢٦ ملم.

اظهر التمنيع بمستضدات جرثومة *E. coli* حصول انخفاض في العدد الكلي لخلايا الدم البيض (Leukopenia) بالمقارنة مع نموذج السيطرة وكان المستضد المقتول الاكثر تأثيراً اذ بلغ عدد خلايا الدم البيض الكلي  $5.82 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup>، بينما في نموذج السيطرة  $8.28 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup>.

كما دلّت نتائج التمنيع بتلك المستضدات ان هنالك انخفاضاً في العد التفرقي لخلايا الدم البيض بالمقارنة مع نموذج السيطرة وكان المستضد السوطي الاكثر تأثيراً في خلايا العدلات (Neutrophils) والخلايا اللمفية (Lymphocytes) والخلايا وحيدة النواة الدموية (Monocytes) اذ بلغ ٢.٠٤، ١.١٤ و  $0.02 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup> على التوالي، بينما في نموذج السيطرة ٣.١١ و ٢.٦١ و  $0.35 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup> على التوالي، في حين كان المستضد المقتول الاكثر تأثيراً في الخلايا الحمضة (Eosinophils) اذ بلغ  $0.003 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup> بينما في نموذج السيطرة  $0.098 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup>.

قيس البروتين الكلي لمصول الارانب الممنعة وكانت هنالك زيادة في تركيزه مقارنة بنموذج السيطرة، وكان المستضد المقتول الاكثر تحفيزاً اذ بلغ ٨٧.٣ غم/لتر بينما في نموذج السيطرة ٦٥.٥ غم/لتر. وكما تبين ان هنالك ارتفاع في تركيز الكلوبولين المناعي-غاما في مصول حيوانات التجربة ووجود فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) بين مصول الارانب الممنعة بالمستضدات ونموذج السيطرة وكان المستضد الجسمي الاكثر تأثيراً اذ بلغ ٤٦.٢ غم/لتر بينما بلغ في نموذج السيطرة ٣٢.٤ غم/لتر.

تم قياس متوسط تراكيز الكلوبولينات المناعية في مصول الأرانب الممنعة بالمستضدات المذكورة آنفاً اذ دلّت النتائج وجود فرق معنوي جداً بين مصول الارانب الممنعة ونموذج السيطرة وكان المستضد الجسمي الاكثر تحفيزاً اذ بلغ تركيز الكلوبولين المناعي G (IgG) ٢٢٠٣ ملغم/دسي لتر، وتركيز الكلوبولين المناعي M (IgM) ٣٢٦.٩ ملغم/دسي لتر، وتركيز

الكلوبيولين المناعي IgA ٥٧٧.٥ ملغم/دسي لتر. بينما بلغ في نموذج السيطرة للكلوبيولينات المناعية IgG و IgM و IgA ٨٤٧ و ١١٤.٦ و ٢٠٧ ملغم/دسي لتر على التوالي.

تم قياس متوسط تراكيز المكونات الثالث C<sub>٣</sub> والرابع C<sub>٤</sub> للمتمم (Complement C<sub>٣</sub> & C<sub>٤</sub>) في مصول الأرانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوية بالمقارنة مع نموذج السيطرة، وكان المستضد الجسمي الأكثر تأثيراً وزيادة في تركيز المكون الثالث C<sub>٣</sub> إذ بلغ ٢٦٦.٥ ملغم/دسي لتر وكذلك للمكون الرابع للمتمم C<sub>٤</sub> إذ بلغ ٦٠.٤ ملغم/دسي لتر. أما متوسط نموذج السيطرة للمكونين الثالث والرابع فقد بلغ ١١٠.٩ و ٣٠.٥ ملغم/دسي لتر على التوالي.

كان المستضد المقتول الأكثر تركيزاً في عيارات الضد في مصول الأرانب الممنعة إذ بلغ ١٧٢٢، بينما كان عيار الضد سلبياً في نموذج السيطرة.

أشارت الدراسات النسيجية لطحال الأرانب بعد عملية التمنيع بالمستضدات أعلاه الى وجود تباين في الاحتقان الدموي (Conjestion) وتكاثر الخلايا الحويصلية (Follicular cell) وتغلغل الخلايا الالتهابية (Inflammatory cells) ووضوح المركز الانتاشي (Germinal center).

## Summary

---

### Summary

Bacterial isolate of *Escherichia coli* was isolated from feces of 8 months old infant baby who had a diarrhea and hospitalized in paediatrics and Obstetric hospital of Hilla city. The isolate was identified with the help of morphological characteristics of colonies and cells, while the biochemical and serological tests have confirmed the attributable of this isolate to *E. coli*. The isolate was subjected to immunological study over the period of October-2004 to October-2005.

The Ags of *E. coli* isolate (Killed, Somatic & Flagellar Ags) were separated & mixed with adjuvant (complete and incomplete adjuvant for Freund's). These Ags were injected in 6 months old of local rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in order to study the cellular & humoral immune responses of the immunity system and also the histological changes in spleen of experimental animals.

The results showed that high significant (H.S  $P < 0.01$ ) in humoral immune responses which is specialized by immediate hypersensitivity reaction between Ags of *E. coli* (killed, somatic and flagellar) and control. The flagellar Ag was more affected, and the diameter was 19.5 mm.

The results indicate that high significant ( $P < 0.01$ ) in cellular immune responses by delayed hypersensitivity reaction between Ags of *E. coli* and control. The flagellar Ag was more affected, and the diameter was 26 mm.

The immunized by Ags. of *E. coli* showed leucopenia in comparison with control. The killed Ag was more affected, and the total number of white blood cells count was  $0.82 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>, while in the control sample was  $1.28 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>.

The results of immunized by these Ags showed a decrease in the differential count of the W.B.C. after immunizing in comparison with control. The flagellar Ag was more affected in Neutrophils, lymphocytes and Monocytes, which were 2.04, 1.14,  $0.02 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>, respectively. While in control were 3.11, 2.61,  $0.30 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>, respectively. The killed Ag was more affected in Eosinophils and the number was  $0.03 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>, while in control was  $0.09 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>.

The total protein was measured in the serum of rabbits and there was an increase in its concentration in comparison with control. The killed Ag was more stimulated which was 87.3 gm/L, while in control was 70.0 gm/L.

## Summary

---

It was also found an increase in the concentration of Gamma-Immunglobuline in the serum of rabbits and found H.S.  $P < 0.01$  between the serum of the immunized rabbits with Ag. & control. The somatic Ag. was more affected and the concentration was  $46.2$  gm/L, while in control was  $32.5$  gm/L.

The measurements of the concentrations of Immunoglobuline in the serum of the immunized rabbit, with Ag, have found H.S. ( $P < 0.01$ ) between the serum of immunized rabbits and control. The somatic Ag was more stimulated, and the concentration of IgG was  $220.3$  mg/dL, and the concentration of IgM was  $326.9$  mg/dL. The concentration of IgA was  $577.0$  mg/dL, while in control for immunoglobuline IgG, IgM, IgA were  $447$ ,  $114.6$ ,  $207$  mg/dL, respectively.

The measurements of the mean concentration of complement  $C_r$  and  $C_i$  in the serum of the immunized rabbits with Ags killed, somatic, & flagellar Ag were compared with control, and the somatic Ag was more affected, and an increase in concentration of  $C_r$ , which was  $266.0$  mg/dL and for  $C_i$  was  $60.5$  mg/dl, while the in control for  $C_r$  &  $C_i$  were  $110.9$ ,  $30.0$  mg/dL, respectively.

The killed Ag was more affected in antibody titers in the serum of immunized rabbits was  $1722$ , while this Abs titers was negative in the control.

The Histological studies of the spleen of the immunized rabbits with these Ags, these showed that there is a difference in the congestion, proliferation of the follicular cells, appearance infiltration of the inflammatory cells, and the appearance of the Germinal center.

## اقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة بإطلاعنا على هذه الرسالة الموسومة (دراسة مستضدية جرثومة *Enteropathogenic Escherichia coli* في الارانب المحلية *Oryctolagus cuniculus*) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل ما يتعلق بها وذلك بتاريخ ٢٤/٤/٢٠٠٦ ووجدنا انها جديرة بالقبول بدرجة (امتياز) لنيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة/الحيوان.

التوقيع:  
العضو: أ. م. د. حسن فاضل ناجي  
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد  
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل  
التاريخ: / / ٢٠٠٦

التوقيع:  
رئيس اللجنة: أ. م. د. عبد العظيم ياسين البراك  
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد  
العنوان: كلية التقنيات الطبية والصحية/بغداد  
التاريخ: / / ٢٠٠٦

التوقيع:  
العضو: أ. م. د. علاء جواد حسن  
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد  
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل  
التاريخ: / / ٢٠٠٦

التوقيع:  
العضو: د. امال مرزة حسن  
المرتبة العلمية: رئيس باحثين  
العنوان: دائرة صحة بابل/ مختبر الصحة المركزي  
التاريخ: / / ٢٠٠٦

## مصادقة مجلس كلية العلوم/ جامعة بابل

التوقيع:  
الاسم: د. عودة مزعل ياسر  
المرتبة العلمية: استاذ  
العنوان: كلية العلوم- العميد  
التاريخ: / / ٢٠٠٦

## توصية الأستاذ المشرف

أشهد ان إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة.

اسم المشرف: د. علاء جواد حسن  
المرتبة العلمية: استاذ مساعد  
العنوان: كلية العلوم- جامعة بابل  
التوقيع:  
التاريخ: ٢٠٠٦ / /

## توصية رئيس القسم

أشارة الى التوصية أعلاه المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

الاسم: د. كريم حميد رشيد  
المرتبة العلمية: استاذ  
العنوان: كلية العلوم- جامعة بابل  
التوقيع:  
التاريخ: ٢٠٠٦ / /

## قائمة المختصرات

CGMP	Cyclicguanosine 5'-monophosphate
LT	Labil Toxin
ST	Heat-Stable Toxin
LPS	LipoPolysaccharides
GM	Ganglioside
TNF	Tumor Necrosis factor
IL	Interleukine
BEP	Bandle-forming pilus
CFAs	Colonization factor cells
AFCs	Antibody formaing cells
BCR	B-cell Receptor
MALT	Mucous-associated lymphoid tissue
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
BALT	Bronchus-associated lymphoid tissue
TCR	T-cell Receptor
MHC	Major histocampatibility complex
STXs	Shiga Toxin
LDH	Lutein Dehydrogenase hormone
CRs	Complement receptors
PPD	Purified protein Derivative
PD	Peritoneal dialysis
LBP	

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
I	الخلاصة بالعربية
III	المحتويات
XIII	قائمة الجداول
XIV	قائمة الأشكال
XVI	قائمة الملاحق
	١- الفصل الأول: المقدمة
١	١-١: المقدمة
	الفصل الثاني: استعراض المراجع
٤	استعراض المراجع
٤	١-٢: وصف جرثومة الإشريشية القولونية
٤	١-١-٢: الإشريشية القولونية السمية المعوية <i>Enterotoxigenic E. coli</i>
٥	٢-١-٢: الإشريشية القولونية الغازية المعوية <i>Enteroinvasive E. coli</i>
٥	٣-١-٢: الإشريشية القولونية الانتهازية المعوية <i>Enteropathogenic E. coli</i>
٥	٤-١-٢: الإشريشية القولونية النزفية المعوية <i>Enterohemorrhagic E. coli</i>
٦	٥-١-٢: جرثومة الإشريشية القولونية المنتشرة الملتصقة <i>Diffusely adherent E. coli</i>
٦	٢-٢: الذيفانات Toxins
٦	١-٢-٢: السموم الخارجية Exotoxins
٧	٢-٢-٢: السموم الداخلية Endotoxins
٧	١-٢-٢-٢: السموم العطوبة بالحرارة Heat-Labil Toxins (LT)
٨	٢-٢-٢-٢: السموم المقاومة للحرارة Heat-Stable Toxins
٩	٣-٢-٢-٢: متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharides (LPS)
١١	٣-٢: التركيب المستضدي لجراثيم الإشريشية القولونية
١٢	١-٣-٢: المستضد الجسمي Somatic Antigen

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
١٣	٢-٣-٢: المستضد المحفظي او المقتول Capsular or Killed Antigen
١٤	٣-٣-٢: المستضد السوطي (المستضد السطحي) Flagellar Antigen (H Ag)
١٥	٤-٢: الاستجابة المناعية Immune Response
١٦	١-٤-٢: الاستجابة المناعية الخلطية الجهازية

	Systemic Humoral Immune Response
١٩	٢-٤-٢: الاستجابة المناعية الخلوية
٢٠	٥-٢: تحفيز الاستجابة المناعية Stimulation of Immune Response
٢١	٦-٢: الاستجابة المناعية لجرثومة الاشريشية القولونية
٢١	١-٦-٢: الاستجابة المناعية الخلوية الجهازية
٢١	١-١-٦-٢: الكلوبولينات المناعية وعلاقتها مع مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية
٢٣	٢-١-٦-٢: علاقة المكونين الثالث والرابع للمتمم بمستضدات جرثومة الاشريشية القولونية
٢٥	٢-٦-٢: الاستجابة المناعية الخلوية
٢٥	١-٢-٦-٢: فرط الحساسية المتأخرة في اللبائن
٢٦	٢-٢-٦-٢: خلايا الدم البيض وعلاقتها مع مستضدات جراثيم الاشريشية القولونية
٢٧	١-٢-٢-٦-٢: الخلايا البيض الحبيبية Granulocytes
٢٧	٢-٢-٢-٦-٢: الخلايا اللمفية Lymphocytes
٢٨	٣-٢-٢-٦-٢: الخلايا وحيدة النواة Monocytes
٢٩	٧-٢: التركيب النسيجي للطحال في اللبائن
٣١	٣- المواد وطرائق العمل Materials & Methods
٣١	١-٣: المواد والمحاليل المستخدمة
٣١	١-١-٣: الحيوانات المختبرية Laboratory Animals
٣١	٢-١-٣: المحلول الملحي الطبيعي الوظيفي Physiological Normal Saline solution

### قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
٣١	٣-١-٣: محلول الملح الفورماليني Formal Saline Solution
٣٢	١-٣-١-٣: محلول الملح الفورماليني المعقم (٠.٥%)
٣٢	٢-٣-١-٣: محلول الملح الفورماليني المعقم (٠.٣%)
٣٢	٣-٣-١-٣: المحلول الملحي الفورماليني المعقم (٠.٦%)
٣٢	٤-١-٣: محلول ازايد الصوديوم Sodium azide
٣٢	٥-١-٣: محلول كبريتات الامونيوم المشبع Ammonium Sulfate Solution
٣٣	٦-١-٣: محلول بايوريت Biuret Solution
٣٣	٧-١-٣: محلول حمض التبغ (التنيك) Tannic Acid Solution
٣٣	٨-١-٣: محلول البوريت الملحي Borate-Saline Solution
٣٤	٩-١-٣: محلول ثوما Thoma's Solution
٣٤	١٠-١-٣: محلول ماكفرلاند Macfrland Solution
٣٤	١١-١-٣: محلول السيفر Alsever's Solution
٣٤	١٢-١-٣: مثبت بوان Bouin's Fixative
٣٥	١٣-١-٣: بغة هيما توكس - يلين - ش - ب

	Harris Alum Haematoxyline Stain هارس
٣٥	Eosin Stain صبغة الايوسين الكحولي ١٤-١-٣
٣٥	Haupt's Adhesive لاصق هاوبت ١٥-١-٣
٣٥	Leishman Stain صبغة لثمان ١٦-١-٣
٣٦	Phenol Solution محلول الفينول A-١٧-١-٣
٣٦	A-١٧-١-٣:١ محلول الفينول-A
٣٦	B-١٧-١-٣:٢ محلول الفينول-B
٣٦	Standard Albumin محلول الالبومين وتخافيفه القياسية B-١٧-١-٣ Solution
٣٩	<i>Escherichia coli</i> عزلات جرثومة الاشريشية- القولونية Strains
٣٩	Culture Media الاوساط الزرعية ١٩-١-٣

### قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
٣٩	Tryptic Soy Agar Medium :١-١٩-١-٣
٣٩	Tryptic Soy Broth Medium :٢-١٩-١-٣
٣٩	Nutrient Agar Medium الوسيط المغذي الصلب ٣-١٩-١-٣
٤٠	Nutrient Broth Medium الوسيط المغذي السائل ٤-١٩-١-٣
٤٠	MacConkey Agar Medium وسط الماكونكي الصلب ٥-١٩-١-٣
٤٠	Urea Agar Medium وسط اكار اليوريا ٦-١٩-١-٣٤٠
٤٠	Gelatin Agar Medium وسط اكار الجيلاتين ٧-١٩-١-٣
٤١	Starch Agar Medium وسط اكار النشا ٨-١٩-١-٣
٤١	Sugar Fermentation Medium وسط تخمر السكريات ٩-١٩-١-٣
٤١	Medium Base Medium الوسيط الاساس ١-٩-١٩-١-٣
٤١	Sugar Solution Medium محلول السكر ٢-٩-١٩-١-٣
٤١	Pepton Water Medium وسط ماء البيبتون ١٠-١٩-١-٣
٤٢	MR-VP Medium وسط احمر المثيل فوكس بروسكور ١١-١٩-١-٣
٤٢	Simmon's Citrate Medium وسط سيمون ستريت ١٢-١٩-١-٣
٤٢	Kligler Iron Agar Medium وسط ١٣-١٩-١-٣
٤٢	Motility Medium وسط التحرك ١٤-١٩-١-٣
٤٣	Eosin Methylene Blue Medium (EMB) وسط مثيل ارزق الايوسين ١٥-١٩-١-٣
٤٣	٢-٣: طرائق العمل
٤٣	١-٢-٣: التشخيص المصلي لجرثومة <i>E. coli</i>
٤٣	٢-٢-٣: تحضير المستضدات الجرثومية
٤٣	١-٢-٢-٣: تحضير معلق جراثيم <i>E. coli</i> المقتولة بالحرارة Killed :antigen
٤٤	٢-٢-٢-٣: تحضير المستضد الجسمي Somatic antigen

٤٤	٣-٢-٢-٣: تحضير المستضد السوطي Flagellar antigen
٤٥	٣-٢-٣: تمنيع الحيوانات المختبرية

### قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
٤٦	٤-٢-٣: استحصال الامصال وحفظها & Serum Collection Preservation
٤٦	١-٤-٢-٣: تقدير تركيز البروتين الكلي في المصل
٤٧	٢-٤-٢-٣: عزل الاضداد بوساطة كبريتات الامونيوم المشبعة
٤٨	٣-٤-٢-٣: قياس تركيز الكلوبولين المناعي- كما
٤٨	٤-٤-٢-٣: معايرة الكلوبولينات المناعية الجهازية المتخصصة بالمستضد الجرثومي
٤٨	١-٤-٤-٢-٣: تحضير عالق كريات الدم الحمر للخراف المغطاة بالمستضد الجرثومي
٤٩	٢-٤-٤-٢-٣: التلازن الدموي غير المباشر
٥١	٥-٢-٣: فحص الانتشار المناعي الشعاعي Single Radioactive Immunodiffusion Assay
٥٢	٦-٢-٣: جمع عينات الدم مع مانع تجلط
٥٢	١-٦-٢-٣: طريقة قياس العدد الكلي لخلايا الدم البيض Total Leukocyte Count
٥٢	٢-٦-٢-٣: حساب العدد التقريبي لخلايا الدم البيض Differential Leukocyte Count
٥٢	٧-٢-٣: تحضير المقاطع النسيجية لطحال الارانب
٥٣	٨-٢-٣: دراسة اختبار الجلد Skin test المتوسط بالاستجابة المناعية الضدية المتخصصة وبدلالة فرط الحساسية المتأخرة لمستضدات جرثومة الاشريشية القولونية <i>E. coli</i> .
٥٣	٣-٣: التحليل الاحصائي Statistical Analysis
٥٤	٤-٣: منوال الدراسة
<b>الفصل الرابع: النتائج</b>	
٥٥	١-٤: التشخيص الكيموحيوي والمصلي لجرثومة <i>E. coli</i>

### قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
٥٥	٢-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية والخلوية.
٥٥	١-٢-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية والمخصصة بدلالة فرط الحساسية الانية والمختبر في الجلد.

٥٦	١-٢-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلطية بدلالة فرط الحساسية الأنية
٥٧	٢-٢-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد
٥٨	١-٢-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر
٦٠	٣-٢-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية على العدد الكلي لخلايا الدم البيض.
٦٠	١-٣-٢-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في العدد الكلي لخلايا الدم البيض.
٦١	٤-٢-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في العد التفريقي لخلايا الدم البيض
٦٣	١-٤-٢-٤: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض العدلة وأثرها في الاستجابة المناعية الخلوية.
٦٤	٢-٤-٢-٤: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض اللمفية وأثرها في الاستجابة المناعية الخلوية.
٦٥	٣-٤-٢-٤: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض وحيدة النواة Monocytes وأثرها في الاستجابة المناعية الخلوية.
٦٦	٤-٤-٢-٤: التقويم الاحصائي للعد التفريقي لخلايا الدم البيض الحمضة Eosinophil وأثرها في الاستجابة المناعية الخلوية.

### قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
٦٧	٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلطية
٦٧	١-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز البروتين الكلي وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية.
٦٨	٢-١-٣-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز البروتين الكلي وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية
٦٨	٢-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية
٦٩	٢-٢-٣-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما
٧٠	٣-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي IgG
٧١	١-٣-٣-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي IgG.
٧١	٤-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين

	المناعي IgM
٧٢	٢-٤-٣-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي IgM.
٧٣	٥-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي IgA
٧٤	٣-٥-٣-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي IgA.
٧٤	٦-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز المكون الثالث للمتمم (C <sub>٣</sub> )
٧٥	٢-٦-٣-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز المكون الثالث للمتمم C <sub>٣</sub> .

### قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
٧٥	٧-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز المكون الرابع للمتمم (C <sub>٤</sub> )
٧٦	٥-٧-٣-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في مستوى تركيز المكون الرابع للمتمم C <sub>٤</sub> .
٧٦	٨-٣-٤: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في عيار الضد وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية.
٧٧	١-٨-٢-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في عيار الضد وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية.
٧٧	٤-٤: التغيرات النسيجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.
<b>الفصل الخامس: المناقشة</b>	
٨٣	١-٥: تأثير المساعد المناعي المساعد المناعي التوبركولين على الاستجابة المناعية في الارانب
٨٣	٢-٥: تأثير مستضدات جرثومة <i>E. coli</i> على الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية
٨٣	١-٢-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية بدلالة فرط الحساسية الأنية.
٨٤	٢-٢-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد.
٨٥	٣-٢-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية على العدد الكلي لخلايا الدم البيض.
٨٦	٤-٢-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية على العد التفرقي لخلايا الدم البيض.
٨٨	٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلطية.

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
٨٨	١-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز البروتين الكلي.
٨٨	٢-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما.
٨٩	٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية على الكلوبولينات المناعية في مصول الارانب.
٨٩	١-٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الكلوبولين المناعي G (IgG).
٩٠	٢-٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الكلوبولين المناعي M (IgM).
٩٠	٣-٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي (IgA).
٩١	٤-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في عيار الضد المتخصص بالمستضد واثره في الاستجابة المناعية الخاطية.
٩٢	٥-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز المكون الثالث C <sub>٣</sub> والمكون الرابع C <sub>٤</sub> للمتمم.
٩٢	١-٥-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز المكون الثالث C <sub>٣</sub> للمتمم.
٩٢	٢-٥-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز المكون الرابع C <sub>٤</sub> للمتمم.
٩٣	٦-٣-٥: اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في التراكيب النسيجية لطحال الارانب.
٩٦-٩٥	الاستنتاجات والتوصيات
٩٩-٩٧	الملاحق
١١٨-١٠٠	المصادر العربية والاجنبية
A	الخلاصة باللغة الانكليزية

## قائمة الجداول

رقم الصفحة	العنوان	رقم الجدول
١٣	المجاميع المصلية لسلاسل جرثومة الاشريشية القولونية (Doyle & Dolores, ١٩٩٦).	١
١٥	المجاميع المصلية لأنواع عامل استعمار المستضدات (CFAs) (Doyle & Dolores, ١٩٩٦).	٢
٦٦	معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيض في ارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	١-٤
٧١	تراكيذ البروتين الكلي (غم/لتر) في مصل الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٢-٤

٧٣	تراكيز الكلوبولين المناعي-كاما (غم/لتر) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٣-٤
٧٤	تركيز الكلوبولين المناعي IgG (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٤-٤
٧٦	تركيز الكلوبولين المناعي IgM (ملغم/دسي لتر) المتخصص في الارانب الممنعة بأنواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٥-٤
٧٧	تركيز الكلوبولين المناعي IgA (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٦-٤
٨١	عيار الكلوبولينات المناعية وتركيز الكلوبولين المناعي-كاما (ملغم/دسي لتر) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٧-٤
٨٣	التغيرات النسجية المختلفة لطحال الارانب الممنعة بأنواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية <i>E. coli</i> .	٨-٤

### قائمة الاشكال

رقم الصفحة	العنوان	رقم الشكل
٣٧	المنحني القياسي لتقدير الكلوبولين المناعي- كاما ( $\delta$ -Globuline).	١-٣
٣٨	المنحني القياسي لتقدير تركيز البروتين الكلي في امصال الارانب.	٢-٣
٥٦	مستويات الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بمستضدات المستضد المقتول والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (لم) بعد ٢٤ ساعة من حقن المستضدات.	١-٤
٥٧	مستويات الاستجابة المناعية الخلوية بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (لم) بعد ٤٨ ساعة من حقن مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الارانب.	٢-٤
٦٠	مستويات العدد الكلي لخلايا الدم البيض في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٣-٤
٦٣	مستويات خلايا الدم البيض العدلة (Neutrophils) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	١-٤-٤
٦٤	مستويات خلايا الدم البيض اللمفية (Lymphocytes) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٢-٤-٤
٦٥	مستويات خلايا الدم البيض وحيدة النواة (Monocytes) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة	٣-٤-٤

	الاشريشية القولونية.	
٦٦	مستويات خلايا الدم البيض الحمضة (Eosinophils) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٤-٤-٤

### قائمة الاشكال

رقم الصفحة	العنوان	رقم الشكل
٧٤	مستويات تراكيز المكون الثالث للمتمم C <sub>٣</sub> (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٥-٤
٧٥	مستويات تراكيز المكون الرابع للمتمم C <sub>٤</sub> (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.	٦-٤
٧٩	المقاطع النسجية لطحال ارانب السيطرة	٧-٤
٨٠	التغيرات النسجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة لجرثومة الاشريشية القولونية: G المركز الانتاشي F الخلايا الحويصلية C الاحتقان الدموي I الخلايا الالتهابية	٨-٤
٨١	التغيرات النسجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات الجسمية لجرثومة الاشريشية القولونية: G المركز الانتاشي F الخلايا الحويصلية C الاحتقان الدموي I الخلايا الالتهابية	٩-٤
٨٢	اثر مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية والخلوية بدلالة فرط الحساسية الأنية والمتأخر للارانب الممنعة بالمستضدات السوطية A- بدلالة فرط الحساسية الأنية B- بدلالة فرط الحساسية المتأخر R - الاحمرار T- تتخن	١٠-٤

### قائمة الملاحق

رقم الصفحة	العنوان	رقم الملحق
٩٩	البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي	١

	تركيز محلول الالبومين وتخافيفه القياسية.	
١٠٠	المعالم والبيانات الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي تركيز البروتين وتخافيفه القياسية.	٢

## Chapter One الفصل الاول

### المقدمة Introduction

تعد جرثومة الاشريشية القولونية *E. coli* احد الانواع السائدة في امعاء الانسان منذ الساعات الاولى للحياة وذلك لوجود منفعة بين تلك الجراثيم والمضيف وهي بذلك لا تكتسب عناصر وراثية لعوامل الضراوة كونها متعايشة (Jawetz *et al.*, ٢٠٠٤).

تسبب هذه الجرثومة العديد من الاخماج والمتلازمات كالتهاب القناة البولية (Urinary tract infection) وأمراض الاسهال (Diarrheal disease) والتسمم الدموي (Sepsis) وامراض السحايا (Meningitis) وخاصة في الاطفال الرضع (Giron, ١٩٩١; Eisenstein, ٢٠٠٠).

وتمتلك تلك الجرثومة تركيباً مستضدياً معقداً يتكون من ثلاثة انواع من المستضدات Antigens، وان بعض مستضداتها مقاومة للحرارة Heat-stable like ويدعى المستضد الجسمي Somatic antigen او متعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharides (LPS)، اما البعض الاخر فيكون عطوباً بالحرارة Heat-labil like وهو المستضد المحفظي Capsular antigen او المستضد المقتول، اما النوع الثالث من المستضدات فهو المستضد السوطي Flagellar antigen او المستضد السطحي (Doyle & Dolores, ١٩٩٦).

اغلب الاخماج المسببة بوساطة تلك الجرثومة ناتجة عن التعرض الى المستضدين الجسمي والمستضد المقتول او المحفظي، وتكون امراضيتها للسبيل البولي العلوي والتهاب حوض الكلية مرتبطاً مع نوع خاص من المستضدات المسماة بالاهلاب (Jawetz *et al.*, ٢٠٠٤). ويكون الاطفال حديثو الولادة حساسين جداً للتسمم بوساطة سلالات جرثومة *E. coli* بسبب قلة او فقدان الاجسام المضادة من صنف IgM (Catia *et al.*, ٢٠٠١).

وتستطيع تلك الجرثومة افراز العديد من السموم الجرثومية التي تكون ذات ضراوة عالية جداً لخلايا المضيف ومن هذه السموم هو متعدد السكريد الشحمي (LPS) وهو سم داخلي (Endotoxin) يكون مرتبطاً مع الجدار الخلوي لهذه الجرثومة، اما السموم الاخرى فتكون على شكل بروتينات عالية الذوبانية تتحرر من خلايا الجرثومة، وتنتج الاشريشية القولونية المرضية سم Verotoxin الذي يكون ذا خطورة كبيرة للسبيل الهضمي للفرد ولمختلف الاعمار وخاصة الاطفال حديثي الولادة حيث تفرزه الجرثومة ذات النوع المصلي O<sub>١٥٧</sub>:H<sub>٧</sub> (Karmali *et al.*, ١٩٩٢; Kuplan *et al.*, ١٩٨٣; Catia *et al.*, ٢٠٠١). وكذلك تنتج سلالات هذه الجرثومة نوعاً من السموم مشابهة لسموم جرثومة الشَّيْغلة *Shigella sp* بنوعيه STXa و STXb اللذين يسببان ضرراً كبيراً للخلايا الظهارية والاعشوية المخاطية للسبيل الهضمي وكذلك تسبب مرض الاسهال (Baack, ١٩٩٠).

اما آلية حدوث الاسهال فهو ذو علاقة مباشرة بإنتاج سموم عطوبية الحرارة-Heat-labil او سموم مقاومة للحرارة Heat-stable والتي تغير التوازن المائي الملحي للاغشية الظهارية والمخاطية للامعاء، حيث ان السموم المقاومة للحرارة تعمل بوساطة تحفيز انزيم guanylate cyclase في خلايا الاغشية الظهارية للامعاء مما يؤدي الى ارتفاع مستوى cGMP بداخل الخلايا مما يؤدي الى تثبيط اخذ السوائل بوساطة الامعاء ويعمل تبديلاً في انتقال المحاليل الشوارد بوساطة الخلايا المعوية، ويؤدي هذا الى زياده في افراز ايونات الكلوريد

بوساطة Crypt cell وتقليل امتصاص الصوديوم وايونات الكلوريد بوساطة خلايا الزغابات (Villous cells) وهاتان العمليتان تؤديان الى تجميع المحاليل الالكتروليتية وجريان الماء على طول الامعاء نتيجة التدرج الاوزموزي. (Yoshimura *et al.*, ١٩٨٥; Okamoto *et al.*, ١٩٨٧).

هنالك مؤشرات للحماية ضد السموم الداخلية لجرثومة الاشريشية القولونية المسببة للاسهال والمتضمنة انتاج مضادات السموم ومضادات مكونات الجرثومة (Klipstein *et al.*, ١٩٨٣; Sanchez *et al.*, ١٩٨٨).

- للاسباب أعلاه هدف البحث الى دراسة مستضدية جرثومة الاشريشية القولونية من خلال:-
١. عزل وتشخيص جرثومة ١ Enteropathogenic *E.coli* type من الاطفال الرضع المصابين بالاسهال بعمر اقل من سنة.
  ٢. تحضير مستضدات مختلفة من تلك الجرثومة.
  ٣. معرفة المستضد الاكثر تأثيراً في الاستجابة المناعية للارانب المحلية من خلال اجراء اختبارات مناعية عديدة وبطرائق تمنيع قياسية دولية معتمدة وكذلك الحصول على المصول المضادة لمستضدات تلك الجرثومة وبطرائق قياسية دولية معتمدة حديثة.
  ٤. معرفة التغيرات النسجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بمستضدات تلك الجرثومة.

## Chapter Three الفصل الثالث

### ٣- المواد وطرائق العمل Materials & Methods

#### ٣-١: الحيوانات المختبرية Laboratory Animals

تم استعمال (٢٠) من الارانب المحلية البالغة *Oryctolagus cuniculus* حسب تصنيف متحف التاريخ الطبيعي معززة بأراء (Donoghue & Hime, ١٩٧٩) وبمعدل خمسة مكررات لكل معاملة بسبب وجود تغاير في الاستجابة المناعية بين الحيوانات المختلفة (Beck *et al.*, ١٩٩٣) وكانت الارانب ذات اوزان بين (كيلو ونصف-كيلوين) وبعمر تراوح بين (٦-٨) اشهر وجرت اقلمتها بجو التجربة لمدة اسبوعين تحت الظروف القياسية للاكل والشرب والتأهيل (Schneider *et al.*, ١٩٩٠).

#### ٣-٢: المواد والمحاليل المستخدمة

##### ٣-٢-١: المحلول الملحي الطبيعي Normal Saline solution

يحضر هذا المحلول بتركيز (٠.٨٥%) وذلك بأذابة ٠.٨٥ غم من مادة كلوريد الصوديوم NaCl شركة BDH (الوزن الجزيئي ٥٨.٤٤) في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل، وتم تعقيم المحلول في جهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ بار ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا المحلول في تحضير المحلول الملحي الفورمالين Formal saline ومعايرة الاضداد المصلية مع المستضدات للعينات المأخوذة من الحيوان المختبري (Gravey *et al.*, ١٩٧٧) وايضاً استخدم في تحضير بعض محاليل التجربة.

##### ٣-٢-٢: محلول الملح الفورمالين Formal saline

جرى تحضير هذا المحلول بعد حساب النسب الحقيقية للفورمالديهايد (H-CHO) شركة BDH (الوزن الجزيئي ٣٠.٣) في محلوله واطافة حجم منه الى ماء الملح الوظيفي لكي يتم تحضير تراكيز كما في أدناه:- (kwapinski, ١٩٨٢)

##### ٣-٢-٢-١: محلول الملح الفورماليني المعقم (٠.٥%)

جرى تحضير هذا المحلول بأضافة ٠.٥ مل من محلول الفورمالديهايد (٣٧%) الى ٩٩.٥ مل من المحلول الملحي الطبيعي المعقم ليصبح التركيز النهائي ٠.٥%. استخدم هذا المحلول كمذيب للكوليبولينات المناعية (kwapinski, ١٩٨٢).

##### ٣-٢-٢-٢: محلول الملح الفورماليني المعقم (٠.٣%)

جرى تحضير هذا المحلول بأضافة ٠.٣ مل من محلول الفورمالديهايد (٣٧%) الى ٩٩.٧ مل من المحلول الملحي الطبيعي المعقم ليصبح التركيز النهائي ٠.٣%. استخدم هذا المحلول في تحضير المستضد الجسمي (O-Antigen) لبكتريا *E. coli* (المصدر موجود)

##### ٣-٢-٢-٣: محلول الملح الفورماليني المعقم (٠.٦%)

جرى تحضير هذا المحلول بأضافة ٠.٦ مل من محلول الفورمالديهايد (٣٧%) الى ٩٩.٤ مل من المحلول الملحي الطبيعي المعقم ليصبح التركيز النهائي ٠.٦%. استخدم هذا المحلول في تحضير المستضد السوطي (H-Ag) Flagellar Antigen لبكتريا *E. coli* (المصدر موجود)

### ٣-٢-٣: محلول ازايد الصوديوم Sodium azide

جرى تحضير هذا المحلول بأذابة ١ غم من مادة ازايد الصوديوم ( $\text{NaN}_3$ ) شركة BDH (الوزن الجزيئي ٦٥.٠١) في ١٠٠ مل من الماء المقطر بحيث اصبح التركيز ١% استعمل هذا المحلول في حفظ عينات المصل Serum لمدة طويلة (Frei et al., ١٩٩٥).

### ٤-٢-٣: محلول كبريتات الامونيوم المشبع Ammonium sulfate Solution

تم تحضيره بأضافة بلورات كبريتات الامونيوم ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )- شركة BDH -الوزن (١٣٢.١٣) بشكل تدريجي الى قارورة زجاجية حاوية على ٥٠ مل من الماء المقطر الذي سبق تسخينه الى ٦٠ م مع الهز المستمر الى الحد الذي تصبح فيه البلورات المضافة لا تذوب، بعد ذلك ترك المحلول لفترة من الزمن حتى تصل درجة حرارته الى درجة حرارة الغرفة، وسوف تظهر طبقة من كبريتات الامونيوم غير ذائبة في اسفل القارورة الزجاجية، فأن الراشح هو كبريتات الامونيوم المشبع، استخدم هذا المحلول لترسيب الاضداد وفصل الكلوبوليئات المناعية (Johnston & Thorpe, ١٩٨٢).

### ٥-٢-٣: محلول بايوريت Biuret solution

جرى تحضير هذا المحلول بإذابة ٠.٣ غم من كبريتات النحاس المائية ( $\text{CuSO}_4 \cdot ٥\text{H}_2\text{O}$ )- شركة BDH -الوزن الجزيئي (٢٤٩.٥) في ٥٠ مل من الماء المقطر وذلك في قارورة حجم ٥٠٠ مل ٩ غم. وفي قارورة اخرى ذوب ١.٢ غم من مادة تترترات الصوديوم-البوتاسيوم ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_7 \cdot ٤\text{H}_2\text{O}$ ) شركة BDH (الوزن الجزيئي ١٦٦) في ٥٠ مل من الماء المقطر. وفي قارورة اخرى ذوب ٦ غم من هيدروكسيد الصوديوم شركة BDH في ٦٠ مل من الماء المقطر.

بعد ذلك اضيف ببطئ محلول تترترات الصوديوم البوتاسيوم الى محلول كبريتات النحاس المائية ثم اضيف بعد ذلك محلول هيدروكسيد الصوديوم مع الهز المستمر خلال هذه العملية، بعد ذلك خفف هذا المحلول الى ٢٠٠ مل باستعمال الماء المقطر أي اضيف ٤٠ مل من الماء المقطر. ثم رشح المحلول البايوريت للتخلص من الشوائب.

### ٦-٢-٣: محلول حامض التانيك Tannic acid solution

حضر هذا المحلول بأذابة ٠.٥ غم من مسحوق حامض التانيك  $\text{C}_76\text{H}_52\text{O}_{46}$ - شركة BDH (الوزن الجزيئي ١٧٠١.٢٢)- في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل ليصبح التركيز ٠.٥%. ثم استعمال هذا المحلول لإزالة المستضدات الموجودة على سطوح كريات الدم الحمر للخراف (Garvey et al., ١٩٧٧).

### ٧-٢-٣: محلول البوريت الملحي Borate-saline solution

حضر هذا المحلول من اذابة ٠.٦ غم من حامض البوريك boric acid- شركة BDH- وتترا بوريد الصوديوم  $\text{Sodium tetraborate}$  شركة TAAB- وكلوريد الصوديوم ٠.٤٣ غم شركة BDH (الوزن الجزيئي ٥٨.٤٤) في ١٠٠ مل من الماء المقطر استخدم هذا المحلول لعزل وتنقية الكلوبوليئين المناعي-كاما (المصدر موجود).

٨-٢-٣: محلول ثوما Thoma's solution  
حضر باضافة ١ مل من حامض الخليك الثلجي الى ١٠٠ مل من الماء المقطر، ثم اضيف الى المزيج ١٠ ملغم من صبغة Gentain. استخدم هذا المحلول لعد خلايا الدم البيض Total leucocyte count في الارانب (١٩٨٤، Diace & Lewis).

٩-٢-٣: محلول ماكفرلاند Macfrland solution  
يتكون هذا المحلول من جزئين:-  
١- محلول A ١% BaCl<sub>2</sub>: يحضر باضافة ٠.١ غم من BaCl<sub>2</sub> الى ١٠ مل من الماء المقطر مع الهز حتى الذوبان.  
٢- محلول B ١% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: يحضر بمزج ١ مل من حامض الكبريتيك المركز مع ٩٩ مل من الماء المقطر مع الهز.  
بعد ذلك يمزج ٦ مل من محلول A مع ٩٤ مل من محلول B. استخدم هذا المحلول كمعايرة لتركيز المستضدات المختلفة لبكتريا *E. coli* (المصدر موجود).

١٠-٢-٣: محلول السيفر Alsever's solution  
حضر هذا المحلول بأذابة ٢٤.٦ غم من مادة الكلوكوز - شركة BDH - و ٩.٦ غم من مادة ستترات الصوديوم الثلاثية - شركة TAAB - و ٥.٠٤ غم من مادة كلوريد الصوديوم NaCl - شركة BDH - في ١٢٠٠ مل من الماء المقطر، وعدل الاس الهيدروجيني الى ٦.١ بواسطة ١٥% حامض الليمون Citric acid، ثم رشح المحلول بمرشح دقيق قطر ثقبه ٠.٢٢ مايكرومتر. واستعمل هذا المحلول لمنع تجلط الدم (١٩٩٦، Talib).

١١-٢-٣: مثبت بوان Bouin's fixative  
حضر هذا المحلول بمزج ٧٥ مل من حامض البكريك المائي المشبع - شركة Merck - مع ٥ مل من الفورمالين ٤٠% - شركة BDH - مع ٥ مل حامض الخليك الثلجي - شركة BDH - وان هذا المحلول تم استخدامه في تثبيت العينات النسيجية (١٩٨٥، Baker & Silverton).

١٢-٢-٣: صبغة هيماطوكسيلين- شب هارس Harris Alum-Haematoxyline stain  
حضرت هذه الصبغة بمزج ٢٠ غم من شب البوتاسيوم - شركة BDH - مع ١ مل صبغة هيماطوكسيلين - شركة BDH - و ٥ غم اوكسيد الزئبق - شركة Fluka - واذابتها في ٢٠٠ مل ماء مقطر، ثم اضيف اليه ١٠ مل من كحول الايثانول المطلق - شركة Fluka - واستخدمت هذه الصبغة في تصنيع المقاطع النسيجية (١٩٨٥، Baker & Silverton).

١٣-٢-٣: صبغة الايوسين الكحولي Eosin stain  
حضرت هذه الصبغة بأذابة ٠.٥ غم من صبغة الايوسين - شركة Riedle - في ١٠٠ مل من ٧٠% كحول الايثانول واستخدمت هذه الصبغة لتصبغ المقاطع النسيجية (١٩٨٥، Baker & Silverton).

### ١٤-٢-٣: لاصق هاوبت Haupt's Adhesive

حضر هذا المحلول من اذابة ١ غم جيلاتين - شركة Fluka في ١٠٠ مل ماء مقطر في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧م، ثم اضافة ٢ غم فينول - شركة BDH. وبعدها ٥ مل غليسول - شركة BDH. واستخدم هذا المحلول في الصاق المقاطع النسجية على الشرائح الزجاجية (Baker & Silverton, ١٩٨٥).

### ١٥-٢-٣: صبغة لثمان Leishman Stain

تم تحضير هذه الصبغة بأذابة ٠.١٥ غم منها شركة Merck في ١٠٠ مل من الكحول الايثيلي المطلق - شركة Fluka. وجرى بعد ذلك وضع الصبغة والكحول في قارورة سدت فوهتها باحكام بوساطة القطن، وسخنت هذه القارورة مدة ١٥ دقيقة في حمام مائي مع الرج المستمر، واستخدمت هذه الصبغة لتمييز وتقريظ كريات الدم البيض بأنواعها في مسحات الدم التي اخذت من الارانب (Baker & Silverton, ١٩٨٥).

### ١٦-٢-٣: محلول الفينول Phenol solution

#### أ- محلول الفينول-A

حضر هذا المحلول بأذابة ٠.٠١ غم من كبريتات النحاس المائية  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  شركة BDH (الوزن الجزيئي ٢٤٩.٥) في كمية قليلة من الماء المقطر، ثم اضيف ٢ غم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH شركة BDH. واخيراً يضاف اليه ٠.٠٣ غم من مادة ترتترات الصوديوم-البوتاسيوم Sodium-Potassium tartrate شركة TAAB (الوزن الجزيئي ١٦٦).

وبعد ذوبان هذه المواد يكمل الحجم النهائي الى (١٠٠ مل) بوساطة الماء المقطر.

#### ب- محلول الفينول-B

يوجد جاهز في الاسواق والمختبرات العلمية لان تحضيره صعب لاحتواءه على بعض المواد الخطرة. هذا الكاشف من شركة BDH-limited poole (England)، اخذت منه كمية (٥ مل) وخففت بالماء المقطر المعقم بنسبة (١:١).

### ١٧-٢-٣: محلول الالبومين وتخفيفه القياسية Standard Albumin solution

حضر هذا المحلول بأذابة ٦٠ غم من الالبومين البقري المخفف شركة BDH (الوزن الجزيئي ٦٥٤٠٠) في كمية قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠.٦ عياري) واكمل الحجم النهائي الى لتر باستعمال نفس المحلول ليكون التركيز النهائي للالبومين ٦٠ غم/لتر. من هذا المحلول تم تحضير التخفيف القياسية (١:١, ٢:١, ٤:١, ٨:١, ١٦:١, ٣٢:١, ٦٤:١, ٢٨:١) على التوالي، والتي تمثل التراكيز (٦٠, ٣٠, ١٥, ٧.٥, ٣.٧٥, ١.٨٧٥, ٠.٩٣٧٥, ٠.٤٦٨٧٥) ملغم/لتر على التوالي. تم التخفيف باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠.٦ عياري). جرى استعمال هذه المحاليل لغرض تحضير المنحني القياسي Standard curve

لمعرفة تركيز الكلوبيولين المناعي- كما ومعرفة تركيز البروتين الكلي (Bioshop et al., ١٩٨٥).

حضرت سلسلة تخافيف منها وجرة تقدير الكثافة الضوئية لكل تخفيف في سلسلة التخافيف وباستعمال تحليل الانحدار الخطي البسيط، احتسبت القيمة المقدرة للتركيز وحددت معادلة الخط المستقيم البسيطة وكانت معادلة من الدرجة الاولى للعلاقة بين قيمة الكثافة الضوئية (X) والتركيز (Y).

استخدم محلول البايوريت لتوفر مواده الاولية وعدم الحاجة فيه الى اجهزة قياس معقدة علماً ان القراءة بطول موجي ٥٤٠ نانومتر جدول (١-٣) شكل (١-٣) بالنسبة الى طريقة بايوريت وهذا يتفق مع باحثين اخرين (Bioshop et al., ١٩٨٥).

استخدم طريقة لوري لقياس تركيز البروتين الكلي وذلك لحساسيتها العالية ودقتها علماً ان القراءة بطول موجي ٧٤٠ نانومتر جدول (٢-٣) شكل (٢-٣) بالنسبة الى طريقة لوري.

$$Y^{\wedge} = bx_i + a$$

$Y^{\wedge}$  = تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحني القياسي لتقدير كمية الكلوبيولين المناعي وتركيز البروتين الكلي.

$X_i$  = الكثافة الضوئية

$a$  = تمثل الفرق بين متوسط لتركيز وبين حاصل ضرب معامل الانحدار (b) تبين متوسط قيم الامتصاص في قراءة المطياف الضوئي.

$b$  = تمثل عامل الانحدار وبحسب المعادلة الاتية

$$b = \frac{S_{Xy}}{S_{XX}}$$

$S_{XY}$  = مجموع مربعات الانحراف القيم X/Y

$S_{XX}$  = تمثل مجموعة مربعات الانحراف القيم X

وتحسب a من المعادلة التالية:-

$$a = \bar{Y} - b \bar{X}$$

$\bar{Y}$  = الوسط الحسابي للتركيز

$\bar{X}$  = الوسط الحسابي للكثافة الضوئية

وحساب عامل الارتباط بواسطة المعادلة الاتية:-

$$r = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sqrt{[\sum X^2 - [\frac{(\sum X)^2}{n}]] [\sum Y^2 - [\frac{(\sum Y)^2}{n}]]}}$$

جدول (١-٣) البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي لتركيز محلول الالبومين ولتخافيفه القياسية.

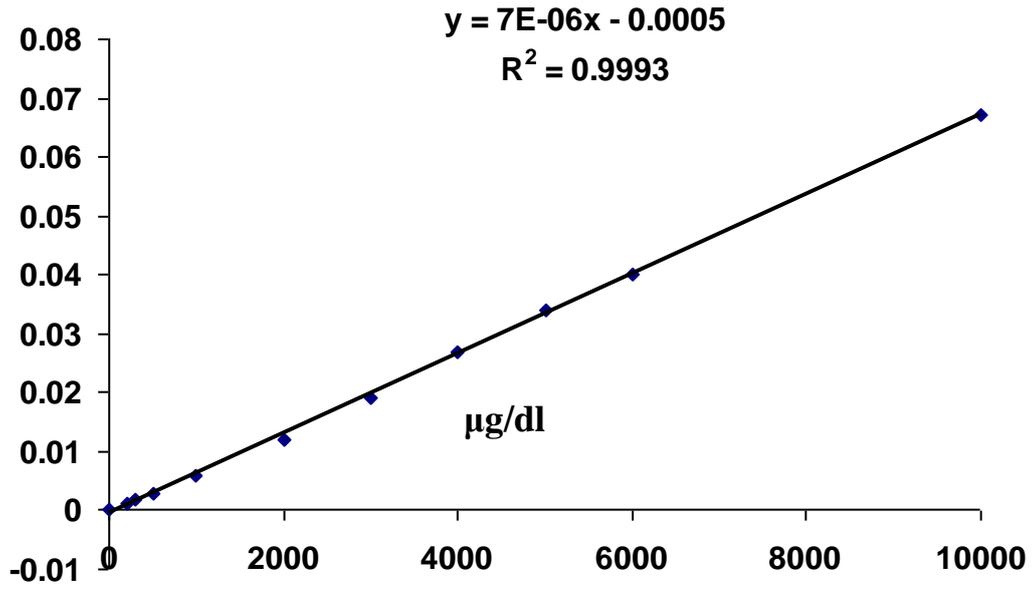
$X_i$	$Y_i$	$XY$	$X^2$	$Y^2$
1.001	6.	6.	1.002201	36.
1.002	3.	3.	1.004004	9.
1.003	10.	10.	1.006009	100.
1.006	7.0	7.	1.012036	49.
1.012	3.70	3.70	1.024144	13.69
1.019	1.870	1.870	1.038361	3.4969
1.027	0.9370	0.9370	1.054729	0.8779
1.034	0.46870	0.46870	1.069156	0.2196
$\Sigma 1.044$	$\Sigma 119.03$	$\Sigma 6.331$	$\Sigma 1.0424$	$\Sigma 219.70$

$$b = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sum X^2 - [\frac{(\sum X)^2}{n}] \quad \sum Y^2 - [\frac{(\sum Y)^2}{n}]}$$

$$a = -bX + Y$$

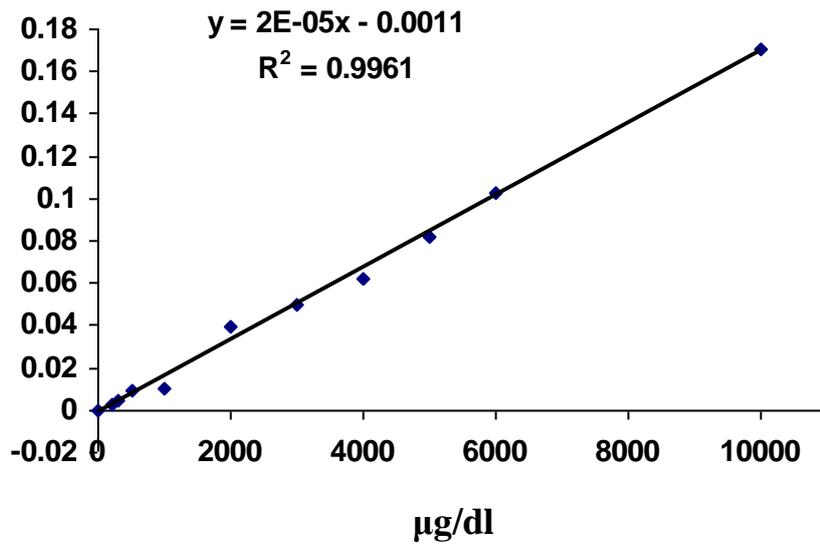
$$Y^{\wedge} = bX + a$$

$$Y^{\wedge} = 1E - 1X - \dots$$



شكل (٣-١) المنحني القياسي لتقدير الكلوبولين المناعي- كما ( $\delta$ -Globuline).

يوجد هنا جدول عرض



شكل (٢-٣): المنحني القياسي لتقدير تركيز البروتين الكلي في امصال الارانب.

٣-٣: عزلات بكتريا اشريشيا- القولون *Escherichia coli* strains  
تم الحصول على عزلات من بكتريا اشريشيا القولون مشخصة تشخيصاً اولياً من  
مستشفى الولادة والاطفال في الحلة، وذلك من اطفال مصابين بالاسهال بأعمار اقل من سنة  
تراوحت بين (٦-٨) اشهر، ولقد اجري على هذه العزلات العديد من الاختبارات التشخيصية  
التأكيديية وبأستخدام كواشف واوساط زرعية مختلفة.

٤-٣: الاوساط الزرعية Culture Media

١-٤-٣: Tryptic Soy Agar

حضر بأذابة ٩ غم من الوسط Tryptic Soy Agar – شركة BDH في كمية قليلة من  
الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، وبعد ذوبان هذه المادة نضع  
في كل انبوب (١٢-١٥) مل، ثم غطيت هذه الانابيب وعقمت بوساطة الموصدة Autoclave  
بدرجة حرارة ١٢١ م° وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا الوسط في تحضير  
المستضد الجسمي O-Antigen (Strukus, ١٩٩٧).

٢-٤-٣: Tryptic Soy broth

حضر بأذابة ٩ غم من الوسط Tryptic Soy broth – شركة BDH في كمية قليلة من  
الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، وبعد ذوبان هذه المادة نضع  
تم تعقيمها بوساطة بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م° وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥  
دقيقة. استخدم هذا الوسط في تحضير المستضد السطحي (H- Flagellium Antigen  
(Strukus, ١٩٩٧) Antigen).

٣-٤-٣: الوسط المغذي الصلب Nutrient agar

حضر هذا الوسط بأذابة (٢٦ غم) من الوسط المغذي الصلب Nutrient agar  
– شركة Oxoid في كمية من الماء المقطر وبعد ذوبان هذا الوسط يكمل الحجم النهائي الى  
٥٠٠ مل من الماء المقطر، استخدم هذا الوسط لغرض تنمية البكتريا ودراسة الخصائص  
المظهرية للمستعمرات وكذلك في حفظ السلالات. ث متعقيم هذا الوسط بوساطة الموصدة  
Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م° وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة (Strukus, ١٩٩٧).

٤-٤-٣: الوسط المغذي السائل Nutrient broth

حضر هذا الوسط بأذابة ٤ غم من الوسط Nutrient broth – شركة  
(Oxoid-Biokit S.A) ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، ثم عقم  
بوساطة بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م° وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة.  
استخدم هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا وتحضير العوالق البكتيرية المختلفة  
(Strukus, ١٩٩٧).

٥-٤-٣: وسط الماكونكي الصلب MacoConkey agar

حضر هذا الوسط بأذابة (٢٠ غم) من الوسط الماكونكي الصلب MacoConkey agar – شركة Himedia (Himedia-Biokit S.A) في كمية قليلة من الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، تم تعقيمه بوساطة بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا الوسط لغرض اختبار نمو البكتريا علية ودراسة خصائص النمو (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٦-٤-٣: وسط اكار اليوريا Urea agar

حضر بأذابة ٥ مل من محلول ٤٠% من اليوريا المعقمة بطريقة الكلوروفورم الى وسط Ureabase agar شركة (Himedia) المحضر من اذابة ٢.٤ غم من هذا الوسط في ٩٥ مل من الماء المقطر المعقم، وزعت المحتويات في انابيب اختبار معقمة وتركت لتتصلب بشكل مائل الاكار. استخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز Urease (Christensen, ١٩٤٦; MacFaddin, ٢٠٠٠).

٧-٤-٣: وسط اكار الجيلاتين Gelatin agar

حضر بأضافة ٤.٤% غم من الجيلاتين – شركة (Judex) الى الوسط المغذي الصلب Nutrient agar، ووزع في اطباق نظيفة ومعقمة. استخدم لغرض التحري عن قابلية البكتريا على تحليل الجيلاتين (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٨-٤-٣: وسط اكار النشأ Starch agar

حضر بأضافة ٢% نشأ Soluble Starch شركة BDH الى الوسط المغذي الصلب Nutrient agar. استخدم هذا الوسط لاختبار قابلية البكتريا على تحليل النشأ (Strukus, ١٩٩٧).

٩-٤-٣: وسط تخمر السكريات Sugar fermentation

أ- الوسط الاساس Medium base

حضر حسب ما جاء في (MacFaddin, ١٩٧٩) بأذابة ٥ غم بيتون Bacto-pepton و ١ غم من خلاصة لحم البقر Bacto-beef extract و ٢.٥ غم من كلوريد الصوديوم NaCl و ٠.٠١٨ غم من دليل احمر الفينول Phenol red في ٥٠٠ مل من الماء المقطر عدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٤، وزعت المحتويات على انابيب اختبار واضيف لكل منها انبوبة درهم Durham tube للتحري عن انتاج الغاز وعقمت الانابيب بالطريقة الاعتيادية Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة (MacFaddin, ٢٠٠٠).

ب- محلول السكر Sugar solution

تم تحضير محاليل السكريات بتركيز ١% وعقمت بوساطة بخار الكلوروفورم، وبما ان معظم السكريات تتلف بالحرارة فقد اضيف القليل من الكلوروفورم الى محلول السكر ورج جيداً ومن ثم ترك يركد ساعة وصار بعدها المحلول معقماً (Smith, ١٩٨٢). ثم سحب من الاعلى بوساطة ماصة معقمة حجم ١ مل من محلول السكر واضيف الى كل انبوبة من الانابيب المعقمة

السابقة في الفقرة (أ). استخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج الحامض وتوليد الغاز من السكريات (Smith, ١٩٨٢).

٣-٤-١٠: وسط ماء البيبتون Pepton water  
حضر بأذابة ٥ غم من الوسط Pepton water شركة (Hazardous) في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر من الماء المقطر. ووزع الوسط على انابيب اختبار. استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج جذور الاندول حسب طريقة (Cruicksank *et al.*, ١٩٧٥)، وعقم بالطريقة الموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١١: وسط احمر المثيل فوكس بروسكور MR-VP  
حضر بأذابة ١.٧ غم من الوسط شركة (HiMedia M٠٧٠) في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل من الماء المقطر. ووزع الوسط على انابيب اختبار وعقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة ووزع على انابيب اختبار. استخدم الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على توليد الحامض والاستيل مثيل كاربينول (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١٢: وسط سيمون ستريت Simmon's citrate  
حضر هذا الوسط بأذابة ٢.٤٢ غم من وسط Simmon's citrate شركة (HiMedia M٠٠٩) في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل من الماء المقطر. ووزع في انابيب اختبار معقمة وتركنت لتتصلب بشكل مائل الاكار. عقم هذا الوسط بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات Citrate بوصفها مصدراً وحيداً للكربون (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١٣: وسط Kligler Iron agar  
حضر هذا الوسط بأذابة ٥.٧٥ غم من الوسط Kligler Iron agar شركة (HiMedia M٠٠٩) في كمية من الماء المقطر وبعد ذوبان الوسط اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر. ووزع في انابيب اختبار معقمة بعد ان عقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة، وترك ليتصلب بشكل مائل الاكار. استخدم للكشف عن البكتريا المنتجة للغاز H<sub>2</sub>S (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١٤: وسط اختبار الحركة Motility Medium  
حضر هذا الوسط بأذابة ١٠ غم من الوسط شركة (HiMedia-Biokit S.A) في كمية من الماء المقطر وبعد ذوبان الوسط اكمل الحجم النهائي الى ٢٥٠ مل من الماء المقطر. وعقم بواسطة المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة، ووضع في انابيب اختبار معقمة وترك ليبرد بشكل عمودي. استخدم لغرض الكشف عن قابلية البكتريا على الحركة (Difco, ١٩٨٤).

٣-٤-١٥: وسط Eosin Methylene blue (EMB)

حضر هذا الوسط بأذابة ٣٧.٥ غم من الوسط (EMB) شركة (HiMedia) في كمية قليلة من الماء المقطر وبعد ذوبان هذا الوسط اكمل الحجم النهائي الى ٢٥٠ مل من الماء المقطر. ثم عقم بوساطة المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م<sup>٠</sup> وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة، ووضع في انابيب اختبار. استخدم هذا الوسط لغرض تفريق بكتريا *Escherichia coli* (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٥-٣: تحضير المستضدات البكتيرية

١-٥-٣: تحضير معلق بكتريا *E. coli* المقتولة بالحرارة Killed antigen، لثق حوالي ١٢ انبوب مائل Slant على وسط Nutrient agar لغرض نموها في سطح هذه الانابيب، غسل السطح النامي باستخدام محلول الملح الوظيفي، ثم جمعت المادة المغسولة في قارورة مفردة. سخنت القارورة في درجة حرارة ٦٠ م<sup>٠</sup> لمدة ساعة في الحمام المائي لقتل هذه البكتريا، ثم بعد ذلك قرب تركيز هذه الجراثيم الى ما يقرب من (٦) من قياس ماكفرلانند (المصدر موجود).

٢-٥-٣: تحضير المستضد الجسمي Somatic antigen

١- باستعمال ماصة معقمة نقل تحت ظروف معقمة بعض القطرات من المزروع البكتيري المأخوذ من المرق الـ Broth الى الوسط الصلب المسمى Tryptic Soy agar الى ستة انابيب مائلة صلبة Slant بحيث رسب هذا الزرع او النمو على كل سطوح الـ Slant ، وحضنت الانابيب لمدة ٤٨ ساعة في درجة حرارة ٣٧ م<sup>٠</sup>.

٢- في نهاية اليوم الثاني نقل تحت ظروف معقمة (١-٢) مل من المحلول Normal saline على سطح النمو، ومن ثم غلق الغطاء. مزج السلاين مع الزرع Culture بحيث اصبح معظم الزرع في المعلق Suspension. بعد ذلك نقل هذا المعلق الى فلاسك معقم وكررت هذه العملية مع الانابيب الستة الاخرى.

٣- وضعت بعد ذلك هذه الانابيب في حمام مائي (١٠٠ م<sup>٠</sup>) واستمر بالغليان لمدة ساعتين. (تم اضافة الماء الى الحمام المائي حتى لا ينقص الماء).

٤- بعد اكتمال التسخين نقل المعلق الى انبوب طرد مركزي معقم وطردت مركزياً لمدة ٢٠ دقيقة بسرعة وفي درجة حرارة ٥ م<sup>٠</sup>.

٥- همل الراشح ثم علق راسب البكتريا في كمية كافية من المحلول الملحي الفورمالين المعقم ٠.٣% Formal saline sterile، وذلك لانجاز عكورة ما يقارب القياس (٦) لـ ماكفرلانند Macrfland (ثم حفظ في الفريزر).

٦- تم الكشف عن التلوث وذلك بنقل (٠.١) مل من المعلق الى انبوبة زرع حاوية على Tryptic Soy agar ثم حضن ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ م<sup>٠</sup>. (المصدر موجود)

٣-٥-٣: تحضير المستضد السوطي Falagellar antigen

١- تحت ظروف معقمة تم نقل (٠.٥) مل من المعلق البكتيري بالماصة واخذت النقلة من المرق المغذي من الجزء العلوي للانبوب الذي حصل فيه النمو (لغرض حجز اغلب الكائنات الحية).

٢- نقل هذا النمو الى فلاسك حاوي (١٠٠) مل من مادة الوسط الزرع المعقم Tryptic Soy agar. ثم حضن في درجة حرارة ٣٧ م<sup>٠</sup> لمدة ٢٤ ساعة.

٣- في نهاية مدة التحضين تم اضافة ١٠٠ مل من ٠.٦% من المحلول الملحي الفورمالين المعقم Formal saline sterile الى الفلاسك ثم ترك لمدة اربعة ايام في درجة حرارة الغرفة ٢٥ م<sup>٠</sup>.

- ٤- في نهاية الاربعة ايام نقل المعلق الى انابيب طرد مركزي معقمة وطرد مركزياً لمدة ٣٠ دقيقة بسرعة ٣٥٠٠ دورة/دقيقة، ثم سكب الراشح وحفظ الراشب.
- ٥- اضيف الى الراشب قليلاً جداً من المحلول الملحي الفورمالين المعقم.
- ٦- تم نقل كل رواسب الانابيب الى فلاسك معقم واضيف اليه قليلاً من المحلول الملحي الفورمالين المعقم حتى يصبح مقارب الى القياس الموجود لمحلول ماكفر لاند M.S (٦). المصدر موجود

### ٦-٣: تمنيع الحيوانات المختبرية

استخدمت طريقتين لتمنيع الحيوانات المختبرية. الاولى طريقة الحقن تحت الجلد Subcutaneous injection، والثانية طريقة الحقن بالبريتون IntraPeritoneally Injection. تم استخدام مساعد مناعي في تمنيع الحيوانات وهو مساعد فرويند الكامل الذي هو التيوبوركلين Freund's complete adjuvunets. Tuberculine بمزجه مع المستضد البكتيري. والآخر هو مساعد فرويند غير الكامل Freund's incomplete adjuvunets والذي هو زيت زهرة oil of Sunflowers ومزج مع المستضدات البكتيرية. حيث تم المساعد المناعي مع المعلق البكتيري بنسبة ١:١.

وكان منوال التمنيع كالآتي:-

- ١- الجرعة الاولى:- تم حقن خمسة ارانب بجرعة مقدارها (١ مل) من المعلق البكتيري الممزوج مع المساعد المناعي فرويند الكامل Freund's complete adjuvunets شركة تحت الجلد Subcutaneous injection في المنطقة تحت الجلد اربع حقنات (٠.٢٥ مل) على كل جانب من جانبي العنق وكذلك منطقة بين الفخذ والبطن (Groin region).
- ٢- الجرعة الثانية: بعد اسبوعين (٢ weeks) تم حقن تلك الارانب الخمسة بنفس المعلق البكتيري وبذات الجرعة (١ مل عبر IntraPeritoneally وبكامل الجرعة مع المساعد المناعي غير الكامل Freund's incomplete adjuvunets.
- ٣- الجرعة الثالثة:- بعد اسبوعين (٢ weeks) تم حقن تلك الارانب الخمسة بذات الجرعة (١ مل) من المعلق البكتيري ومساعد مناعي غير كامل. كما تحقن تحت الجلد كما في الجرعة الاولى.
- ٤- الجرعة الرابعة:- بعد اسبوعين (٢ weeks) تحقن تلك الارانب بذات الجرعة والمعلق البكتيري كما في الجرعة الثانية.
- ٥- بعد اسبوعين من الجرعة الرابعة تشرح الارانب.
- ٦- بالنسبة الى ارانب السيطرة Control فقد حقنت بالمحلول الملحي الوظيفي Normal saline بنفس الجرعة (١ مل) وبنفس المنوال اعلاه.

ملاحظة:-

يعاد التجريع على المجاميع الاخرى من الارانب وبنفس المنوال ولكن باختلاف المستضد البكتيري.

### ٧-٣: استحصال الامصال وحفظها Serum collection and Preservation

بعد انتهاء منوال تمنيع الحيوانات ثم تشریحها وسحب الدم من القلب مباشرة حيث جمع الدم في انابيب معقمة وتركت كي يتخثر الدم، بعدها وضعت هذه الانابيب في جهاز الطرد

المركزي ونبذت لمدة ١٠ دقائق وبسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة. ثم فصل المصل Serum بواسطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة ووضع في انابيب لحفظ العينات وحفظت في المجمدة لحين الاستعمال.

٣-٧-١: تقدير تركيز البروتين الكلي في المصل

تم استخدام طريقة لوري Lawry method في تقدير تركيز البروتين الكلي في المصل وكما يلي:-

١- مزج ١٠٥ مل من محلول (فينول) Phenol solution A (A). وايضاً ١ مل من المحلول البروتيني المراد قياس تركيزه Serum في انبوبة اختبار.

٢- حضر محلول الملح الوظيفي Saline كبلانك Blank يحوي ١.٥ مل من محلول A و ١ مل من الملح الوظيفي Saline في انبوبة اختبار اخرى.

٣- تركت الانبوتين ١ و ٢ في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة.

٤- بعد ذلك تم نقل وبسرعة ٠.٤ مل من محلول B (Phenol solution B) الى كلا الانبوتين ومزجتا فوراً.

٥- تركت تلك الانابيب لمدة ٣٠ دقيقة مرة اخرى.

٦- تم قراءة الامتصاصية Absorption لكل بروتين على طول موجي (٧٤٠ نانومتر) مقابل البلانك Saline-Blank.

٧- رسم منحني يمثل التركيز مقابل الامتصاصية لكل المحاليل التي حضرت وعمل Best fit line خلال النقاط التي حصل عليها.

٨- استخدمت المعادلة الرياضية التالية  $Y=2E-0.05X-0.0011$

$Y$  = تركيز البروتين الكلي (مايكروغرام/دي لتر)

$X$  = الامتصاصية Absorption (Lawry, ١٩٥١; Mendels et al., ١٩٧٦)

٣-٧-٢: عزل الاضداد بواسطة كبريتات الامونيوم المشبعة

١- نأخذ ١.٥ مل من المصل واضيف اليه بشكل تدريجي قطرات من كبريتات الامونيوم المشبعة Ammonium Sulfate saturation وبمقدار (٠.٧٥ مل) وبعد اخر اضافة من كبريتات الامونيوم المشبعة توضع الانابيب في درجة حرارة الغرفة مع الهز المستمر لمدة ساعة كاملة.

٢- طردت مركزياً بسرعة ٤٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة، حيث يكون الراسب هو الكلوبولين المناعي- كما، ولكنه يحتوي بعض البروتينات المصلية أي ليس نقياً بشكل كامل.

٣- ذوب الراسب مرة ثانية وذلك بتعليق الراسب في ١.٥ مل من المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline (٠.٨٥%) مع الهز المستمر.

٤- كررت الخطوتين ١ و ٢ على التوالي لكي نضمن تنقية افضل.

٥- لعزل الكلوبولين المناعي - كما  $\delta$ -Globulin ذوب الراسب في (٠.٥ مل) من محلول Borate-saline solution.

٦- تم قياس تركيز الاضداد بواسطة طريقة البايوريت (المصدر موجود).

٣-٧-٣: قياس تركيز الكلوبولين المناعي- كما

استعملت طريقة بايوريت لقياس تركيز الكلوبولين المناعي - كما حسب طريقة (Bishop et al., 1985) وكالاتي:-

- ١- وضع ٢ مل من محلول الملح الفسيولوجي في انبوبة اختبار خاصة بجهاز المطياف الضوئي (Spectronic ٢١) واضيف اليها (٣ مل) من محلول بايوريت.
- ٢- اضيف الى هذه الانبوبة (٠.٢ مل) من محلول الكلوبولين المناعي - كما الذي حضر في الفقرة (٢-٧-٢) وتترك بدرجة حرارة الغرفة للتفاعل لمدة ٣٠ دقيقة.
- ٣- لتحضير البلانك وذلك لمعايرة الجهاز (انبوبة السيطرة) اضيف (٢ مل) من المحلول الملحي الفسيولوجي، ثم اضيف (٣ مل) من محلول بايوريت الى هذه العملية.
- ٤- تترك هذه الانبوبة بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة لغرض التفاعل.
- ٥- قرأت الامتصاصية على طول موجي مقدار ه ٥٤٠ نانومتر ضد Saline-reagent blank.
- ٦- رسم المنحني القياسي الذي يمثل الامتصاصية مقابل التركيز، بعد ذلك من خلال النقاط التي حصلنا عليها حساب الانحراف القياسي لكل نقطة من هذه النقاط.
- ٧- استخدمت المعادلة الرياضية الاتية:-

$$Y=7E-06X-0.0005$$
$$R^2=0.9993$$

$Y$  = التركيز الكلي للكلوبولين المناعي كما بوحدة ملغم/دي لتر  
 $X$  = الامتصاصية Absorption

- ٣-٧-٤: معايرة الكلوبولينات المناعية الجهازية المتخصصة بالمستضد البكتيري في البداية تم تحضير عالق كريات الدم الحمر للخراف المغطاة بالمستضد البكتيري ومن ثم اجراء التلازن الدموي غير المباشر وكالاتي:-
- ٣-٧-٤-١: تحضير عالق كريات الدم الحمر للخراف المغطاة بالمستضد البكتيري تم دبغ وتغطية الكريات الحمر بمستضدات البكتريا المختلفة لاشريشيا القولون على وفق طريقة (Garvey et al., 1977) كالاتي:-
- ١- تم الحصول على عالق كريات الدم الحمر للخراف في اثناء ذبح الحيوان باستعمال قنينة زجاجية معقمة.
- ٢- تم اضافة مانع التخثر محلول السيفر Alsever's solution الى عالق كريات الدم الحمر للخراف بنسبة ١:١ ومزج معه بلطف، وتم حفظ الدم بدرجة حرارة ٤ م.
- ٣- نقل ٣ مل من دم الخراف بوساطة ماصة نظيفة ومعقمة الى انبوبة الطرد المركزي بعد ذلك نبذ بجهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة.
- ٤- سحب الراشح بوساطة ماصة باستور معقمة وتم الاحتفاظ بالراسب ونقل اليه ١٠ مل من محلول الملح الوظيفي وبعد ذلك مزج جيداً بوساطة ماصة باستور.
- ٥- نبذت هذه الانبوبة في جهاز الطرد المركزي ٥ دقائق بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة ثم ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب.
- ٦- تم اضافة ١٠ مل من محلول الملح الوظيفي الى راسب كريات الدم الحمر ومزج جيداً بوساطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة.
- ٧- اخذ ٣ مل من العالق اعلاه (الفقرة ٦) اضيف اليه ٣ مل من محلول حامض التانيك Tannic acid (٠.٥%) ثم مزج جيداً بوساطة ماصة باستور معقمة وبعد ذلك وضعت الانبوبة في حمام مائي درجة حرارة ٣٧ م لمدة ١٠ دقائق.

- ٨- نبذت الانبوبة في جهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق وبسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة بعد ذلك ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب.
- ٩- تم اضافة ٣ مل من محلول الملح الوظيفي الى راسب كريات الدم الحمر ومزج جيداً بوساطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة، اضيف الى هذا المعلق ٣ مل من المستضد البكتيري للـ *E. coli* وذلك لتغطية كريات الدم الحمر كافة لهذا المستضد وترك هذا المعلق لمدة ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة.
- ١٠-نبذت الانبوبة الحاوية على عالق كريات الدم الحمر المغطاة بالمستضد في جهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق وبسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة.
- ١١- ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب، اضيف اليه ٥ مل من الملح الوظيفي لاجل غسل كريات الدم الحمر، ثم نبذت الانبوبة بجهاز الطرد المركزي بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ٥ دقائق وترك الراشح واحتفظ بالراسب.
- ١٢- تم اضافة ٤ مل من محلول الملح الوظيفي الفسيولوجي الى راسب كريات الدم الحمر المغطاة بالمستضد وذلك لغرض استخدامه في معايرة الاضداد الجهازية المصلية.

٣-٧-٤-٢: التلازن الدموي غير المباشر

- استعمل طبق المعايرة لغرض اجراء التلازن الدموي غير المباشر وفقاً لطريقة Garvey واخرون (١٩٧٧) وكالاتي:-
- ١- وضع في كل حفرة ٥٠ مايكروليتر من المحلول الملحي الفسيولوجي.
  - ٢- اضيف الى الحفرة الاولى ٥٠ مايكروليتر من المصل المحضر وخط بالماصة المايكروية.
  - ٣- نقل ٥٠ مايكروليتر من الحفرة الاولى الى الحفرة الثانية وخط بالماصة المايكروية.
  - ٤- كررت الخطوة السابقة الى حين الوصول الى اخر حفرة، حيث اهمل منها ٥٠ مايكروليتر وبذلك يكون المصل قد خفف مرات عديدة كي نحصل على تخافيف ٢/١ و ٤/١ و ٨/١ و ١٦/١ و ٣٢/١..... ٤٠٩٦/١ بحيث يبقى حجم السائل في الحفر ثابتاً.
  - ٥- اضيف الى كل حفرة ٥٠ مايكروليتر من عالق كريات الدم المغطاة بالمستضد البكتيري ورج الطبق بلطف.
  - ٦- حضن الطبق بدرجة حرارة ٣٧°م ولمدة ٤٥ دقيقة.
  - ٧- اخرج الطبق من الحاضنة وتم تدويره بلطف وسجل مقدار العيار.
  - ٨- وضع الطبق في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة وسجل العيار مرة اخرى.

٣-٧-٥: فحص الانتشار المناعي الشعاعي Single Radioactive Immunodiffusion assay

- استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد لتقدير مستوى الكلوبولينات المناعية IgG و IgM و IgA والمتتم C<sub>٣</sub> و C<sub>٤</sub> وصفت باختبار منسيني Mancini test (Mancini et al., ١٩٦٥). وكذلك حسب ما ورد في تعليمات الشركة المصنعة المرفقة مع الاطباق الخاصة بهذا الفحص (Biomaghreb, ٢٠٠٢). حيث ان الهلام Gel الموجودة فيه الحفر حاوي على الضد احادي المتخصص Antimonospecific.
- يتم انتشار النموذج Sample بشكل شعاعي خلال الهلام والمستضد يكون حلقة راسب مع الضد الاحادي، ويتم احتساب النتيجة بوساطة جدول القياسات المرفق مع عدة الفحص (Rowe et al., ١٩٧٢; Palmer et al., ١٩٧٢) وكانت طريقة العمل كالاتي:-

- ١- فتح الطبق وترك لمدة ٥ دقائق بدرجة حرارة الغرفة وذلك للسماح بإزالة أي رطوبة موجودة في الطبق عن طريق التبخر.
  - ٢- وضع ٥ مايكروليتر من عينات المصل Serum في حفر الاطباق المرقمة من ١-١٢ والحاوية على الاكاروز Agarose، و ٠.١٥% من Sodium azide والمصل المضاد احادي التخصص Monospecific Anti-serum.
  - ٣- وضعت قطعة قطن رطبة او Wet gauze في مركز الطبق وذلك لتجنب جفاف الاكاروز Agarose dehydration، ثم غلق الطبق بأحكام جيد وبلطف.
  - ٤- وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة ٢٣م لمدة ٤٨ ساعة بالنسبة للمتمم C<sub>٢</sub>، IgG، IgA، C<sub>٤</sub> ولمدة ٧٢ ساعة بالنسبة للـ IgM.
  - ٥- تم اخراج الاطباق في الحاضنة وبعدها قياس القطر لحلقة الترسيب المتكونة حول كل حفرة بواسطة المسطرة الخاصة بالقياس.
- تم استعمال الجدول المرفق مع عدة الفحص المجهزة من الشركة لاجاد قيمة التركيز المقابلة لقطر حلقة الترسيب مباشرة وقد تم تسجيل النتائج بوحددة mg/dl.

### ٨-٣: جمع عينات الدم مع مانع تجلط

بعد انتهاء منوال التمنيع للحيوانات وتثريتها تم جمع الدم من القلب مباشرة، حيث جمع الدم في انابيب معقمة حاوية على مانع تجلط EDTA-Dispo- AFMA التي تستعمل مرة واحدة وحفظت في الثلجة لقياس العدد الكلي لخلايا الدم البيض وكذلك العدد التفريقي لخلايا الدم البيض (Soberg, ١٩٦٩).

### ١-٨-٣: طريقة قياس العدد الكلي لخلايا الدم البيض Total leukocyte count

تم حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض في المليمتر المكعب الواحد من الدم باستعمال مقياس الخلايا الدموية Koral Kolb Hemocytometer ذي الشريحة الزجاجية من نوع Improved Number Slide . استخدم محلول ثوما Thoma's solution في هذه الطريقة حسب (Daci & Lewis, ١٩٨٤).

### ٢-٨-٣: حساب العدد التفريقي لخلايا الدم البيض Differential Leukocyte count

حسبت النسبة المئوية لخلايا الدم البيض حسب ما ذكره Talib و Khuran (١٩٩٦) وذلك بعمل مسحة دموية (حيث وضعت قطرة من الدم على شريحة زجاجية نظيفة وسحبت بحافة شريحة زجاجية اخرى بزاوية ٤٥° باتجاه حافة الشريحة الاخرى. ثم صبغت بصبغة ليشمن Leishman's stain وباستعمال عداد يدوي Handy tally counter تم حساب ١٠٠ خلية دم بيضاء، ومن خلال العدد الكلي لخلايا الدم البيض والنسبة المئوية لكل نوع من خلايا الدم البيض تم استخراج العدد المطلق لكل نوع من خلايا الدم البيض في المليمتر المكعب الواحد. وقد استخدمت قوة التكبير (١٠٠X) لهذا الغرض (المصدر موجود)

### ٩-٣: تحضير المقاطع النسيجية لطحال الارانب

بعد انتهاء منوال التمنيع وتثريح الحيوانات تم اخذ عينات من الطحال ووضعت في محلول الملح الوظيفي المعقم (٠.٨٥%)، ثم حفظت هذه العينات في محلول بوان Bouin's

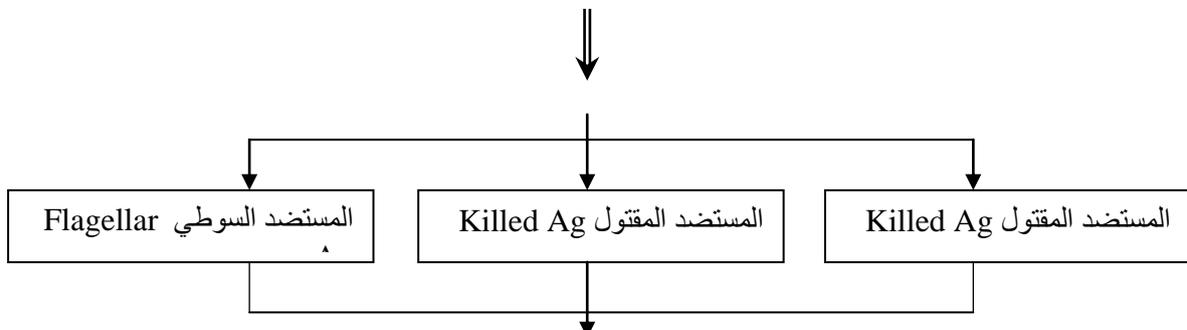
Fixative لمدة ٢٤ ساعة (Humason, ١٩٧٢)، بعدها تم اتباع الخطوات الخاصة بتحضير المقاطع النسيجية (Baker & Silverton, ١٩٨٥). تم التقييم الكمي لأنواع الخلايا الموجودة في المقطع النسيجي لانسجة الطحال.

- ١٠-٣: دراسة اختبار الجلد Skin test المتوسط بالاستجابة المناعية الضدية المتخصصة وبدلالة فرط الحساسية المتأخرة لمستضدات بكتريا اشريشيا القولون *E. coli*
- ١- حقن ٠.١ مل من محلول المستضد البكتيري في الجزء العلوي من المعدة في منطقة سبق وان حلقت بقطر (ثلاث انجات) في منطقة الادمة Intradermally بحيث يكون انتفاخ Bleb وهذا الانتفاخ يختفي خلال دقائق، وفي نفس الوقت حقن في المنطقة المقابلة ٠.١ مل من المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline ٠.٨٥٪) كسيطرة Control.
- ٢- تم احاطة منطقة الحقن بقلم احمر.
- ٣- بعد ٢٤ ساعة من الحقن تم قياس قطر الاحمرار بـ (ملم mm) وهو يدل على الاستجابة الضدية الخلطية Humoral Immune Response والمتمثلة بفرط الحساسية الانية Immediate hypersensitivity (Bhatia & Ichhenjani, ١٩٩٤).
- ٤- بعد ٢٤ ساعة تم قياس قطر الاحمرار بـ (ملم mm) وهو يدل على الاستجابة المناعية الخلوية Cellular Immune Response والمتمثلة بفرط الحساسية المتأخرة Delayed hypersensitivity (Burrell, ١٩٧٩; Garvey et al., ١٩٧٧).

١١-٣: منوال الدراسة

جرى اتباع منوال الدراسة يبدأ بعزل بكتريا اشريشيا القولون من الاطفال الرضع ثم فصل مستضدات هذه البكتريا ودراسة الاثر المناعي لها وكما هو مبين في الشكل الاتي:-  
عزل بكتريا اشريشيا القولون من الاطفال  
الرضع المصابين بالاسهال دون ١ سنة

التشخيص الكيموحيوي والنهائي للبكتريا



عزل مستضدات بكتريا اشريشيا القولون

حقن المستضد البكتيري بعد مزجه مع المساعد المناعي  
في الحيوانات المختبرية كل على حده

جمع الدم والحصول على الامصال

دراسة تأثير كل من المستضدات البكتيرية أعلاه  
على الاستجابة المناعية في الارانب

ملحق (٢): المعالم والبيانات الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي لتركيز البروتين وتخفيفه القياسية.

الكثافة الضوئية $X_i$	التركيز $Y_i$ ملغم/مل	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$(Y_i - \bar{Y})$	$(Y_i - \bar{Y})^2$	$(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})$
٠.٠٠٣	٦٠	-٠.٠١٦٣	٠.٠٠٠٢٦٥	٤٢.٦٦	١٨١٩.٨٧	-٠.٦٩٥٣٥٨
٠.٠٠٥	٣٠	-٠.٠١٤٣٣	٠.٠٠٠٢٠٥	١٢.٦٦	١٦٠.٢٧	-٠.١٨١٤١٧٨
٠.٠٠٩	١٥	-٠.٠١٠٣٣	٠.٠٠٠١٠٦	-٩.٨٤	٩٦.٨٢٥	٠.١٠١٦٤٧٢
٠.٠١	٧.٥	-٠.٠٠٩٣٣	٠.٠٠٠٠٨٧	-١٣.٥٩	١٨٤.٦٨	٠.١٢٦٧٩٤٧
٠.٠٣٩	٣.٧٥	٠.٠١٩٦٧	٠.٠٠٠٣٨٦	-١٥.٤٦	٢٣٩.٠١	-٠.٣٠٤٠٩٨
٠.٠٥	٠.٩٣٧٥	٠.٠٣٠٦٧	٠.٠٠٠٩٤٠٦	-١٦.٤٠	٢٦٩.٠٤	-٠.٥٠٢٩٨٨
$\sum = ٠.١١٦$ $\bar{X} = ٠.٠١٩٣٣$	$\sum Y_i = ١٠٤.٠٦٢٥$ $\bar{X} = ١٧.٣٤$		$\sum = ٠.٠٠١٩٨٩٦$		$\sum = ٢٧٦٩.٧٠٠٦$	$\sum = ١.٤٥٥٤١$

$$b = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum (X_i - \bar{X})^2}$$

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

$$\hat{Y} = ٢٤.٠٥X - ٠.٠٠١١$$

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \sum (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

المعادلة النهائية لقياس تركيز البروتين

## الفصل الاول Chapter One

### استعراض المراجع

#### ٢-١: الموثينات The Prostaglandins

١-٢-١: نظرة عامة

الموثينات هي مجموعة من الاحماض الشحمية الكربوكسيلية المتعددة غير المشبعة PolyUnsaturated Fatty Acids والفعالة حيويًا (Sales & Jabbour, ٢٠٠٣)؛ عشير والعلوجي، ١٩٨٩)، اكتشفت هذه المركبات لأول مرة في عام ١٩٣٠ من قبل العالمان كيرزورك Kurzrok وليب Leib حيث اشار هذان الباحثان الى وجود مركبات في السائل المنوي للانسان تسبب تقلص العضلات الرحمية عند دراستها خارج الجسم الحي (في الزجاج In Vitro) (محي الدين وجماعته، ١٩٩٠؛ ١٩٨٠، Moncada et al.). وسميت بالموثينات Prostaglandins من قبل العالم Von Euler اعتقاداً منه بأن اصل السائل المنوي من غدة التوتة او البروستات (Horton & Main, ١٩٦٣).

الموثينات هي احد انواع البروستنويدات Prostonoides (Lama et al., ٢٠٠٢). وهي مجموعة مركبات من مجموعة مركبات من مجموعة اكبر تسمى الايكوسانويدات Eicosanoids (Pamelo & Richard, ١٩٩٤; Conte et al., ١٩٩٩) والتي تشمل زيادة على الموثينات، الثرمبوكسانات Thromboxans وبعض مشتقات الهيدروكسي والهيدروبيروكسي للاحماض الدهنية فضلاً على الليوكترينات Leukotrienes (Sales & Jabbour, ٢٠٠٣). وقد سجل الباحثون مجموعة جديدة عرفت بمشابهات الموثينات Isoprostanes تتولد بواسطة ميكانيكية الاكسدة غير الانزيمية باشتراك الجذور الحرة Free-radical dependent pathway (Kunapuli et al., ١٩٩٧).

تمتلك الموثينات هيكل كاربوني واحد يحتوي على ٢٠ ذرة كاربون اذ تتكون من حلقة خماسية Cyclopentane ring مرتبطة بسلسلتين جانبيتين شكل (١-١) (Moncada et al., ١٩٨٠)، وقد شخصت العديد من انواع الموثينات ولكنها تصنف على اصناف تبعاً الى التحويرات حلقة السايكلوبنتان (Narumiya et al., ١٩٩٩) سميت بحروف كبيرة (A, B, E, F, G, H, I) يتبعها رقم وبعض الاحيان رمز لاتيني ( $\beta$ ,  $\alpha$ ) تميز هذه الاصناف على اساس المجاميع الفعالة حول حلقة السايكلوبنتان في حين تشير الارقام ١,٢,٣ الى عدد الاواصر المزدوجة في السلاسل الجانبية فمثلاً يحتوي الموثين  $E_1$  على اصرة مزدوجة في حين يحوي الموثين  $E_2$  على اصرتين مزدوجتين (محي الدين وجماعته، ١٩٩٠)، في حين يشير الرمز ( $\alpha$ ) الى ان مجموعة الهيدروكسيل تنبثق اسفل سطح حلقة السايكلوبنتان بنفس اتجاه مجموعة الكربوكسيل المتصلة بالذرة رقم (١١)، اما اذا انبثقت فوق سطح الحلقة فيرمز لها ( $\beta$ ) (Devilin, ١٩٨٦; Moncada et al., ١٩٨٠).

تنتج الموثينات في العديد من الانسجة (Karim et al., ١٩٦٧) وقد شخصت كميات منها في معظم الانسجة منها الطحال Spleen والرئة Lung والجلد Skin والدماغ Brain والتوتة Thymus وغيرها (Usihara et al., ١٩٨٨).

## ٢-٢-١: التخليق الحيوي للموئينات Biosynthesis of prostaglandins

الموئينات هي لييدات فعالة حيويأ (Sales & Jabbour, ٢٠٠٣) تنتج من الاحماض الدهنية الاساسية Essential fatty acids بواسطة عمل انزيمات التحلل المائي والذي يحول هذه الاحماض الى احماض دهنية تعد بوادئ اساسية Primary precursor لانتاج الموئينات (Arosh *et al.*, ٢٠٠٤). ويعد حامض الاركيونك Arachidonic acid المصدر المباشر والاساسي لانتاج الموئينات (Callejas *et al.*, ١٩٩٩). وبسبب اصل نشوء الموئينات من حامض الاركيونك الذي يعد من مكونات الدهون الفوسفاتية للاغشية البايولوجية للخلية (Arosh *et al.*, ٢٠٠٤) فقد افترض ان غشاء الخلية هو الموقع الرئيس لبناء الموئينات (Narumiya & FitzGerald, ٢٠٠١).

ان مسارات التكوين الحيوي للموئينات في الانسجة تبدأ استجابة لمحفزات ميكانيكية او كيميائية او هرمونية كتلف الخلايا Cell injury (Moncada *et al.*, ١٩٨٠) الذي يؤدي الى تحرر حامض الاركيونك من طبقة الدهون الفوسفاتية للاغشية البايولوجية (Tanioka *et al.*, ٢٠٠٠)، توجد اثنان من انزيمات التحلل المائي المتضمنة في تحرر حامض الاركيونك هما Acyl CoA Lysophospholipid Acyl Transferase (ACLAT) وانزيم الفوسفولايبيز ٢ A<sub>٢</sub> السايبولازمي (Norman & Poyser, ٢٠٠٠).

يتبع حامض الاركيونك حال تحرره احد المسارين، اما مسار انزيم اليبواوكسجينيز Lipoxygenase لتكوين الليوكتريينات (Pamela & Richard, ١٩٩٤; Leukotrienes Ghosh *et al.*, ٢٠٠٤) خلال مسار انزيم السايكلواوكسجينيز (COXs) والذي يدعى احياناً بمسار انزيمات تصنيع الموئينات Prostaglandin Synthase pathway (Lama *et al.*, ٢٠٠٢)، يتأكسد حامض الاكيونك بفعل انزيمات COX بواسطة اضافة مجموعة ١٥-هايدروبيروكسي hydroperoxy group ليكون الموثين G<sub>٢</sub> (PGG<sub>٢</sub>) وهذا الاخير يختزل الى الموثين H<sub>٢</sub> (PGH<sub>٢</sub>) بواسطة اضافة مجموعة هايدروكسي Hydroxy group (Sales & Jabbour, ٢٠٠٣). تعد الموئينات PGG<sub>٢</sub> و pgh كبروكسيديات داخلية تتحول الى الموئينات وتخدم كمادة اساسية Substrate لانزيمات تصنيع البروستونيدات النهائية Terminal prostanoid synthase enzyme (Arosh *et al.*, ٢٠٠٣). وهذه الانزيمات تسمى حسب نوع الموثين الذي يحفز تصنيعه، يتكون الموثين F<sub>٢</sub>α مثلاً بواسطة Prostaglandin-D-Synthase (PGFS) ، الموثين D بواسطة Prostaglandin-F-Synthase (PGFS) (Sales & Jabbour, ٢٠٠٣) كما موضح بالشكل (٢-١).

تعمل العقاقير الستيرويدية المضادة للالتهابات Steroidal Anti-inflammatory Drugs (SAIDs) مثل Aristolochic acid الى تثبيط عمل انزيم الفوسفولايبيز ٢ (Pamela & Richard, ١٩٩٤)، في حين تعمل العقاقير غير الستيرويدية المضادة للالتهابات Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) مثل الاسبرين والاندوميثاسين الى تثبيط انتاج الموثين من خلال تثبيط انزيم (COXs) (Loscher & Blazaki, ١٩٨٦; Conte *et al.*, ١٩٩٩) و (COX-١) و (COX-٢) اذ يحافظ الاول على استقرارية الخلية والاتزان البدني Cell homeostasis، يشترك الثاني في تخليق الموئينات في حالات الخطر كالالتهابات Inflammation لذلك صممت حديثاً ادوية لا تمتلك تأثيرات مضادة لانزيم COX-٢ لتقليل التأثيرات الجانبية المرافقة لتثبيط الموئينات الضرورية لادامة حيوية الخلية وبقاءها (Norman & Poyser, ٢٠٠٠). بينما اشارت بعض الدراسات الى استخدام بعض مثبطات تخليق الموثين غير الستيرويدية مثل

الاندوميثاسين Indomethacin في تحسين الخصوبة لدى بعض مرضى العقم وبالأخص الرجال المصابين بقلة النطف Oligozoopermia والتي تتميز بارتفاع الموثينات من نوع E في هؤلاء المرضى (Metwali *et al.*, ١٩٩٤).

### ١-٢-٣: آلية فعل الموثينات Mechanism of prostaglandin action

تنظم الموثينات مدى واسع من العمليات الفسيولوجية مثل الالتهابات Inflammation والاستجابة المناعية Immuno responses (Walch *et al.*, ٢٠٠٣) حيث تقوم الموثينات بفعالها الرئيسية من خلال مستقبلاتها وهي احد انواع مستقبلات البروتين G المزدوجة G- (Sales & Jabbour, ٢٠٠٣; Jobbour *et al.*, protein coupled receptor (GPCR) (٢٠٠٥). توجد هذه المستقبلات على الغشاء البلازمي Plasma membrane للخلية الهدف، ارتباط الموثين بهذه المستقبلات يؤدي الى زيادة تركيز الكالسيوم الحر داخل الخلية ومن ثم تنشيط انزيم البروتين كينيز C Protein Kinase (PKC) (Tsia *et al.*, ٢٠٠١). لقد اوضح الباحث جوردن وزملائه (Jourden *et al.*, ١٩٩٧) ان المركبات شبيهة الموثينات Prostaglandin-like compounds Isoprostanes (كما اشرنا سابقاً) تؤدي افعالها الفسيولوجية عن طريق هذه المستقبلات (Hermenegildo *et al.*, ٢٠٠٢). في حين ذكر الباحث فيزا وجماعته (Veza *et al.*, ٢٠٠١) الى ان فعل الموثين ينقل عبر مستقبلاته او يورد داخل الخلية عبر نواقل Transporter لها ألفة عالية للموثين  $F_2\alpha$  و  $E_2$ ، في حين لها الفة واطئة للثرمبوكسانات والبروستوسايكلين ( $PGI_2$ ) ولكن لم يعرف الا القليل حول هذه النواقل، وعرف اول ناقل في الجرذان وسمي (Rat PGT) واخر في الانسان وسمي (h PGT). كما عينت الجينات المسؤولة عن تكوينها.

تختلف الموثينات في فعاليتها الفسيولوجية وممن الممكن ان يشترك نوع واحد من الموثينات في عدة عمليات فسيولوجية في حين تبدو في بعض الاحيان ان هذه الافعال متعاكسة (عشير والعلوي، ١٩٨٩) فقد لوحظ ان تجلط الدم يحصل نتيجة عمل الثرمبوكسان حيث يحفز تجمع الصفائح الدموية وتقلص الاوعية الدموية (Hammarstrom & Falardeau, ١٩٧٧; Pratico & FilzGerald, ١٩٩٥). في حين يمنع البروستوسايكلين تجميع الصفائح الدموية (Devlin, ١٩٨٦) لذلك في الحالات الطبيعية لا يتجلط الدم بسبب تغلب انتاج البروستوسايكلين على انتاج الثرمبوكسان، كما يعمل الموثين  $F_2\alpha$  على زيادة ضغط الدم في حين يعمل الموثين  $E_2$  على خفضه (عشير والعلوي، ١٩٨٩).

تؤدي الموثينات افعالها الفسيولوجية بتركيز قليلة حيث تكون هذه التراكيز قادرة على تحفيز المستقبلات (Veza *et al.*, ٢٠٠١)، ونتيجة لذلك ينشط او يثبط الادرينيل سايكليز Adenyl cyclase (Walch *et al.*, ٢٠٠٣). في حين اكد دراسة اخرى (Fujino *et al.*, ٢٠٠٠) ان فعل الموثين يكون بتركيز قليلة جداً وذلك من خلال تنشيط Inositol Phosphate (IP). كما اشار الباحث (Kim *et al.*, ٢٠٠٣) الى ان فعل الموثين خلال مسار (IP) لا يعتمد على تركيز الكالسيوم داخل الخلية.

يتوقف تأثير الموثين بصورة كبيرة على نوع النسيج وحسب الانواع والظروف التجريبية (Moncada *et al.*, ١٩٨٠) واعتماداً على الجرعة المعطاة (السعدي، ١٩٩٢).

### ١-٣-٣: الموثينات وفسلجة التكاثر Prostaglandin & Reproduction physiology

١-٣-١: دور الموثينات في الجهاز التوالدي الذكري.

لقد ادى اكتشاف الموثينات للوهلة الاولى في السائل المنوي للانسان الى اجراء المزيد من البحوث والتحريات عن هذه المركبات ودورها في التكاثر باعتبارها مساهمات اساسية في هذه العملية (Kelley et al., 1979)، اذ اشار الباحثان جوزيف وسويلي (Joseph & Siwela, 1976) ان الموثينات تلعب ادوار اساسية في الفسلجة التكاثرية للذكور حيث للموثين  $F_{2\alpha}$  اثر مهماً في خفض الكولسترول في الخصى ومستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone عند حقنه لذكور الفئران والجرذان، في حين ذكر الباحث (Saksena et al., 1974) ان الجرعة العالية من الموثين  $F_{2\alpha}$  تسبب نقصاً في مستوى هرمون الشحمون الخصوي وبالتالي في كبح عملية نشأة النطفة. وهذا يناقض ما توصل اليه اخرون من ان خفض  $F_{2\alpha}$  في الثور يؤدي الى ارتفاع في مستوى هرمون الشحمون الخصوي بالاضافة الى ارتفاع مستوى الهرمون اللوتيني في البلازما (Kiser et al., 1976).

وفي الدراسات التي اجريت حول دور الموثينات في الخصوبة Fertility فقد اشار الحبوبى (Al-Haboby, 1998) الى زيادة اعداد النطف المنتجة في الاكباش عند حقنها بالموثين  $F_{2\alpha}$ ، وهذا يتفق مع ما توصل اليه الباحث (Hess, 2002) من ان الموثين  $F_{2\alpha}$  يزيد العدد الكلي للنطف المنتجة في الكلاب عند حقنها بالموثين  $F_{2\alpha}$ . كما ذكر الباحث (Fayed, 1995) ان اضافة الموثين  $F_{2\alpha}$  الى وسط يحوي السائل المنوي للارانب يؤدي الى تحفيز حركة النطف، وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث (Kennedy et al., 2003) في ان الموثين ينشط حركة النطف في الديك الرومي المنزلي الا انه يكبح الخصوبة بالرغم من ان سبب الكبح غير معروف الا انه من المحتمل ان الموثين يخفض القدرة الاخصابية Fertility ability للنطفة الناضجة في القناة التناسلية الانثوية حيث لوحظ ان الموثين يزيد النسبة المئوية لحصول ضرر في غشاء النطفة وبالتحديد في الجسم الطرفي للنطفة Acrosome body والذي يؤدي الى نضوح الانزيمات الضرورية لاختراق اغلفة البيضة وهي (Transaminase, Lactate dehydrogenase) (Fayed, 1995) وهذا يشير الى دور الموثينات في زيادة نفاذية الاغشية Permeability (Kennedy et al., 2003).

يعتقد ان وجود الموثينات في البلازما المنوية يساعد على تنشيط حركة النطف وانتقالها داخل القناة التناسلية الانثوية من خلال تأثيرها المباشر في العضلات الملساء للقناة (Chang et al., 1973) حيث ذكرت دراسات اخرى ان اعطاء الموثين  $F_{2\alpha}$  يؤدي الى زيادة قابلية النطف على اختراق عنق الرحم Cervical mucus وانتقالها الى داخل الرحم وقناة فالوب Fallopian tube لتخصيب البيضة (Eskin et al., 1973)، فضلاً عن ذلك فان الموثينات لها اهمية في عملية الدفق Ejaculation والانتصاب Erection من خلال تأثيرها في العضلات الملساء للقناة التناسلية الذكرية (Genedella, 1975).

كما ذكر الباحث (Kennedy et al., 2003) الى دور الموثينات في عملية التمكين Capacitation وبالتحديد الموثين  $E_2$  باعتباره عامل تمكين Capacitation agent ودوره في تفاعلات الجسم الطرفي Acrosomal reaction ومساعدة النطفة في اختراق اغلفة البيضة، ومن جهة ثانية فقد ذكرت البحوث الى ان حقن الموثين  $F_{2\alpha}$  قبل تجمع المنى مباشرة يؤدي الى زيادة حجم في الخيول (Kreider et al., 1981)، وازدياد اعداد النطف المنتجة في الاكباش دون التأثير في نوعية السائل المنوي وذلك من خلال تأثير الموثين  $F_{2\alpha}$  في زيادة التقلص للعضلات الملساء في القناة التناسلية الذكرية وبالتالي ازدياد اعداد النطف الموجودة في البربخ قبل القذف (Al-Haboby et al., 1998).

### ١-٣-٢: دور الموثينات في الجهاز التوالدي الانثوي.

وفي الدراسات التي اجريت على الجهاز التكاثري الانثوي تبين ان الموثينات تنظم وظائف المبيض في عدد من اللبائن ومن ضمنها الانسان (Tsai *et al.*, ٢٠٠١). ولعل اوضح دور تقوم به الموثينات فهو تحفيزها لتقلص العضلات الملساء (Ito *et al.*, ٢٠٠٣)، لذا استعمل الموثين لحث الولادة Parturition (Devlin, ١٩٨٦). بالاضافة الى دور الموثين في عملية الاباضة Ovulation وذلك من خلال تأثير الموثين على افراز الهرمون المصفر او اللوتيني Luteinizing hormone (Tilley *et al.*, ١٩٩٩) المسمى ايضاً بهرمون الاباضة بسبب تحفيزه لعملية الاباضة (عشير والعلوجي، ١٩٨٩).

لقد اشار العديد من الباحثين الى دور الموثينات في تحلل الجسم الاصفر وبالاخص الموثين  $F_{2\alpha}$  لذا عرف Luteolysis (Zetser *et al.*, ٢٠٠٣; Barthewski *et al.*, ٢٠٠١).

ولقد اكد الباحث (Stacy *et al.*, ١٩٧٦) ان الرحم يسيطر على بقاء الجسم الاصفر Corpus luteum من خلال افراز البروستوكلاندين، اذ يعمل الموثين على احداث ارباك في الوظائف الافرازية للجسم الاصفر والمتمثل بهرمون البروجستيرون، فلقد ذكر الباحث (Tsai *et al.*, ٢٠٠١) وفي دراسة اجريت على قرود الرئيسيس ان الموثين سبب نقصاً في مستوى هرمون البروجستيرون من خلال تثبيط الهرمون اللوتيني والذي يحفز تصنيع هرمون البروجستيرون. فضلاً عن ذلك فان الموثين  $F_{2\alpha}$  يؤدي الى حدوث سلسلة من التغيرات التركيبية والكيميائية غير الطبيعية في الخلايا اللوتينية والمتمثلة بتجميع كميات من الدهن Lipid ونقصان في الشبكة الاندوبلازمية الملساء Smooth Endoplasmic reticulum وزيادة في الرايبوسومات Ribosomes والشبكة الاندوبلازمية الخشنة Rough Endoplasmic reticulum. تبلغ هذه التغيرات ذروتها بتحليل الجسم الاصفر وانهاء الحمل او الدورة الشبقية (Stacy *et al.*, ١٩٧٦)، في حين اكد الباحثون (Tsai *et al.*, ١٩٩٩; McCracken *et al.*, ٢٠٠١) ان الية عمل الموثين  $F_{2\alpha}$  في تحليل الجسم الاصفر تأتي من قدرته بتثبيط تصنيع الستيرويدات من خلال نقصان جريان الدم المغذي Nutrient blood flow الى الانسجة الافرازية في الجسم الاصفر وبالتالي نقصان البروجسترون الذي يعمل على ادامة الجسم الاصفر (Albalancy *et al.*, ٢٠٠١؛ عشير والعلوجي، ١٩٨٩)، من جهة اخرى اوضحت احدى الدراسات (Juengel *et al.*, ٢٠٠٠) ان الموثين  $F_{2\alpha}$  يخفض تصنيع mRNA المشفر لعدة بروتينات مهمة في تنظيم تصنيع البروجستيرون وتتضمن مستقبلات LH.

كما ذكر الباحث اسيلين وزملائه (Asselin *et al.*, ١٩٩٦) ان الموثين  $E_2$  هو عامل مغذي للجسم الاصفر Luteotrophic لذلك فهو ضروري في عملية الانغراس Implantation لذا فان هذا الموثين هو ضروري لاتمام الحمل Conceptus وذلك من خلال قدرته في زيادة النفاذية الوعائية Vascular permeability للرحم.

تؤثر الموثينات من نوع  $E_2$  و  $F_{2\alpha}$  في استجابة الرحم للاصابة البكتيرية فقد اشار الباحث لويس (Lewis, ٢٠٠٣) ان للموثينات  $E_2$  و  $F_{2\alpha}$  دور مهم في تحويل الرحم Ruminants من مقاوم الى قابل للاصابة البكتيرية عند زيادة مستواها وذلك من خلال زيادة مستوى هرمون البروجسترون الذي يحفز الرحم لتصنيع بروتينات تعرف ببروتينات الكبح المناعي Immunosuppressive، فضلاً عن ذلك فقد لوحظ ان النساء اللواتي يعنين من امراض في القناة التكاثرية ومنها امراض التهاب البطانة الرحمية Endometriosis - فرط الطمث Menorrhagia او اضطراب في الدورة الشهرية Dysmenorrhoea او سرطان الرحم Carcinomas ان هناك زيادة في مستوى هذه المركبات (Kurt & Henery, ٢٠٠٣). وقد سجل عن الموثينات دورها في تسهيل انتقال النطفة خلال القناة التكاثرية الانثوية

من خلال تأثيرها على العضلات الملساء لقناة البيض، كما ان الموثين ضروري في ما يسمى بالبيئة الدقيقة Microenvironment لقناة البيض في انجاح عملية الاخصاب Fertilization (Tilley *et al.*, ١٩٩٩).

ومن جهة ثانية فقد اشار الباحث (Kurt & Henery, ٢٠٠٣) ان هناك علاقة بين مستوى الموثين  $F_{2\alpha}$  وهرمون معجل الولادة Oxytocin حيث ان الاوكستوسين يحفز انتاج  $PG F_{2\alpha}$  وزيادة الاخير تحفز زيادة انتاج وافراز Oxytocin بواسطة الية التغذية الراجعة الموجبة Positive feedback mechanism وهذا ما يثبت ان الموثين  $F_{2\alpha}$  يحث الولادة.

### ٣-٣-٢: التأثيرات الدوائية للموثينات Pharmacological effect of PGs

تنظم الموثينات عدد من التأثيرات الفسيولوجية المهمة (Mallace *et al.*, ٢٠٠٥)، اذ اوضح الباحث فيزا وجماعته (Veza *et al.*, ٢٠٠١) ان هذه الوسائط البيولوجية Biological Mediators تكون سريعة لزوال وتستجيب وتؤثر في الخلايا الواقعة بجوار اماكن انتاجها وهي نواقل مهمة في الالتهابات ونمو الخلايا والاتزان البدني (Du *et al.*, ٢٠٠٤). توجد الموثينات في الخلايا العصبية للدماغ (Moncada *et al.*, ١٩٨٠)، حيث من المحتمل ان تعمل هذه الموثينات كنواقل عصبية اذ لوحظ ان الخلايا النجمية Astrocytes وهي احد انواع الخلايا الدبقية تستجيب للموثين  $F_{2\alpha}$  والذي ربما يكون وسيط في انتشار الالم Pain transmission (Kunapuli *et al.*, ١٩٩٧). كما اوضح (محي الدين وجماعته، ١٩٩٠) ان السائل المنوي الشوكي للاشخاص الطبيعيين يحتوي (٥٠-١٠٠) بيكوغرام/مل من الموثين  $F_{2\alpha}$  في حين تزداد نسبة الموثين  $F_{2\alpha}$  في الاشخاص المصابين بامراض الدماغ كالصرع والنزف تحت العنكبوتي. ان للموثينات اثر مهم في الدورة الدموية فالبروستوسايكلين الذي يتم تصنيعه من قبل الخلايا البطانية للاوعية الدموية يثبط جميع الصفائح الدموية وبذلك فهو يمنع التخثر داخل الوعاء الدموي (Gerritsen *et al.*, ١٩٨٣)، ويخفض ضغط الدم (Tilley *et al.*, ١٩٩٩) ويوسع الشريان التاجي والشرايين الصغيرة لذا فقد لوحظ ان استعمال العقاقير المثبطة لتصنيع الموثين تؤدي الى نقصان التجهيز الوعائي للعضلات الهيكلية اثناء ممارسة الرياضة مسببة في فقر دم موضعي Ischemia ناتج عن فقدان دور الموثينات في التوسع الوعائي لذا فقد اوضحت الدراسات ان اغلب الموثينات المنتجة من قبل القلب هي البروستوسايكلين ( $PGI_2$ )، ومن جهة اخرى لوحظ ان الموثين  $PGE_2$  يثبط تحرر النولابنفرين Norepinephrene من الاعصاب السمبثاوية Sympathetic nerve والذي يكون مهم في السيطرة الموضعية للجريان الدموي في الاوعية الدموية (Gerritsen *et al.*, ١٩٨٣). اما الـ  $A_2$  الذي يصنع من قبل الصفائح الدموية فإنه يحفز كل من تقلص الاوعية الدموية وتجميع الصفائح الدموية عند حدوث الجرح (Pratico & FitzGerald, ١٩٩٥).

لوحظ في دراسات عديدة ان هناك تأثير واضح للموثينات في العديد من الغدد الصم، فعند حقن الجرذان بالموثينات من نوع  $E_1$  و  $E_2$  و  $PGF_{2\alpha}$  يؤدي الى افراز هرمونات (Insulin, LH, FSH, PRL, ACTH) مما يؤثر في معدل ايض الدهون والكاربوهيدرات (Moncada *et al.*, ١٩٨٠)، في حين اشار كيرينا وجماعته (Gerena *et al.*, ٢٠٠٠) ان الموثين  $D_2$  ينظم الجين المسؤول عن تصنيع الانزيمات المتضمنة في ايض الدهون. كما لوحظ ان الموثينات تنظم عدة عمليات فسيولوجية ومنها الموثين  $D_2$  حيث لوحظ انه المادة المحفزة للسبات Sleep-inducing substance والمنظم لدرجة حرارة الجسم (Gerena *et al.*, ١٩٩٨). فضلاً عن ذلك فقد اوضح الباحث كابنولي وجماعته (Kunapuli *et al.*, ١٩٩٧) ان الموثين  $F_{2\alpha}$  يحفز تصنيع الحامض النووي DNA ويحفز تضخم العضل

القلبية وزيادة على ذلك فقد اشار (Moncada *et al.*, ١٩٨٠) ان الموثين  $PGE_2$  يثبط اعادة امتصاص الماء  $Reabsorption$  of water بواسطة تحفيز الهرمون المضاد للابالة Antidiuretic hormone (ADH) واكتشفت من خلال دراسة وبائية في مرضى يعانون من التهاب المفاصل الروماتزي Rheumatoid arthritis ومن خلال فحص عينات السائل المفصلي Synorial fluid ان هناك زيادة في مستوى الموثينات وخصوصاً الموثين  $PGE_2$  حيث وجوده مرتبط مع بعض الاعراض المرافقة لالتهاب المفاصل ومنها الودمة Odema وتآكل الغضروف Erosion cartilage (Mccoy *et al.*, ٢٠٠٢).

كما وجد الباحث براون وجماعته (Brown *et al.*, ١٩٧٨) ان الموثين  $F_2\alpha$  يعتبر وسائط دوائية ثانوية في امراض الحساسية الصدرية (الربو) Allergic bronchial asthma ويستعمل الان بشكل واسع احد مشابهاث الموثين  $F_2\alpha$  في مجال المعالجة الطبية في علاج امراض العين (الكلوكوما Glaucoma) والميكانيكية المتضمنة في هذه المعالجة هو ان  $F_2\alpha$  يقلل ارتفاع ضغط الدم العيني (IOP) IntraOcular pressure المرافق لمرض الكلوكوما وذلك من خلال خفض المقاومة بين الحزم العضلية المهدبة Ciliary muscle bundles عبر التأثير على المادة خارج خلوية Extracellular matrix (Kunapuli *et al.*, ١٩٩٧).

#### ٤-١: هرمون الشحمون الخصوي (Testosterone (T

١-٤-١: نظرة عامة:

تقرز الخصى Testis في الذكور عدد من الهرمونات الجنسية الذكرية الستيرويدية Steroids والتي يطلق عليها مجتمعة بالاندروجينات Androgenes (Brown, ١٩٨٧). عرفت هذه المركبات المشتقة من الكوليسترول Cholesterol او من الخلات acetate بمسؤوليتها عن اظهار الخصائص الجنسية الذكرية Masculine sexual characteristic وتشمل (تمايز القناة الجنسية Genital tract- الصفات الجنسية الثانوية Secondary sexual character- الخصوبة fertility) (Yong *et al.*, ١٩٩٨).

يعد هرمون الشحمون الخصوي (T) اهم هذه الاندروجينات (شكل ٤-١) والذي يصنع ويفرز من الخلايا البيئية Interstitial cells الواقعة بين النبيتات ناقلة المنى Seminiferous tubules في الخصية وتعرف هذه الخلايا بخلايا لايدك Leydig cells (Marshall, ١٩٩٢). تقع هذه الخلايا تحت تأثير الهرمون اللوتيني Luteinizing hormone (LH) المفرز من قبل الغدة النخامية Pituitary gland (Clarke & Henry, ١٩٩٩). يتحرر الهرمون اللوتيني (LH) بواسطة تحفيز العوامل المحررة من غدة تحت المهاد Hypothalamus والذي تعرف بالهرمونات المحررة لمغذيات المناسل Gonadotrophins releasing hormones (Gn-RH) (Ress, ١٩٩٣)، والتي تشمل هرمونين هما: الهرمون المحرر للهرمون اللوتيني (LHRL) والهرمون المحرر لهرمون محفز الجريبات FSH-RH. تعمل هذه الهرمونات على التمام الغدي حيث يحفز الاول تكوين وافراز الهرمون اللوتيني LH بينما يحفز الثاني تكوين وافراز هرمون محفز الجريبات FSH (Anderson & Baird, ٢٠٠٢).

يكون معدل افراز (LH-RH) خلال الطفولة واطى جداً بسبب ان غدة تحت المهاد تكون حساسة جداً لكميات قليلة من الشحمون الخصوي الموجود في جهاز الدوران، لكن عند العمر ١٢ سنة تفقد غدة تحت المهاد هذه الحساسية وتبدأ بافراز كميات كبيرة من LH-RH والتي بدورها تحفز افراز هرمون الشحمون الخصوي لتبدأ عندها الحياة الجنسية عند الذكور وهذه المرحلة تسمى البلوغ Puberty (Hall & Adair, ١٩٨٨).

يتم السيطرة على افراز هرمون الشحمون الخصوي بواسطة ميكانيكية التغذية الراجعة السالبة negative Feedback mechanism ، فوجود تركيز عالي من هرمون الشحمون الخصوي في الدم يثبط افراز LH-RH من غدة تحت المهاد وبالتالي تثبيط افراز LH من الغدة النخامية والذي بدوره يثبط خلايا لايدك في تصنيع وافراز هرمون الشحمون الخصوي (Pak *et al.*, ٢٠٠٣; Okada *et al.*, ٢٠٠١; *al.* ومن جانب اخر فقد اشار الباحثان هولديكرافت وبراون (Holdcraft & Braun, ٢٠٠٤) ان مستقبلات الاندروجين (AR) Androgen receptor (AR) تلعب دور مهم في تنظيم مستوى الشحمون الخصوي خلال الية التغذية الراجعة الذاتية Autocrine feedback على خلايا لايدك عبر التأثير الصمي Endocrine على انتاج GnRH وبالتالي تثبيط تصنيع وافراز LH بواسطة الغدة النخامية. لقد اوضحا كلا من هال وأدير (Hall & Adair, ١٩٩٨) ان هرمون الشحمون الخصوي يمتلك تأثيرات موضعية في الخصية من خلال تحفيز عملية نشأة النطفة وتجهيز النطف بالطاقة الحركية او انه ينتقل الى الدم ليظهر الصفات الجنسية الذكرية، وعندها يكون هرمون الخصوي مرتبط مع بروتينات معينة في الدم وهي الكلوبولين Globulin والتي يشار اليها بالكلوبولينات المرتبطة بالهرمونات الجنسية Sex hormones binding globulin (SHBG) او قد يرتبط بالالبومين Albumin او بروتينات اخرى ولكن بألفة اقل (Marshall *et al.*, ١٩٩٢).

فضلاً عن هرمون الشحمون الخصوي هناك اندروجينات اخرى تفرز من الخصى وهي الاندروستيديون Androstenedione والديهيدروابنستيرون Dehydroepiandrosteron (DHEA)، فضلاً عن اندروجينات مفرزة من قبل قشرة الغدة الادرينالية Adrenal gland cortex والتي تعرف بالستيرويدات القشرية Corticosteroids (Marshall, ١٩٩٢; Anand *et al.*, ٢٠٠٢)، والاخيرة هي اندروجينات ضعيفة يظهر انها غير مهمة فسيولوجيا في الذكر ولكن في الاناث تساهم في تطور بعض الصفات الجنسية الثانوية وبالاخص نمو الشعر الثانوي Axillary hair (Marshall, ١٩٩٢).

## ١-٤-٢: التأثيرات الفسيولوجية لهرمون الشحمون الخصوي Physiological effects of Testosterone hormone

يعد هرمون الشحمون الخصوي Testosterone وثنائي الشحمون الخصوي Dihydrotestosterone (DHT) الناتج من العمل الايضي لهرمون الشحمون الخصوي اهم الاندروجينات الفعالة فسيولوجياً في الجسم (Keller *et al.*, ١٩٩٦). تؤدي الاندروجينات تأثيراتها الفسيولوجية بواسطة مستقبلاتها (Bennett *et al.*, ١٩٩٧) المعروفة بالمستقبلات النووية Nuclear receptors لوجودها في الغلاف النووي في مختلف انواع الخلايا (Keller *et al.*, ١٩٩٦).

يؤدي هرمون الشحمون الخصوي وظيفته الفسيولوجية باحد الطريقتين:-  
اما بالارتباط بمستقبلات الاندروجين (وهو الشائع) بعد تحوله الى ٥-alpha-dihydrotestosterone بفعل انزيم ٥-alpha-reductase او بالارتباط بمستقبلات الاستروجين Estrogen receptors بعد تحوله الى استيروديل (E<sub>2</sub>) Estradiol (E<sub>2</sub>) (Simpson, ٢٠٠١). بعد انتشار الهرمون الى داخل الخلية يرتبط مع المستقبلات النووية اذ تستجيب هذه المستقبلات لوحداث موجودة في الـ DNA ومن ثم ينشط او يثبط استنساخ Transcription الجين المقصود Target genes (Bennett *et al.*, ١٩٩٧).

التأثير الشائع للاندروجينات يكمن في زيادة تصنيع البروتينات والذي يؤدي الى زيادة وزن الجسم بسبب الفعل الابتنائي لهذه الهرمونات على العضلات الهيكلية (Ferrando *et al.*, ٢٠٠٢). ففي دراسة اجريت على ذكور الجرذان اشار الباحث بريزانت

وجماعته (Prezant *et al.*, ١٩٩٧) انه من الممكن استعمال الشحمون الخصوي لتحسين طول الحجاب الحاجز Diaphragm في المرضى الذين يعانون من ضعف في العضلات التنفسية Respiratory muscle. كما اشار الباحثون انفسهم ان اعطاء هرمون الشحمون الخصوي اناث الجرذان سبب زيادة في الوزن بسبب الفعل الابتنائي لهذه الهرمونات.

وقد التفت العديد من الباحثين الى اهمية هرمون الشحمون الخصوي الايضية وهو ثنائي الشحمون الخصوي (DHT) خلال التطور الجنيني للذكور ومنهم الباحث كيلر وجماعته (Keller *et al.*, ١٩٩٦) اذ وجد ان هرمون الشحمون الخصوي المفرز من خلايا لايدك يحفز قناة ولف Wolffian duct لتتمايز الى البربخ Epididymis والوعاء الناقل او الاسهر Vas deferens والحوصلات المنوية Seminal vesicles بينما DHT يحفز تمايز الجيب التناسلي البولي Urogenital sinus لتتمايز الى البروستات او التوتة Prostate والقضيب Penis وكيس الصفن Scrotum. فضلاً عن ذلك فقد ذكر الباحثان كاستيلون وهويدبرو (Castellon & Huidobro, ١٩٩٩) ان وظائف البربخ Epididymis والمتضمنة زيادة القابلية الاخصابية Fertilizing capacity للنطف وتجهيز الحماية للنطف الناضجة Spermatozoa ضد المؤثرات الضارة تكون واقعة تحت تأثير DHT الذي يعد الاندروجين الرئيس في الانسجة البربخية.

لقد سجل عن الاندروجينات دورها في اظهار الصفات الجنسية الثانوية ومنها نزول الخصية الى كيس الصفن Scrotum في الذكر البالغ، وزيادة سمك الجلد وزيادة عمق الصوت Voice والذي ينتج من زيادة نمو الحنجرة Larynx ونمو اللحية Beard على الوجه وصفة الصلع Bald عند الرجال ونمو الشعر الكثيف في عدة مناطق من الجسم (Hall & Adair, ١٩٩٨). كما ذكر الباحثان سوادل ورايرسون (Swaddle & Reirson, ٢٠٠٢) ان هرمون الشحمون الخصوي يزيد الشعور بالسيطرة والهيمنة Dominance عند الذكور. بينما اشار الباحث سمبسون (Simpson, ٢٠٠١) ان الشحمون الخصوي مرتبط مع العدائية Aggression في بعض الحيوانات. وقد ذكر (عشير والعلوجي، ١٩٨٩) ان الاندروجينات مسؤولة عن نمو القرون في الحيوانات ونمو العرف والغيب في الديكة وظهور حب الشباب في الانسان، في حين وجد الباحث كيميز وجماعته (Chemes *et al.*, ١٩٧٦) ان الشحمون الخصوي يحفز عملية نشأة النطفة Spermatogenesis في الانسان وان حقن الجرذان غير الناضجة بالشحمون الخصوي تتحفز عملية نشأة النطفة فيها.

لقد وجدت عدة دراسات ان مستوى الشحمون الخصوي يقل مع زيادة العمر (Woodhouse *et al.*, ٢٠٠٣) وما يرافق هذا النقصان من تغيرات فسلجية متمثلة بنقصان حجم وطول العضلات (Ferrando *et al.*, ٢٠٠٢)، والشعور بالتعب ونقصان الطاقة، ونقصان في كثافة العظم (Snyder, ٢٠٠١). وهذه التغيرات الفسيولوجية المرافقة لنقصان مستوى الشحمون الخصوي مع زيادة العمر اطلق عليها (Ferrando *et al.*, ٢٠٠٢).

وفي المجال البدائي فقد اشار الباحث جونيز وزملائه (Jones *et al.*, ٢٠٠٣) ان هرمون الشحمون الخصوي محفز للتوسع الوعائي Vasodilatation لذلك يمكن ان يستعمل في علاج الامراض القلبية الوعائية Cardiovascular disease، اذ وجد الباحث يو وجماعته (Yue *et al.*, ١٩٩٥) ان معاملة الارانب بهرمون الشحمون الخصوي ادى الى ارتخاء الشرايين التاجية Coronary Arteries والابهر Aorta.

لقد لوحظ من دراسات عدة ان زيادة الاندروجينات في النساء تسبب زيادة صفات الذكور Masculinization وظهور حب الشباب بكثافة ونمو الشعر في الوجه وزيادة عمق الصوت وزيادة نمو العضلات واضطراب في الدورة الحيضية، في حين زيادة مستوى الاندروجينات في

الذكور تسبب Priapism، وعجز جنسي Impotence ونقصان عملية نشأة النطفة Gynecomastia (Harvey & Champe, ١٩٩٧). واكتشف من خلال دراسة دوائية حول تأثير تعاطي جرعة عالية من الستيرويدات الابتنائية الاندروجينية (AAS) Androgenic anabolic steroids والمستعملة من قبل بعض الأشخاص من أجل زيادة حجم العضلات وبناء الاجسام Body builders ان الجرعة العالية من هذه المركبات سببت نقصان في العدد الكلي للنطف ( $20 \times 10^6$  sperm/ml) بالاضافة الى نقصان مستويات FSH وPRL (Torres-Calleja et al., ٢٠٠١).

## ٥-١: الهرمونات المغذية للقند (المناسل) Gonadotrophic Hormones (Gn-H)

### ١-٥-١: نظرة عامة

وتشمل هرمونين هما هرمون محفز الجريبات Follicular stimulation hormone (FSH) والهرمون اللوتيني (LH) Luteinizing hormone، يفرزان من الفص الامامي للغدة النخامية Anterior Pituitary gland استجابة للفعالية العصبية لغدة تحت المهاد Hypothalamus gland تحت تأثير محفزات نفسية Psychic stimuli (Blach et al., ٢٠٠٠; Ulloa-Aguirre et al., ٢٠٠١). تنطوي هذه الهرمونات تحت عائلة الهرمونات السكرية البروتينية Glycoprotein والتي تتميز بتركيبها البروتيني الكاربوهيدراتي (Schubert et al., ٢٠٠٣). والتي تشمل بالاضافة الى هذه الهرمونات (الهرمون المحفز للغدة الدرقية Thyrotrophin (TSH) وهرمون محرض المناسل الكوريوني البشري Chorionic gonadotrophin hormone (HCG) (Aguirre et al., ٢٠٠١). والآخر يفرز من المشيمة ويوجد في مصلى الام الحامل ويستعمل للاستدلال على وجود الحمل (D'-Antonio et al., ١٩٩٩). تصنع الهرمونات المحفزة للقند في خلايا معينة تقع في الجزء الامامي الغدي من الغدة النخامية تسمى Gonadotropes cells (Alloa-Aguirre & Timossi, ١٩٩٨). تركيبياً تتألف هذه الهرمونات من وحدات ببتيدية متعددة Polypeptide غير متشابهة ومرتبطة بصورة غير متكافئة وهذه الوحدات هي ألفا  $\alpha$ -subunit وبيتا  $\beta$ -subunit (Ulloa-Aguirre et al., ٢٠٠١). التابع البروتيني Protein sequence للوحدات الفا ( $\alpha$ ) مشابهة لكل هرمونات النخامية الكلايكوبروتينية، في حين الوحدات بيتا ( $\beta$ ) تختلف وتمنح الهرمون خصوصيته البايولوجية (D'Antonio et al., ١٩٩٩). فضلاً عن احتواء الوحدات ( $\beta$ ) سكريات ثنائية غير متماثلة Heterogenous Oligosaccharide والتي تلعب ادوار مهمة في الفعالية الحيوية للهرمون في الجسم الحي In-Vivo وخارجه In Vitro (Rose et al., ٢٠٠٠).

### ١-٥-٢: التأثيرات الفسيولوجية للهرمونات المغذية للقند Physiological effects of Gn-H

تنظم الهرمونات المغذية للقند (المناسل) عدد من الافعال الفسيولوجية المهمة وفي كلا الجنسين، وتؤدي هذه الهرمونات وظيفتها بواسطة الارتباط بمستقبلات معينة وهي نوع من المستقبلات المزدوجة البروتين G protein-coupled receptors (Plant & Marshall, ٢٠٠١). لقد لوحظ ومن خلال نتائج التحليل الحيوي Bioassay لمستقبلات الهرمونات الكلايكوبروتينية ان الهرمون اللوتيني LH وهرمون محرض المناسل الكوريوني البشري

HCG ترتبط لنفس المستقبلات والتي يشار لها LH-receptor. بينما هرمون FSH وTSH تترتبط بنفس المستقبلات وهي FSH-R وTSH-R على التوالي وهذا التشابه في الارتباط بالمستقبلات هو نتيجة التشابه في وحدات الهرمون بيتا  $\beta$ -subunit لذا فقد لوحظ ان المستقبلات لها الفة عالية وخصوصية للارتباط بالهرمون (Schubert *et al.*, ٢٠٠٣). مضافاً الى ذلك لوحظ ان هذه المستقبلات تشترك بخصائص تركيبية رئيسية (Aguirre & Timossi, ١٩٩٨).

ان الية تنشيط مستقبلات FSH وlh تبدأ بانتاج ايونات الكالسيوم  $Ca^{+2}$  والادينوسين احادي الفوسفات الحلقي cAMP داخل الخلية والذي يقود الى تنشيط الادينيل سايكليز (Plant & Marshall, ٢٠٠١; Haywood *et al.*, ٢٠٠٢).

### اولاً: هرمون محفز الجريبات FSH

في الاناث ، يؤثر هرمون محفز الجريبات FSH في نمو وتطور الجريبات المبيضية Ovarian follicles، وفي تطور واتمام نضج البيضة Oocyte maturation وتهيأة الجريبات المبيضية لتأثير الهرمون اللوتيني LH (Ulloa-Aguirre & Timossi, ١٩٩٨; D'Antonio *et al.*, ١٩٩٩) الذي يحتاجه الجريب للوصول الى الحجم الكامل وافراز الاستروجين، فضلاً عن زيادة النشاط الافرازي للخلايا الحبيبية Granulosa cells والمتمثل بافراز البروجسترون، حيث وجود مستقبلات FSH على هذه الخلايا (Ulloa-Aguirre & Timossi, ١٩٩٨).

اما في الذكور فيعد هرمون FSH هو المنظم الاساسي للخصوبة في اللبائن (Haywood *et al.*, ٢٠٠٢)، حيث يؤدي ادوار مهمة في عملية نشأة النطفة لا سيما في المراحل الاخيرة منها، وتطور وظائف الجهاز التكاثري (Robertson *et al.*, ١٩٩٩)، حيث ينبه نمو النبيبات ناقلة المنى Seminiferous tubules (Grover *et al.*, ٢٠٠٤).

ولعل اوضح دور لهرمون FSH هو تنظيم وظائف خلايا سرتولي Sertoli cells التي تعتبر من اهم الخلايا الموجودة في الخصى والمنظمة لعمليات فسيولوجية مهمة خلال الحياة الجنسية للذكر وتعد هذه الخلايا الهدف لهرمون FSH في الذكور حيث وجود مستقبلاته (Abdennebi *et al.*, ٢٠٠٣). اذ اوضحت دراسات عدة ان خلايا سرتولي هي اول انواع الخلايا التي تتمايز في المناسل خلال الحياة الجنينية (Fetal life) (Chang *et al.*, ٢٠٠٤)، اذ تقوم هذه الخلايا بافراز هرمون مضاد موليرين (Anti-Mullerian) (AMH) ويدعى احياناً Mullerian-inhibiting substance (MIS) هو احد عوامل النمو والتمايز المتضمن في السيطرة الهرمونية للتمايز الجنسي في حالة كون الجنين ذكر (Lukas-Croisier *et al.*, ٢٠٠٣). حيث يتحفز انتاج هذا الهرمون بواسطة هرمون محفز الجريبات FSH ويعمل الاخير من خلال الارتباط بمستقبلات خاصة على قنوات موليرين Mullerian ducts التي تنمو في حالة اذا كان الجنين انثى الى مبيض Ovary، لذا فان اهمية AMH متضمنة في كبح هذا النمو في حالة كون الجنين ذكر (Rose *et al.*, ٢٠٠٠; Lukas-Croisier *et al.*, ٢٠٠٣). عند البلوغ Puberty يعمل FSH على زيادة مستقبلات LH، اذ وجد الباحث ماجومدير وجماعته (Majumder *et al.*, ١٩٩٧) وفي دراسة اجريت على قرود الرسيس Rhesus monkey ان هناك زيادة في مستوى الاندروجينات الناتجة من خلايا لايدك ويعتقد ان هذه الزيادة في مستوى الاندروجينات تكون ضرورية لكبح (AMH) والذي يعتبر عند هذه المرحلة محور سلبي Negative Modulator لتمايز خلايا لايدك Leydig cells وافراز هرمون الشحمون الخصوي، لذا يلاحظ ارتفاع هرمون (AMH) في الاشخاص الذين يعانون من متلازمة قلة الحساسية للاندروجين Androgen Insensitivity Syndrome (Chang *et al.*, ٢٠٠٤).

كما وجد ان الخطوة الاولى والحرجة في تطور الخصية وبالتالي الذكورة Muscalization يكون من خلال تمايز خلايا لايدك وافراز هرمون الشحمون الخصوي والذي يكون في هذه المرحلة واقع تحت تأثير LH و FSH (Baker & Shaughnessy, ٢٠٠١).

لوحظ في دراسات عدة ان الهرمونات المغذية للقتد LH و FSH تنظم السلوك التكاثري في الحيوانات التي تتميز بتكاثرها الموسمي، ففي دراسة اجريت على ذكور الهامستر السابيري Male Siberian Hamsters والذي يتميز بالتكاثر الموسمي اوضح الباحث اناندي وزملائه (Anandy *et al.*, ٢٠٠٢) ان التحفيز الضوئي لهذه الحيوانات يؤدي الى زيادة في مستوى LH و FSH ومن ثم زيادة في مستوى الشحمون الخصوي، وهذا يشير الى اهمية الهرمونات المغذية للمناسل في تحفيز عملية نشأة النطفة Spermatogenesis والخصوبة (Liu *et al.*, ٢٠٠٢). ومن جهة ثانية ذكر الباحث ماجيمدر وجماعته (Majumder *et al.*, ١٩٩٧) ان هرمون FSH يعد المنظم لافراز الشحمون الخصوي في قرود الرئيس، فضلاً عن ذلك فان هرمون FSH ينظم افراز البروتينات المرتبطة بالاندروجين Androgen binding protein (ABP) والمفرزة من قبل خلايا سرتولي، وتعد ABP البروتين الناقل الرئيس الذي يعمل على نقل تركيز عالي من التسترون الى البربخ Epididymis لذا يعتبر ABP المنظم الرئيس في الوظائف البربخية وحركة النطف (Grover *et al.*, ٢٠٠٤).

### ثانياً: الهرمون اللوتيني LH

يمتلك الهرمون اللوتيني في اللبائن عدد من الافعال الحيوية المتميزة حيث يعتقد بأنه يحفز تصنيع الستيرويدات الجنسية (Abdennebi *et al.*, ٢٠٠٣). كما يسبب زيادة جريان الدم في المبيض وزيادة وزنه مؤدياً الى احداث الاباضة Ovulation لذا فإنه يسمى احياناً هرمون الاباضة (عشير والعلوجي، ١٩٨٩).

كما لوحظ ان الهرمون اللوتيني يؤدي دور اساسي في السيطرة على انتاج وافراز البروجسترون من خلال تنظيم الحامض النووي الرايبوزي الناقل mRNA الذي يشفر الانزيمات المتضمنة في افراز البروجسترون. كما لوحظ ان انقطاع هرمون LH بواسطة استئصال الغدة النخامية خلال الطور اللوتيني المبكر او المتوسط او المتأخر من الدورة الحيضية Menstrual cycle يؤدي الى تراجع سريع في افراز هرمون البروجسترون (Ravindranath *et al.*, ١٩٩٢). بينما ذكر الباحث تساي وزملائه (Tsai *et al.*, ٢٠٠١) ان الهرمون اللوتيني LH هو عامل مغذي لوتيني Luteotrophic agent في تطور وادامة الوظائف الكاملة للجسم الاصفر Corpus Luteum.

اما في الذكور فقد اوضح الباحث اناند وجماعته (Anand *et al.*, ٢٠٠٢) ان الهرمون اللوتيني LH ضروري لتطور الخصية وتصنيع وافراز الهرمونات الذكورية Androgenes من خلايا تحفيزه للخلايا الواقعة بين النبيبات ناقلة المنى المسماة بخلايا لايدك Leydig cells (Baker & Shaughnessy, ٢٠٠١)، لذا يسمى هذا الهرمون في الذكور هرمون محفز الخلايا البينية (Interstitial cell stimulating hormone (ICSH) Holdcraft & Braun, ٢٠٠٤) حيث يحفز خلايا لايدك لافراز هرمون الشحمون الخصوي الاساسي في اظهار صفات الذكورة وكذلك اتمام عملية نشأة النطفة وانضاج النطف Maturation of sperm (Hall & Adair, ١٩٩٨).

### ١-٥-٣: السيطرة على افراز الهرمونات المغذية للقتد (المناسل) Control of Gn-H secretion

يتم السيطرة على افراز الهرمونين FSH و LH كسائر مثيلاتها من العلاقة بين الغدة النخامية وباقي الهرمونات عن طريق الية التغذية الراجعة السالبة Negative feedback mechanism، لذا فقد وصفت العلاقة بين الغدة النخامية والمناسل (الخصى والمبايض) بأنها علاقة تبادل منفعة (Pak et al., ٢٠٠١; Harrison et al., ٢٠٠٤). ففي حالة السيطرة على الهرمون اللوتيني تكون كالاتي:-

تفرز غدة تحت المهاد Hypothalamus الهرمونات المحررة للهرمون اللوتيني Luteinizing hormone-Releasing hormone الذي يحفز الجزء الامامي الغدي للغدة النخامية لافراز الهرمون اللوتيني LH الذي يعمل على خلايا لايدك في الخصى في انتاج وافراز هرمون الشحمون الخصوي (T)، وبالمقابل فان هرمون الشحمون الخصوي يؤثر بصورة سلبية على غدة تحت المهاد مثبثاً اياها في انتاج الهرمونات المحررة للهرمون اللوتيني وبالتالي يحدد انتاج هرمون LH، ومن جهة اخرى وجود كميات قليلة من هرمون الشحمون الخصوي يؤدي الى فقدان الغدة تحت المهاد هذا التثبيط لتعود بانتاج الهرمون اللوتيني و ثم افراز هرمون الشحمون الخصوي (Charlton, ٢٠٠٤).

اما بالنسبة للسيطرة على الهرمون المحفز للجريبات FSH فتتم من خلال الية التغذية الراجعة السالبة ايضاً، ويتم بوساطة وجود بروتين الانهيبين Inhibin الذي يفرز من خلايا سرتولي اذ يعمل على كبح الهرمونات المحررة لهرمون محفز الجريبات المفرزة من تحت المهاد وبالتالي تثبيط انتاج FSH من الغدة النخامية، لذا فان الية التغذية الراجعة تحافظ على ادامة الطائف الطبيعية للخصى ومنها بقاء معدل ثابت لعملية نشأة النطفة (Guyton, ١٩٨٧; Hall & Adiar, ١٩٩٨).

لقد اكدت دراسات عدة وجود عوامل اخرى تفرز من الغدة النخامية تعمل على تنظيم افراز وتصنيع الهرمونات المغذية للمناسل (LH, FSH) ومنها الاكتفين Activin الذي يخفز تصنيع FSH وايضاً الفوليستاتين Follistatin كلاهما يصنعان في خلايا موجودة في الغدة النخامية تسمى Folliculostellate (Winters & Moore, ٢٠٠٤).

## ١-٦: التنظيم الهرموني لعملية نشأة النطفة Hormonal Regulation of Spermatogenesis

تقوم المناسل (الخصى) في اغلب ذكور الحيوانات بعمليتين اساسيتين هما انتاج النطفة Spermatozoa (الخصوبة Fertility) وافراز الهرمونات الجنسية الستيرويدية المسؤولة عن اظهار الصفات الجنسية الذكرية الثانوية (الرجولة Virility) (McLechlan et al., ٢٠٠٢). كلا العمليتين معتمدة على تحفيز الهرمونات المغذية للمناسل Gn-H وهي هرمون محفز الجريبات FSH والهرمون اللوتيني واللذان يفرزان استجابة لمحفزات عصبية في غدة تحت المهاد والمتمثلة الهرمونات المحررة لهرمونات مغذية المناسل Gn-RH (McLechlan et al., ١٩٩٦).

تعد عملية انتاج النطف من العمليات الحيوية المهمة في الذكور وهي سلسلة معقدة ومتعددة الخطوات تدعى بأكملها بعملية الانطاف او نشأة النطفة Spermatogenesis (Chang et al., ٢٠٠٤). خلال هذه العملية تعاني الخلايا الجرثومية Germ cell عدة مراحل متمثلة بالاتي:-

اولاً: انقسام خيطي Mitotic division ويتم خلاله تحول خلايا اسلاف النطف Spermatogonia الى خلايا نطفية Spermatoocytes. ثانياً: انقسام انقداي (اختزالي) Meiosis division وفيها يختزل العدد الاصلي من الصبغيات او الكروموسومات الى النصف وتتحول الخلايا النطفية Spermatoocytes الى طلائع النطف Spermatoid.

ثالثاً: تمايز شكلي Morphological differentiation وتتضمن هذه المرحلة تغيرات شكلية في طلائع النطف اذ تتحول من الشكل المدور الى شكل المتعادل وتعقبها عملية حوّل النطفة Spermogenesis والتي تعني تحرر النطف Spermatozoa (Zhang *et al.*, ٢٠٠٣). تنظم عملية نشأة النطفة عدة عوامل تشمل عوامل نمو Growth factors وهرمونات، معقدات ارتباط خلية-خلية cell-cell interaction والمتمثل بين الخلايا الجرثومية وخلايا سرتولي Sertoli cell، فشل اياً من هذه العوامل يؤدي الى خلل في العملية ومن ثم فقدان الخصوبة (Tohda *et al.*, ٢٠٠١).

تعتبر خلايا سرتولي وخلايا لايدك والخلايا العضلية المحيطة بالنييب Peritubular myoid cells اهم انواع الخلايا الموجودة في الخصية والتي تستجيب للتنظيم الهرموني في عملية انتاج النطف (Ventela, ٢٠٠٣). اذ تقع مستقبلات FSH على خلايا سرتولي حيث اكدت الدراسات الجينية Genetic والمورفولوجية Morphological في القوارض ان الدور الاولي لهرمون FSH في عملية نشأة النطفة هو تحفيز تطور خلايا سرتولي قبل البلوغ، اذ لوحظ ان عدد خلايا سرتولي يحدد اعداد الخلايا الجرثومية (Holdcraft & Braun, ٢٠٠٤). تكمن اهمية خلايا سرتولي خلال هذه العملية باحتضان طلائع النطف وتجهيز الدعم الفيزيائي والغذائي لعملية نشأة النطفة (Ventela, ٢٠٠٣). فضلاً عن ذلك فقد لوحظ ان خلايا سرتولي تعمل على تسهيل حركة النطف الناضجة من الخصية الى البربخ لتكتسب هناك القدرة الاخصابية وذلك من خلال تسهيل نقل الماء من الفراغات البينية الى التجويف، أي تعمل كأداة نقل Vehicle لتحريك النطف الى البربخ. كما لوحظ انتشار العديد من القنوات المائية aquaporins تنتشر في الخصى وتقع معظمها على خلايا سرتولي (Grover *et al.*, ٢٠٠٤).

اما مستقبلات LH فتقع على خلايا لايدك التي تستجيب في تصنيع وافراز هرمون الشحمون الخصوي (Anderson & Baird, ٢٠٠٢) الذي يعد المؤثر القيادي في عملية الانطاف والتطور الكامل للخصية (Mclachlan *et al.*, ١٩٩٦).

لقد اصبح بحكم المؤكد ان الشحمون الخصوي وهرمون FSH يحفز ان بدء عملية نشأة النطفة وربما تكمن اهمية الشحمون الخصوي في المراحل الاخيرة من عملية نشأة النطفة لذا عرفت هذه المرحلة بالخطوة المعتمدة على الشحمون الخصوي (Holdcraft & Braun, ٢٠٠٤). لقد سجلت العديد من الدراسات ان مستوى الشحمون الخصوي داخل الخصى يرتفع كثيراً خلال مرحلة البلوغ مقارنة مع مستواه في الدم اذ لوحظ ان مستواه داخل الخصية يبلغ (٤٠٠-٦٠٠ ng/g) مقارنة مع مستواه في الدم ويبلغ ٦ ng/ml وهذا ربما يفسر بأهميته في الوظائف الخصوية (Mclachlan *et al.*, ٢٠٠٢; Hill *et al.*, ٢٠٠٤).

وبالاستناد الى الدراسات التي اجريت خارج الجسم الحي In vitro حول دور FSH وهرمون الشحمون الخصوي في عملية نشأة النطفة، لوحظ ان FSH يؤثر على البروتينات التركيبية Structural protein الموجودة داخل الخلايا، واهمية هذه البروتينات انها تساعد في تحديد قابلية خلايا سرتولي للارتباط بطلائع النطف Spermatide وتحت تأثير هرمون الشحمون الخصوي. كما وجد ان FSH يزيد من اعداد مستقبلات الاندروجين AR (Holdcraft & Braun, ٢٠٠٤).

كما وجد ان تأثير هرمون الشحمون الخصوي على نشأة النطفة مرتبط مع زيادة المحتوى الخصوي من البروتينات المرتبطة بالاندروجين في الخصى والبربخ ودور هرمون FSH في هذه العملية يكون من خلال تسهيل انتقال وتمركز هرمون (T) ضمن خلايا سرتولي (Mclachlan *et al.*, ١٩٩٦; Coviello *et al.*, ٢٠٠٤).

لقد اوضحت العديد من الدراسات ان التهيج الجنسي يسبب زيادة مفاجئة في مستوى الهرمون اللوتيني والذي يسبب زيادة في مستوى الشحمون الخصوي. كما ان مثل هذه التأثيرات قد تحدث عند وجود الانثى او حدوث الاتصال الجنسي (Anand *et al.*, ٢٠٠٢).

ويمكن تلخيص التأثير الهرموني لعملية نشأة النطفة كالآتي:-

اولاً: تطور وتضاعف خلايا سليفات النطف Spermatogia والتي تكون تحت تأثير هرمون محفز الجريبات FSH. ثانياً: تطور الخلايا النطفية Spermatoocyte ودخولها في مرحلة الانقسام الاختزالي والتي تكون تحت تأثير هرمون الشحمون الخصوي.

ثالثاً: تغير مورفولوجي في طلائع النطف Spermatis وتحويلها من الشكل المدور الى الشكل المتطاوول وهو ما يعرف بحؤول النطفة Spermioogenesis ومن ثم تحرر النطف ويكون تحت تأثير هرمون الشحمون الخصوي (T). رابعاً: ادامة عملية نشأة النطفة بفترات زمنية ثابتة تحت تأثير هرمون T FSH (Mclachlan *et al.*, ٢٠٠٢; Baccetti *et al.*, ١٩٩٧, ١٩٩٧).

## Chapter Two الفصل الثاني Literature Review استعراض المراجع

### ٢-١: وصف بكتريا اشريشيا القولون

تعتبر هذه البكتريا احد الانواع السائدة في امعاء الانسان وتكون سالبة لصبغة كرام اختيارية لاهوائية، عصويات غير متحركة، تقع ضمن عائلة البكتريا المعوية Enterobacteriaceae، يمكن عزلها من النماذج السريرية على الاوساط الانتقائية Selective Media في درجة حرارة ٣٧ م تحت الظروف الهوائية وخاصة وسط ماكونكي الصلب MaCconky Agar ، ووسط الايوسين - مثيلين الازرق الصلب Eosin-methylene blue agar. سالبة فحص الاوكسيديز، اليوريز، تحلل الجيلاتين، استهلاك السترات، السكروز، انوستيرول، الفوكس بروسكور، انتاج غاز H<sub>2</sub>S. وموجبة لفحص الكاتاليز وانتاج حامض وغاز من الكلوكو، ارايينوز، لاكتوز، تخمر المانيتول، احمر المثيل وانتاج حلقة الاندول (MaccFaddin, ٢٠٠٠).

وتكون هذه البكتريا عادة غير ضارة للمضيف ولكن بعض سلالاتها المرضية المسببة لمرض الاسهال في الانسان تسمى اشريشيا القولون الاسهالية وشائعاً اشريشيا القولون المرضية. وتصنف هذه المجاميع على اساس عوامل الضراوة المنفردة ويمكن تشخيصها عن طريق هذه الصفات فقط. وهكذا تحليل اشريشيا القولون المرضية تحتاج لتشخيصها اولاً واثباتها قبل اختبارها لدرجة ضراوتها (Kaper & Natrom ١٩٩٨; Authors, ٢٠٠٢).

هذه المجاميع تصنف حسب ضراوتها وامراضيتها في حالات الاسهال الى:-

### ١- اشريشيا القولون السمية المعوية Enterotoxigenic E. coli (ETEC)

تعتبر هذه البكتريا المسبب الرئيسي لاصابة بأسهال المسافرين واسهال الاطفال الرضع Infants في الدول النامية. وهناك بعض العوامل الخاصة بتلك البكتريا تشجع التصاقها بالخلايا الطلائية للامعاء الدقيقة، وتوجد بعض من سلالات تلك البكتريا تنتج السموم المعوية والتي هي حساسة لدرجات الحرارة (LT) Labil Toxin، وتكون هذه السموم ذات وزن جزيئي ٨٠.٠٠٠ دالتون الذي يعمل تحت السيطرة الوراثية للبلازميد (Thompson et al., ١٩٨٤).

ان السم الحساس للحرارة (LT) يحفز انتاج الاجسام المضادة المعادلة في مصل (ومن المحتمل على سطح المعى للاشخاص المصابين سابقاً بالسم المعوي لتلك البكتريا وخاصة في الدول الفقيرة حيث يكونون حاملين تلك الاجسام المضادة المعادلة؛ Lin et al., ١٩٩٦; Weagant et al., ٢٠٠٠; Jaweteh et al., ٢٠٠٤).

### ٢- اشريشيا القولون الانتهازية المعوية EnteroInvasive E. coli (EIEC)

تسبب هذه البكتريا الاسهال الدموي الاخرافي للانسان، وتشبه سمومها الى حد كبير سموم بكتريا الشغليا Shigella sp. وليس لها مضيف حيواني وان المصدر الرئيسي لها هو الانسان المصاب (Sanders et al., ١٩٨٢).

ان الجرعة الالتهابية لبكتريا اشريشيا القولون الانتهازية EIEC هي ١٠<sup>٦</sup> وهي كافية لاحداث المرض في الانسان السوي عن طريق مهاجمة الخلايا الظهارية المخاطية المبطنة للمعي (Formal et al., ١٩٧١; Authors, ٢٠٠٠).

٣- اشريشيا القولون الانتهازية المعوية (EPEC) *Enteropathogenic E. coli*  
تعتبر تلك البكتيريا من اكثر واهم المسببات المرضية للاسهال في الاطفال الرضع،  
خصوصاً في الدول النامية، حيث تلتصق بالخلايا المخاطية المبطنه للامعاء الدقيقة ويحدث  
ضمور للزغبيات الدقيقة بصورة تدريجية (Dougan et al., ١٩٩٨).  
كما ان دخول تلك البكتيريا (EPEC) الى الخلايا المخاطية يسبب ضرر واضح يمكن  
رؤيته تحت المجهر الالكتروني الدقيق للزرع المأخوذ من الامعاء الدقيقة  
(Hayashi et al., ١٩٩٩).  
وان امراضية هذه البكتيريا تحدد عن طريق المستضد الجسمي Somatic Antigen  
والمستضد السوطي Flagellar Antigen (Kaper & Natro, ١٩٩٨; Hayashi et al., ١٩٩٩).

٤- اشريشيا القولون النزفية المعوية (EHEC) *Enterohemorrhagic E. coli*  
تعد هذه البكتيريا المسبب الاولي لالتهاب القولون النزفي حيث تقوم بأنتاج السم وهناك  
على الاقل نوعين من مستضدات ذلك السم الذي يمتلك خواص منفردة شبيهة بسم بكتريا الشكغلا  
ويسمى سم الشكغلا Shiga Toxin الذي تفرزه بكتريا *Shigella dysentevi* type ١  
(Griffin & Tauxe, ١٩٩١; Hill, ١٩٩٣; Feng & Monday, ٢٠٠٠).  
بكتريا اشريشيا القولون التي تنتج Verotoxin يكون الاكثر شيوعاً النوع المصلي  
O١٥٧:H٧ الذي يمكن تمييزه في النماذج الرئيسية (Karmali, ١٩٨٩; Sebeti et al., ١٩٩٧; Itoh et al., ١٩٩٨).

٥- بكتريا اشريشيا القولون المنتشرة الملتصقة (DAEC) *Diffusely adherent E. coli*  
ان لهذه البكتيريا القدرة على الالتصاق والانتشار بصورة واسعة على الخلايا الطلائية  
للأمعاء والاعشوية المخاطية للامعاء والقولون مسببة تحطم الانسجة الطلائية وحدث خلل في  
افراز السوائل والاملاح مسببة امراض الاسهال عند الانسان (Jinneman et al., ٢٠٠٠; Jawetez et al., ٢٠٠٤).

## ٢-٢: الذيفانات Toxins

ان توليد السم Toxigenesis او القدرة على انتاج السموم توضع تحت خطوط آليات  
العديد من البكتيريا الممرضة. وهناك نوعين من السموم البكتيرية صنفت على اساس الطبيعة  
الكيميائية الاول هو متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharides (LPS) الذي يكون  
مرتبط مع الجدار الخلوي للبكتيريا السالبة لصبغة كرام، اما الثاني فهي البروتينات التي تتحرر  
من خلايا البكتيريا وتعمل على مواقع الانسجة وتزال من مواقع نمو البكتيريا  
(Andra et al., ٢٠٠٠; Kenneth, ٢٠٠٢).

هناك صنفين من السموم المفترزة من قبل البكتيريا الممرضة:-

## ١- السموم الخارجية Exotoxins

تفرز هذه السموم عادة بوساطة البكتيريا الممرضة ولكن في بعض الحالات تتحرر نتيجة  
انحلال الخلايا البكتيرية لذلك فهي تزال من الموقع الاصلي لاختراق البكتيريا او النمو البكتيري

وان بعض السموم البكتيرية غالباً ما تعمل او تنشط في موقع الاصابة وتلعب دور مهم في عملية الاختراق (Kenneth, ٢٠٠٢).

وتكون السموم الخارجية على شكل بروتينات عالية الذوبانية تفرز بواسطة البكتريا الحية خلال مراحل النمو الاولى خاصة الطور اللوغاريتمي، اما انتاجها عادة فيكون متخصص بنوع البكتريا الممرضة والتي تكون مرتبطة مع السم مثلاً ذيفان الكزاز تفرزه بكتريا *Closteridium tetanus* ويسبب مرض الكزاز، اما ذيفان الدفتريا الذي تفرزه بكتريا *Corynebacterium diphtheria* يسبب مرض الدفتريا (Kenneth, ٢٠٠٢; Jawetez et al., ٢٠٠٤). وتكون السموم الخارجية غالباً محدد رئيسي للبكتريا الموجبة لصبغة جرام، لكن كلا البكتريا سالبة وموجبة. صبغة جرام تنتج سموم على شكل بروتينات ذائبة وهذه تعد عامل رئيسي لتسمم الانسان وهي ذات فعالية كبيرة جداً (Salyers & Whitt, ٢٠٠٢).

## ٢- السموم الداخلية Endotoxins

وهي مكونات او مركبات الخلية وتكون مرتبطة بالمكونات التركيبية للغشاء الخارجي لبكتريا سالبة صبغة جرام (Evans & DeEvans, ١٩٩٠). وغالباً ما تتحرر السموم الداخلية من النمو الخلوي البكتيري او من الخلايا النامية للبكتريا والتي تتحل نتيجة تأثيرات المضيف الدفاعية Host defence مثل الانزيم الحال Lysozyme او نتيجة فعالية الاضداد الرئيسية المتخصصة او الادوية مثل البنسلين (Weitz, ١٩٩٤; Elsingorst et al., ٢٠٠٢). وتنتج سلالات بكتريا اشريشيا القولون الممرضة العديد من السموم البكتيرية الداخلية Endotoxins او سموم معوية Enterotoxins والمعروفة بـ Verotoxins وتتضمن ما يلي:-

### ١- السموم الحساسة للحرارة Heat-Labil Toxins (LT)

وتكون هذه السموم قليلة القطع Oligomeric ومشابهة جداً في التركيب والوظيفة للسم المعوي المفرز من قبل بكتريا الكوليرا *Vibrio cholera* حيث يوجد بينهما تشابه في تتابع البروتينات بنسبة ٨٠% وكذلك في المستقبلات الاولى والفعالية الانزيمية والتحليل الزرع للانسجة الحيوانية (Dehaan et al., ١٩٩٨). يتكون هذا السم من نوعين من الوحدات الاولى تدعى وحدة B (Subunit B) اما الثانية فتدعى وحدة A (Subunit A) هذه تفعل او تنشط بواسطة انشطار الاواصر الببتيدية ويضفي عليه صفة ذاتية (Sixma et al., ١٩٩٣). هنالك نوعين من السموم الحساسة للحرارة LT:-

١- LT.١- تكون هذه السموم قليلة القطع Oligomeric والحجم الجزيئي KDa ٨٦،

وتتكون من وحدة A ذات وزن جزيئي KDa ٢٨، وخمس وحدات متماثلة من وحدة B وزنها الجزيئي KDa ٤.٥ (Teneberg et al., ١٩٩٤). وتمثل وحدة A الفعالية الانزيمية للسم، حيث تنشط اولاً لتوليد A<sub>1</sub> و A<sub>2</sub> الببتيدية المرتبطة بوساطة اواصر ثنائية الكبريت (Dickinson & Clements, ١٩٩٥).

ويوجد نوعين مقاومين جداً من السموم الحساسة للحرارة LT-١ تظهران تفاعل عرضي مستضدي جزئي، هذين النوعين الاول منهما يدعى LT-١ والثاني LTh-١ (Lancer et al., ١٩٩٥).

٢- Lt.١١: ان هذا النوع من السموم قد عزل من سلالات اشريشيا القولون التي تصيب الحيوان ويندر وجودها في السلالات التي تصيب الانسان (Guth et al., ١٩٩٧).  
 هذا السم مماثل للنوع الاول (LT.١) بنسبة ٥٥-٥٧% (Pickett et al., ١٩٨٩; Fukuta et al., ١٩٩٨). ويمتلك السم LT.١١ نوعين من المستضدات وهما LT.١١a و LT.١١b ويكونان متشابهين بنسبة ٦٦-٧١%. ويعمل LT.١١ على زيادة مستوى cAMP داخل الخلايا بوساطة آلية مشابهة مع سمية LT.١ لكن LT.١١ يستعمل GD<sub>١</sub> كمستقبل وليس Ganglioside (GM<sub>١</sub>) (Spangler, ١٩٩٢; Sears & Kaper, ١٩٩٦).

## ٢- السموم المقاومة للحرارة Heat-Stable Toxins

تعد هذه السموم اصغر من السموم الحساسة للحرارة حيث تكون احادية القطعة Monomeric، وتحتوي على الكثير من الحامض الاميني السيستين Cystein، وعدد كبير من روابط ثنائية الكبريت وهي ثابتة ومقاومة للحرارة، ويوجد نوعين من هذه السموم مختلفين في التركيب وآلية عمل الجين Gene لهذين النوعين من هذا السم موجودة بصورة دائمة على البلازميد (Savarino et al., ١٩٩٦; Yamamoto & Echeverna, ١٩٩٦).  
 STaI- ينتج هذا السم بوساطة اشريشيا القولون المرضية ETEC والعديد من بكتريا سالبة لصبغة جرام مثل *V. cholera* و *Yersinia enterocolocola* (Reis et al., ١٩٨٢). وان STa الناضج يتكون من سلسلة ببتيدية مؤلفة من ١٨-١٩ حامض اميني مع كتلة جزيئية (٢ KDa). وان النوعين من سموم STa و STb قد وجدا من سلالات البكتريا ETEC المعزولة من الخنزير والانسان على التوالي وهما متقاربتين ومتماثلتين في ١٣ حامض اميني وهي ضرورية وكافية لفعالية السموم المعوية ومن هذه الاحماض يكون ستة منها الحامض الاميني السيستين Cystein الذي يشكل ثلاثة جزيئات داخلية مرتبطة باواصر ثنائية الكبريت (Yamanaka et al., ١٩٩٤; Vaandvager et al., ١٩٩٤; Taniguchi et al., ١٩٩٤).  
 وينتج STa في البداية ٢٧ حامض اميني تنشط بوساطة انزيم Signal peptidase من ١-٥٣ حامض اميني ببتيدي. هنالك عمليات للانزيم Protease غير معروفة للسم الثابت الحرارة STa الاولي لنهاية ١٨ او ١٩ حامض اميني باقي ناضج الذي يتحرر بوساطة الانتشار عبر الغشاء الخارجي (Crane et al., ١٩٩٢; Sauvage et al., ١٩٩٢). وان المستقبلات الرئيسية للـ STa هي الانزيم الغشائي الرابط الذي يدعى Guanglate Cyclase C (GC-C) الذي يكون امتداد لعائلات مستقبلات السايكليس family of receptors cyclase التي تتضمن مستقبلات ببتيدية GC-A و GC-B (Mezoff et al., ١٩٩٢; Carpick & Guriepy, ١٩٩٢; Nzegun & Levin, ١٩٩٤, ١٩٩٦).

STbII- يرتبط هذا السم مع سلالات بكتريا اشريشيا القولون ETEC المعزولة من الخنزير (Arriaga et al., ١٩٩٥). يتكون السم STb في البداية من ٧١ حامض اميني مكونة للبروتين، ومن ٤٨ حامض اميني بروتيني ناضج ذات وزن جزيئي ٥.١ KDa. تتابع بروتينات STb او سلسلة بروتينات STb لا تكون مماثلة للسم STa، على الرغم من انها تمتلك اربعة احماض امينية من نوع السيستين التي تكونها او اواصر ثنائية الكبريت (Dreyfus et al., ١٩٩٢; Dreyfus et al., ١٩٩٣).

كلا STa و STb تحت او تعمل على ضرر الانسجة وتحطم الخلايا الظهارية المعوية. وتكون مستقبلات STb غير معروفة على الرغم من الاقتراحات الحديثة ان السموم ترتبط بروابط غير متخصصة حتماً للغشاء البلازمي للالتصام الخلوي (Chao & Dreyfus, ١٩٩٧). تنتج سلالات EHEC سموم مشابهة لسموم بكتريا الشغيلة وبكميات كبيرة وتدعى هذه السموم (Verotoxin (VT) او Verocytotoxin (Aldus et al., ٢٠٠٣; Duffy, ٢٠٠٣).

كما ان بعض سلالات O١٥٧:H٧ تنتج ايضاً سم خلوي مشابه لسم الشغيلة (Shiga-toxin like toxin) الذي يكون ذات تأثيرات مشابهة لكنه مختلف مستضدياً (Vold et al., ١٩٩٨; Tozzi et al., ٢٠٠١; Guo et al., ٢٠٠٤).

### ٣- متعدد السكريد الشحمي (LPS) LipopolySaccharides

تنتج البكتريا سالبة صبغة كرام سموم داخلية تدعى متعدد السكريد الشحمي الذي يشترك من الجدار الخلوي ويتحرر عند تحطيم البكتريا بعد موتها وهذه المكونات او مركباتها تكون مقاومة للحرارة Heat-Stable وتملك وزن جزيئي يتراوح بين ٣٠٠٠-٥٠٠٠ دالتون. قلة السكريد الشحمي LipoOligosaccharides يمكن استخلاصه بوساطة ماء-فينول (water-Phenol). التأثيرات الفسيولوجية المرضية لمتعدد السكريد الشحمي متشابهة ومتعلقة بأصل البكتريا (Sven et al., ١٩٩٩; Salyers & Whitt, ٢٠٠٢).

ويرتبط متعدد السكريد الشحمي في مجرى الدم اولاً مع بروتينات جهاز الدوران وبعد ذلك يتفاعل مع المستقبلات الموجودة على سطوح الخلايا البلعمية Macrophage وسطوح خلايا وحيدة النواة والخلايا الاخرى للجهاز الشبكي البطاني مما يؤدي الى تحرر السايوتوكينات Cytokines مثل الانترلوكين-١ (IL-١, TNF). وكذلك ينشط المسار البديل للمتمم والعديد من التفاعلات المرتبطة مع المتمم وتفعيل التخثر الدموي من خلال تحويل معقد الفايبرينوجين الى فايبرين وفي نفس الوقت ينشط البلازموجين الذي يتحول الى بلازمين، ومختبرياً يلاحظ انخفاض في عدد خلايا الدم البيض Leukopenia وانخفاض مستوى السكر (Rietschel et al., ١٩٩٦; Muller et al., ١٩٩٨; Andra et al., ٢٠٠٠).

وعند حقن LPS في الحيوانات المختبرية ينتج عنه حمى بعد مرور ٦٠-٩٠ دقيقة لان الجسم يحتاج هذا الوقت لانتاج IL-١، وكذلك ينتج عنه انخفاض سريع في عدد خلايا الدم البيض كما في التسمم البكتيري (Salyers & Whitt, ٢٠٠٠; Jawetez et al., bactermia, ٢٠٠٤).

يتكون متعدد السكريد الشحمي LPS للبكتريا المعوية من ثلاثة اجزاء وهي لبيد A (Lipid A)، منطقة اللب وسلسلة O- المتخصصة المكون للبيد A. هذا التركيب يكون المميز بين مختلف انواع البكتريا المرضية وهو المسؤول عن السمية (Pugin et al., ١٩٩٥; Andra et al., ٢٠٠٠).

ان تأثير متعدد السكريد الشحمي غير معتمد على حيوية البكتريا وهو المسؤول عن مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية وهو احد الصفات الموجودة للعلاج المناعي للصدمة الجرثومية (Armando et al., ٢٠٠٣).

ينتج حث الاضداد رئيسياً بوساطة تمنيع Lipid A للبكتريا، حيث في الزجاج والحي تم انتاج اعداد متعددة النسيلة متخصصة بالجزء لبيد A المنتج بكميات مناسبة من البكتريا المطفرة التي تعاني خللاً في التصنيع الاحيائي لمتعدد السكريد الشحمي (Galanos et al., ١٩٧١; Brands & Donglus, ١٩٧٢; Holst et al., ١٩٩٣).

غير معروفة. وتكمن تأثيراتها على مختلط خلايا المضيف (خلايا وحيدة النواة والخلايا البلعمية) يؤدي الى افراز اوكسيد النترريك ، الفعالية للبيدية الوعائية وافراز الساييتوكينات IL-1 و IL-6 و IL-12 وعامــــل تتخــــرر الاورام الفــــا (α) (TNF) (Galanos et al., 1972; Schromm et al., 1998; Jawetez et al., 2004).

### ٢-٣: التركيب المستضدي لبكتريا اشريشيا القولون

تملك هذه البكتريا تركيب مستضدي معقد، يحتوي على اكثر من ١٥٠ مستضد مختلف بعضها يكون مقاوم للحرارة (Heat-stable like (Lipopolysaccharides) يدعى المستضد الجسمي (O Ag) Somatic antigen والاخرى حساسة للحرارة Heat-labile like وهو المستضد المحفظي Capsular antigen او يدعى المستضد المقتول Killed Ag وهناك ايضا اكثر من ٥٠ نوع للمستضدات السوطية Flagellar Antigen او يدعى المستضد السطحي (H Ag) (Doyle & Dolores, 1990; Jawetez et al., 2004).

### ٢-٣-١: المستضد الجسمي Somatic Antigen

المستضد الجسمي هو مستضد مقاوم للحرارة وهو غالباً ما يكون امتداد للجزء الخارجي للجدار الخلوي لمتعدد السكريد الشحمي حيث تتكون من وحدات متكررة من متعدد السكريد (Doyle & Dolores, 1990).

ان عصيات اشريشيا القولون هي مجاميع مصلية حسب وجود او اختفاء المستضد الجسمي المتخصص والمقاوم للحرارة (O Ag). هذا المستضد يتكون من سلاسل متعدد السكريد مرتبطة مع لب متعدد السكريد الشحمي، وهو شائع بالبكتريا السالبة لصبغة جرام (Farmer, 2003).

وتتحدد خصوصية المستضد الجسمي بواسطة السكر او المكونات السكر الاميني وكذلك بواسطة تتابع متعدد السكريد الخارجية (Eisenstein, 2000).

ويحتوي بعض متعدد السكريد الشحمي للمستضد الجسمي (O Ag) على سكريات مفردة، المستضدات الجسمية تكون مقاومة للحرارة والكحول وعادة تتحدد بواسطة التلازن البكتيري، الاضداد الخاصة بالمستضدات الجسمية تكون غالبيتها الكلوبولين المناعي IgM (Giron et al., 1991).

وهناك اكثر من ١٧٠ مستضد جسمي متخصصة ومختلفة عرفت من قبل Kuffman عام (1943) في سلالات بكتريا اشريشيا القولون الملساء الطبيعية المتنوعة، حيث ان لب متعدد السكريد الشحمي دفن تحت المستضد الجسمي، اما السلالات الخشنة تكون ناقص طفرة O وغير منوع والذي يحوي متعدد السكريد الشحمي (LPS) (Dyto et al., 1993).

وتتشترك بكتريا اشريشيا القولون مع واحد او اكثر من المستضدات الجسمية لبكتريا الشغيلة *Shigella sp* ، وربما ترتبط المستضدات الجسمية مع امراض خاصة للانسان مثلاً مستضدات جسمية لاشريشيا القولون موجودة في امراض الاسهال والتهاب القناة البولية (Blanco et al., 1993).

وهناك تفاعل مشترك يؤخذ بنظر الاعتبار بين المستضدات الجسمية وكذلك العديد من مجاميع المستضدات الجسمية لبكتريا اشريشيا القولون والتي تكون تفاعل مشترك مماثل مع المستضد الجسمي المتخصص لهذه المجاميع او مجموعة مستضدات جسمية لبكتريا اخرى مثل بكتريا *Shigella* و *Samonella* و *Klebsiella* (Spangler, ١٩٩٢).

ويبين جدول (١) النوع المصلي لاحدى سلالات بكتريا اشريشيا القولون وهي المرضية EPEC وكانت اول مجموعة منها قد ميزت بأنها مسببة للاسهال في الاطفال الرضع اساساً بسبب وجود المستضد الجسمي (O Ag) الذي يمكن عزله من المجموعة المصلية لتلك البكتريا والذي يملك صفة عامل مستضد، يصطلح عليها بشعيرات مكونة للحزمة Bundle-forming pilus (BFP) وهي المسؤولة عن الالتصاق الاولي بين EPEC والخلايا الهدف (Cockerill *et al.*, ١٩٩٣; Jawetez *et al.*, ٢٠٠٤).

جدول (١) المجاميع المصلية لسلالات بكتريا اشريشيا القولون (Doyle & Dolores, ١٩٩٦).

Classic EPEC serogroups	Enteroinvasive <i>Shigella</i> -like serogroups	Enterohemorrhagic serogroups
O <sub>١٦</sub> , O <sub>٢٦</sub> , O <sub>٤٤</sub>	O <sub>٢٨ ac</sub> , O <sub>٢٩</sub> , O <sub>١٢٤</sub>	O <sub>٢٦</sub> :H <sub>١١</sub> , O <sub>٥٥</sub> a
O <sub>٣٥</sub> , O <sub>١١١</sub>	O <sub>١٣٥</sub> , O <sub>٤٣</sub> , O <sub>١٤٤</sub>	O <sub>١٥٧</sub> :H <sub>٧</sub>
O <sub>١١٢</sub> , O <sub>١١٤</sub> , O <sub>١١٩</sub>	O <sub>١٥٢</sub> , O <sub>١٦٤</sub>	O <sub>١١١</sub> a
O <sub>١٢٥</sub> , O <sub>١٢٦</sub> , O <sub>١٢٧</sub>		
O <sub>١٢٨</sub> , O <sub>١٤٢</sub>		

٢-٣-٢: المستضد المحفظي او المقتول Capsular or Killed Antigen  
المستضد المحفظي لبكتريا اشريشيا القولون هو مستضد حساس للحرارة ويكون على امتداد المستضد الجسمي لبعض انواع عائلة البكتريا المعوية Enterobacteriaceae. بعض متعدد السكريات تتضمن المستضد المحفظي Capsular Ag لبكتريا اشريشيا القولون والبعض الاخر بروتينات (Tesh & O'Brin, ١٩٩٢; Jawetez *et al.*, ٢٠٠٤).

ربما يتداخل المستضد المقتول او المحفظي مع التلازن الحاصل للمستضد الجسمي Somatic Ag وكذلك يكون مرتبط مع ضراوة البكتريا، مثلاً سلالات بكتريا اشريشيا القولون

تنتج مستضد K1 بارز في الولادات الحديثة والمصابين بالسحايا Meningitis (Doyle & Dolores, ١٩٩٠).  
وكذلك يكون هذا المستضد مسؤولاً عن التصاق البكتريا بالخلايا الظهارية للقناة الهضمية واختراق القناة البولية (Chapman et al., ١٩٩٣).

٢-٣-٣: المستضد السوطي (المستضد السطحي) Flagellar Antigen (H Ag)  
المستضد السطحي هو مستضد سوطي Flagellar Antigen ويوجد منه ما لا يقل عن ٥٦ نوع اشريشيا القولون لعزائل وسيلالات اشريشيا القولون غير متحركة وغير سوطية تسمى H-Negative (H (سالبة) (Doyle & Dolores, ١٩٩٠; Jawetetz et al., ٢٠٠٤).  
وان المستضد السطحي لاشريشيا القولون المسببة لمرض الاسهال وهم لسببين:-  
الاول:- السلالة تسبب وباء تستطيع افرازه وتميزه عن الفلورا الطبيعية بوساطة التمييز الفريد بمستضدات O:H.

الثاني:- اغلب سلالات ETEC ترجع الى نوع مصلي خاص (جدول ٢) هذه العلاقة سهلت تعريفها حتى الحالات المعزولة، السبب هو نتيجة العلاقة الحميمة بين النوع المصلي المتخصص وانتاج عوامل الضراوة المحددة من قبل البلازميد الخاص به.

ويقع المستضد السطحي على الاسواط ويمكن ان يمسح او يزال بوساطة الحرارة او الكحول هذا يساعد البكتريا على الحركة، تحديد المستضد السوطي ينتج عن تتابع الاحماض الامينية لبروتينات الاسواط (الفلاجين Flagein) (Salyers & Whitt, ٢٠٠٢).  
وربما يتداخل المستضد السوطي على سطح البكتريا مع التلازن الحاصل باضداد المعادلة للمستضدات الجسمية O Ag (Bopp et al., ٢٠٠٣).

وان البروتينات المرتبطة بالسطح مستضدياً ليس لها علاقة بالمستضد الجسمي او المستضد السطحي او السوطي ويمكن رؤية هذه المستضدات بالمجهر الالكتروني كتركييب خيطية شعيرات pili (Fimbria). تكون ضعيفة جداً لكن دائماً اصلب واوى من السوط (Ferando et al., ٢٠٠٢).

وتنتج سلالات هذه البكتريا دائماً ما يسمى Common pili الذي يعرف بترتيب خاص بالمستضدات، عندما تمتلك البكتريا Common pili ويخلط مع كريات الدم الحمر يحدث تلازن او تكتل وتخثر سريع، هذا التكتل يوقف وينعكس تركيز سكريات المانوز (Hyoikryu et al., ٢٠٠٢).

وتمتلك ETEC شعيرات متخصصة Specific pili، مستضدياً ليس لها علاقة و Common pili التي تعمل على ربط خلايا البكتريا بمستقبلات كاربوهدراتية معقدة خاصة على سطوح الخلايا الظهارية للامعاء الدقيقة، من هذا التفاعل ينتج عنه استعمار للامعاء بهذه البكتريا. وهذه الشعيرات pili يصطلح عليها اسم عامل استعمار المستضدات - Colonization factor (CFAs) (Levine et al., ١٩٩٤; Guillobel et al., ١٩٩٨).

اغلب سلالات ETEC المعزولة تنتج اما CFA/I و CFA/II او CFA/IV، بينما CFA/III واخرى غير محددة والبقايا على انواع مختلفة اخرى وانواع مصلية ليس شرط ان تكون سمية (Guillobel et al., ١٩٩٨; Ferando et al., ٢٠٠٢).

جدول (٢) المجاميع المصلية لانواع عامل استعمار المستضدات (CFAs)  
(Doyle & Dolores, ١٩٩٦).

CFA/I	CFA/II	CFA/IV	Others
O <sub>١٥</sub> :H <sub>١١</sub> , O <sub>١٥</sub> :H	O <sub>٦</sub> :H <sub>١٦</sub>	O <sub>٢٥</sub> :H <sub>٤٢</sub>	O <sub>٥٩</sub> :H <sub>٤</sub>
O <sub>٢٥</sub> :H <sub>٤٢</sub>	O <sub>٦</sub> :H	O <sub>٢٩</sub> :H <sub>٢١</sub>	O <sub>٩</sub>
O <sub>٦٣</sub> :H <sub>١٢</sub>	O <sub>٨</sub> :H <sub>٩</sub>	O <sub>١١٥</sub> :H <sub>٤</sub> .	
O <sub>٦٣</sub> :H	O <sub>٨</sub> :H	O <sub>١٤٦</sub> :H <sub>٤٨</sub>	
O <sub>٧٨</sub> :H <sub>١١</sub>	O <sub>٨٠</sub> :O <sub>٨٥</sub>		
O <sub>٧٨</sub> :H <sub>١٢</sub>	O <sub>٤٥</sub> :H <sub>٥١</sub>		
O <sub>٧٨</sub> :H	O <sub>١٣٩</sub>		
O <sub>١٢٨</sub> ac			
O <sub>١٦٧</sub> :H <sub>٢١</sub>			
O <sub>١٥٣</sub> :H <sub>١٢</sub>			
O <sub>١٥٣</sub> :H <sub>٤٥</sub>			

## ٤-٢: الاستجابة المناعية Immune response

يحتوي جسم الحيوانات كل المكونات الضرورية لدعم الحياة واستمرارها ونتيجة لذلك تكون الأنسجة الحيوانية ذات جاذبية لمدى واسع من الأحياء المجهرية والأجسام الغريبة التي تهاجم ذلك الجسم. إن هذه الأنسجة الحية تكون ذات مقاومة عالية ضد الغزو المايكروبي هذه المقاومة العالية تعود إلى جهاز كامل ومعقد ويقوم بأدوار مهمة في المحافظة على صحة الفرد والموازنة بين أعضائه المختلفة، ذلك الجهاز هو الجهاز المناعي Immune System ويتكون الجهاز المناعي من الجهاز المناعي الجهازى Systemic Immune System والجهاز المناعي الموضعي Local Immune System تنضبط نشاطات هذا الجهاز الدفاعية المتمثلة بالاستجابة المناعية بمختلف أشكالها بالمحتوى الوراثي للفرد (Roitt & Rabson, ٢٠٠٠).

تحدث الاستجابة المناعية عند تعرض الجهاز المناعي إلى المستضدات وتختلف هذه الاستجابة باختلاف طبيعة المستضدات الفيزيائية أو الكيميائية أو الأحيائية. حيث إن كل أنواع الاستجابة المناعية هي معقدة وتنظم بسلسلة من الأحداث المعقدة متضمنة عدداً من أنواع الخلايا الهدف عندما يدخل المستضد الجسم يجابه بنوع خاص من الخلايا تدعى بالخلايا المقدمة للمستضد (Antigen Presenting cells (APCs) وتقوم هذه الخلايا بسلب كمية صغيرة من المستضد وتظهره بالشكل الذي يستطيع أن يميز بواسطة الخلايا التائية المساعدة المتخصصة بالمستضد (Tizard, ١٩٩٧).

هنالك نوعان رئيسان من الاستجابة المناعية هما:-

## ٤-٢-١: الاستجابة المناعية الخلطية الجهازية Systemic Humoral Immune Response

هنالك مجموعتان رئيستان من الخلايا للمفاوية وهما الخلايا للمفاوية البائية (B cells) والخلايا للمفاوية التائية (T cells)، وهذان النوعان من الخلايا تمتلك مستلمات مختلفة للمستضدات، مستلمات الخلية B (BCR) للمستضدات هي جزيئات مرتبطة بالغشاء ونتيجة لذلك الخلايا B تستطيع أن تشخص بوساطة وجود جزيئات الضد التي تعرف بالكلوبيولينات المناعية وهي مجموعة من البروتينات الكروية السكرية glycoprotein الموجود في المصل وبعضها تحمل على سطوح الخلايا البائية وتعمل بوصفها مستقبلات للمستضدات المتخصصة أما ما تبقى منها فتكون حرة في مجرى الخلط الدموي أو في الخلط اللمفي. وإن التماس بين البائية الأولية pro B والمستضد ينتج عنه تطور الخلايا البائية إلى خلايا منتجة للأجسام المضادة (Antibody forming cells (AFCs)، التي يطلق عليها اسم الخلايا البلازمية التي تفرز كميات كبيرة من الأجسام المضادة، حيث تحتوي اللبائن على خمسة أصناف من الأجسام المضادة وهي IgG و IgA و IgM و IgD و IgE (Roitt & Rabson, ٢٠٠٠).

تعتمد مستويات الكلوبيولينات المناعية المصلية على تطور مختلف العوامل البيئية والوراثية التي تتضمن العرق والعمر والجنس وتاريخ التعرض إلى الممنعات أو الأرجينات Allergens أو تكرار الأخماج والعوامل الجغرافية. وإن العمر له تأثير في محتوى هذه الكلوبيولينات المناعية، فالأطفال الرضع الأسوياء يولدون مع مستويات وأطئة جداً من هذه الكلوبيولينات المناعية المصلية المنتجة، حيث إن الكلوبيولين المناعي IgG المصلي ينتقل من الأم إلى الطفل عن طريق المشيمة، وإذا حدث أي خمج في الرحم فسوف يرتفع مستوى

الكلوبيولين المناعي IgM اولاً ثم IgA و IgG ولكن بعد الولادة فأن المستوى المصلي الامي يتلاشى، وهناك زيادة في مرحلة المراهقة وهناك بعض الحالات غير الطبيعية لتركيز IgG المصلي وهذه الحالات لم يتضح بعد ارتباطها مع الحالات المرضية المتخصصة. وان تركيز IgG المصلي مهم في تشخيص تغير الكلوبيولين المناعي ومتابعته في المرضى الذين يعانون نقصاً في الكلوبيولينات المناعية (Stites et al., ٢٠٠١).

ان الذي يحدث في الاستجابة المناعية المتخصصة هو قيام خلايا البلاعم الكبيرة الملتزمة للمستضد بعملية هضم ذلك المستضد ومن ثم اظهاره على سطح الخلايا البلعمية الكبيرة ثم تقديمه الى الخلايا التائية المساعدة حيث بدورها تنشط الخلايا البائية للتضاعف وتكوين نساءل وتخليق الضد وانتاجه. هذا وان الخلايا المقدمة للمستضد يكون ان تقدم المستضد مقترناً بجزيئات معقد التوافق النسيجي مباشرة للخلية B او بمساعدة الخلية T، وقد تحفز الخلايا B بوجود الخلايا المقدمة للمستضد لاننتاج الضد المتخصص بذلك المستضد (Roitt et al., ٢٠٠٠).

ان الدور الذي يقوم به الخلايا البلعمية في بدأ تنظيم الاستجابة المناعية يمكن أجماله بما

يأتي:-

- ١- عملها على تركيز المستضدات.
  - ٢- تقديم المستضدات للخلايا للمفاوية.
  - ٣- افرازها عوامل مختلفة تؤثر بصورة مباشرة او غير مباشرة في الاستجابة المناعية.
  - ٤- افرازها السابتوكينات التي تقوم بوظائف حياتية كثيرة.
  - ٥- تنشيطها للخلايا للمفاوية B وتنبيه الخلايا للمفاوية T.
- وتكون الاستجابة المناعية اولية وثانوية ويكون صنف الضد المتكون اولاً هو IgM في الاستجابة الاولية ثم IgG في الاستجابة الثانوية، وتنبيه الاستجابة الثانوية بجرعة ثانية من المستضد تعطى للحيوان. حيث ينتج عن ذلك استجابة مناعية ثانوية تكون فيها كمية الاجسام المضادة اكثر وتبقى فترة زمنية اطول (Weir, ١٩٩٢).

اما في ما يخص الاستجابة المناعية الخلطية المخاطية حيث تعد السطوح المخاطية الاماكن الرئيسية من جسم الانسان او الحيوان التي تجابه بيئته الخارجية بما تحتويه هذه البيئة من المستضدات موجودة في الاغذية والاحياء المجهرية والسموم ومولدات الحساسية (Rusch, ١٩٨٢).

يتألف الجهاز المناعي المخاطي من الانسجة اللمفية المشاركة للاغشية المخاطية Mucous-associated lymphoid tissue (MALT) في الاقنية الهضمية Gut-associated lymphoid tissue (GALT) والتنفسية Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) والبولية التناسلية. وهناك اختلافات جوهرية بين الجهاز المناعي المخاطي والجهاز المناعي الجهازى متمثلة بالخصائص الاتية:-

- ١- سيادة الكلوبيولين المناعي IgA.
- ٢- وجود خلايا تائية ذات خصائص تنظيمية مؤثرة خاصة في الطبقة المخاطية.
- ٣- وجود نظام عبور خلوي موجه عبر المنطقة الحاوية على الخلايا الغشائية للخلايا المحفزة ابتداءً في الجريبات المخاطية لتهاجر الى الانسجة اللمفية المخاطية المنتشرة تحت الظهارة Subepithelium وهذه الخصائص الثلاث جعلت من الجهاز المناعي المخاطي كياناً مستقلاً بحد ذاته (Strober & James, ١٩٩٤).

وفي الاستجابة المناعية المخاطية يكون الكلوبولين المناعي الافرازي S. IgA ثنائي القطعة ومعامل ترسيبه (1s) على حين يكون الكلوبولين المناعي المصلي IgA احادي القطعة ومعامل ترسيبه (7 S) ويكون لقليل منه (S 10) (Kagnoff, 1994).

واوضح (Brandtzage & Frastd, 1999) ان الخلايا البلازمية تكون الكلوبولين المناعي المخاطي S. IgM و S. IgA ، في حين ان الخلايا الظهارية تكون المكون الافرازي Secretory component لكلا الضدين الافرازيين على حين تكون الخلايا البلازمية ومصدرها الخلايا البائية من نقي العظم المصدر الذي نشأت منه الاضداد المصلية. وجد (Fargeas et al., 1995) من خلال تجارب اجريت على الحيوانات المختبرية كخنزير غينيا حصول تعزيز الاستجابة المناعية المخاطية والجهازية بعد التهاب الامعاء عند تحفيزها عن طريق الفم، اذ وجد IgA يزداد مخاطياً و IgG يزداد جهازياً دليل على ان الاستجابة المخاطية ليس من الضروري اعتمادها على المناعة الجهازية. ويزداد التأهيل للخلايا التائية في الصفحة الاصلية للامعاء في حالة التمنيع المخاطي عبر الفم ولا يلاحظ هذا في حالة التمنيع الجهازى (Kantle et al., 1991). وبذلك يكون استخدام العامل المساعد Adjuvant ضرورياً في حالة التمنيع المخاطي (Stass & Ennis, 1999).

اشار كل من (Shnawa & Thwaini, 2000) الى ان حقن خصي ومعى الارانب بمستضدات المنحنيات الجنينية *cambylobacter fetus* ادى الى حدوث استجابة مناعية خلطية مخاطية في الخصي والمعى واستجابة مناعية خلطية جهازية.

#### ٢-٤-٢: الاستجابة المناعية الخلوية

وهي النوع الثاني من الاستجابة المناعية المتولدة نتيجة التعرض للمستضدي وتؤدي الى انتاج خلايا لمفاوية تحمل على سطوحها جزيئات شبيهة بالاضداد لها القدرة على التعرف النوعي للمستضدات. هذا النوع من المناعة يمنح الجسم حماية ضد بعض انواع البكتريا مثل مسبب التدرن *M. tuberculosis* وضد الفايروسات والطفيليات بصورة عامة. كما وتشمل هذه الاستجابة تفاعلات رفض الاعضاء المزروعة و اباداة الخلايا الورمية وبعض تفاعلات الحساسية (السعد والزبيدي، 1991). و اشار Hyde (2000) ان الاستجابة المناعية الخلوية تقوم بالتعرف المستضدي بأسلوب مشابه لما يحدث في التعرف المستضدي الذي تقوم به المناعة الخلطية ما عدا تفاعل ثلاث خلايا هي الخلايا المساعدة التائية ومولدات الخلايا السامة التائية وخلايا البلاعم الكبيرة. تعد الخلايا للمفاوية T مسؤولة عن الاستجابة المناعية الخلوية وتفرز العديد من الافرازات يطلق عليها السايبتوكينات تعمل على خلايا اخرى مثل وحيدات النواة الدموية والبلاعم الكبيرة في الانسجة والخلايا للمفاوية الاخرى والخلايا البدينة، من اهم افرازاتها الانترفيرون Interferon الذي ينبه خلايا البلعم الكبير ووحيدات النواة الدموية على زيادة قتل الطفيليات والفيروسات داخلها ومن افرازاتها ايضا الانترليوكين ٢ (Interleukin ٢) الذي يعمل على خلايا لمفاوية اخرى لتضخيم التجاوب المناعي. هذا وتمتلك الخلايا التائية مستلمات مستضدات الخلايا T (TCR) هذه المستلمات تتكون من جزيئات بروتينية متميزة على سطح الخلايا التائية هذه المستلمات تشترك مع تراكيب اخرى من البروتينات السطحية تستخدم لاعطاء الاشارات للخلية تدعى بروتينات CD وهي CD٣ و CD٤ و CD٨. يوجد CD٤ على الخلايا التائية المساعدة (Stites et al., 2001).

وتعد عملية رفض الاعضاء مثلاً جيداً على الاستجابة المناعية الخلوية فمثلاً اذا ازيلت قطعة من الجلد من احد الافراد وغرست في فرد اخر فأنها سوف تقاوم حوالي (١٠) ايام وان هذه القطعة سوف تظهر بداية بشكل صحي والاوعية الدموية سوف تتطور بين العضو المغروس

والمضيف، وبعد مرور ٧ ايام فأن هذه الاوعية الدموية الجديدة سوف تبدأ بالانحطاط، والتجهيز الدموي الى الغرس ينقطع والغرس سوف يموت ويكون مضملاً (Tizard, ١٩٩٧).

في حين ان الغرس الثاني المأخوذ من الفرد المانح الاصلي والمغروس في نفس الفرد المستلم سوف يقاوم لمدة يوم او يومين قبل بداية رفضه، وهكذا فأن رفض الغرس الاول يكون ضعيفاً وبطيئاً ومتشابهاً مع استجابة الضد الاولي. بينما الغرس الثاني يتحفز بشكل سريع ورفض قوي ومتشابه بطرق كثيرة لاستجابة الضد الثانوي. رفض الغرس يشبه تكون الاجسام المضادة يكون متخصص والاستجابة الثانوية تحدث فقط اذا كان الغرس الثاني من نفس الشخص المانح للغرس الاول. عمليات رفض الغرس كذلك تمتلك الذاكرة حيث ان عملية رفض الغرس الثاني قد تكون سريعة وقوية بعد اشهر او عدة سنين بعد فقدان الغرس الاول (Tizard, ١٩٩٧). من هذا نستنتج ان الاستجابة المناعية خلطية وخلوية وفرط حساسية ومناعة ذاتية او خمولاً مناعياً وربما تحمل مناعي (Roitt et al., ٢٠٠١).

٥-٢: تحفيز الاستجابة المناعية Stimulation of Immune response

يحدث التحفيز المناعي في كل من المناعة الخلطية و الخلوية عند استخدام بعض مركبات الجدار للبكتريا المكونة للحوامض الشمعية مثل بكتريا *M. tuberculosis* المكونة للحامض *Mycolic acid* وبكتريا الجذام *M. lepre* المكونة لحامض *Lepronic acid* عوامل تساعد على تحفيز الاستجابة المناعية الخلطية و الخلوية حيث تعمل خلايا T التي تضم CD٤ المرتبطة بجزئيات الصنف الثاني لمعقد التوافق النسيجي Major histocompatibility complex (MHC-١١) و CD٨ التي ترتبط بجزئيات الصنف الاول MHC-١ على السيطرة على المرض. هنالك خمجات بكتيرية تحت المناعة الخلطية فقط أي ان مستضداتها السائدة من نوع المستضد المعتمد على الخلايا البائية التي تتمثل بتكوين الاضداد التي تقوم بوظائف دفاعية مهمة فقد تعمل الاضداد اما وحدها او بارتباطها مع مكونات المناعة غير المتخصصة.

وبالمقابل هنالك خمجات تكون المناعة السائدة مناعة خلوية كبكتريا السالمونيلا المسببة لمرض التيفوئيد *Salmonella typhi*. لوحظ ان بعض المواد المحفزة القادرة على تقوية الاستجابة المناعية في احد الانظمة قد تكون مثبطة للنظام الاخر، لذلك يجب الاخذ بنظر الاعتبار التأثيرات الحيوية المختلفة للمواد المحفزة المؤثرة في الاستجابة المناعية (Pell & Aston, ١٩٩٥; Stites et al., ٢٠٠١).

بين الباحث Anderson (١٩٩٢) ان تحفيز الاستجابة المناعية يزيد المقاومة ضد الامراض الخمجية المختلفة، وذلك بتحفيز آليات الدفاع المناعية غير المتخصصة. اشارت العديد من الدراسات الحديثة التي اجريت على الانسان الى عدد من الاليات المحتملة لحدوث التحفيز المناعي منها:-

- ١- تنشيط الجهاز الشبكي البطاني Activation of reticuloendothelial system.
- ٢- تحفيز انتاج اللمفوكينات Stimulation of lymphokines production.
- ٣- تحفيز الخلايا القاتلة الطبيعية Stimulation of natural killer cells.
- ٤- زيادة حساسية خلايا السرطان للتحطم Increase sensitivity of tumor cells to destruction. (Bellanti, ١٩٨٥).

٦-٢: الاستجابة المناعية لبكتريا اشريشيا القولون  
٦-٢-١: الاستجابة المناعية الخلطية الجهازية

٢-٦-١-١: الكلوبولينات المناعية وعلاقتها مع مستضدات بكتريا اشريشيا القولون  
الكلوبولينات المناعية هي اعداد تنتج من قبل الخلايا اللمفية البائية المحفزة ويحتوي كل  
فرد على  $10^{11}$  خلية تقريباً وهي تستطيع ان تعيش لمدة ايام او اسابيع وتكون موجودة في نقي  
العظم الاحمر والعقد اللمفية Lymphnodes والانسجة اللمفية المشتركة مع السبيل الهضمي  
والبولي التناسلي (Jawetez et al., ٢٠٠٤; Benjamini et al., ٢٠٠٣).  
تنتشر بعض الكلوبولينات المناعية على سطوح بعض الخلايا البائية وتخدم كمستقبلات  
متخصصة للمستضدات (Keneth, ٢٠٠٢).

تمتلك خلايا B مستقبلات سطحية للموقع (FC) الذراع الرابط للكلوبولين المناعي  
والعديد من مكونات المتمم (Niarn & Helbert, ٢٠٠٢).  
كل جزيئة من الكلوبولينات المناعية تملك سلسلة ثقيلة Heavy chains لمتعدد  
البيبتيدات وسلسلة خفيفة Light chain لمتعدد البيبتيدات (Janeway et al., ٢٠٠١).  
وتمتلك السلاسل الخفيفة والسلاسل الثقيلة مناطق متغيرة Variable regions ومناطق  
ثابتة Constant regions ويعتمد تصنيف الكلوبولينات المناعية على اختلاف الاحماض  
الامينية في المناطق الثابتة حيث تصنف الى خمسة اصناف هي IgG و IgA و IgM و IgD و  
IgE (Paul, ٢٠٠٣; Jawetez et al., ٢٠٠٤).

\* الكلوبولين المناعي G-: IgG

يلعب الكلوبولين المناعي G دوراً مباشراً ضد مستضدات متعدد السكريد الشحمي  
وكذلك يعتبر ذات اهمية كبيرة في دفاع المضيف ضد بكتريا ذات المحافظ  
(Fransilla et al., ١٩٩٦; Kerr et al., ١٩٩٧; Jeann, ٢٠٠٠).

وهو الكلوبولين المناعي الوحيد الذي يستطيع المرور عبر المشيمة placenta وكذلك  
يبقى دائماً في المصل في الاستجابة المناعية الثانوية، ويزداد تركيزه خلال الالتهابات وله  
تأثيرات كبيرة في معادلة سموم البكتريا والفايروسات، وله اهمية كبيرة في عملية تثبيت المتمم  
(Bouvet & Fischetti, ١٩٩٩).

وان الالتصاق الاولي لبكتريا اشريشيا القولون الممرضة EPEC على سطوح الخلايا  
الظهارية ومن ثم تكوين حزمة من الشعيرات Fimbriae يؤدي الى تحفيز انتاج الضد IgG  
لمعادلة سموم تلك البكتريا (Richardson et al., ١٩٨٨). وكذلك يتحفز IgG ضد مكونات  
المستضد الجسمي (OAg) Somatic Antigen وكذلك ضد متعدد السكريد الشحمي لسلاسلات  
بكتريا اشريشيا القولون المرضية حيث تعمل على معادلة سمومها  
(Watarai et al., ١٩٩٨; Michinaga et al., ٢٠٠١).

وعند اختراق بكتريا اشريشيا القولون الممرضة EPEC للسطح المخاطي للخلايا  
الظهارية الداخلية فان الجهاز المناعي المخاطي يعمل على افراز الضد الافرازي IgG ضد  
الممرضات في المعى وكذلك تعمل تلك الممرضات على تحفيز الاستجابة المناعية الجهازية،  
وكذلك الحال عند الاصابة ببكتريا اشريشيا القولون VTEC. يلعب IgG دوراً كبيراً في تثبيط  
ارتباط تلك البكتريا مع الخلايا الظهارية المبطننة للمعى وبذلك يقلل الخمج  
(Winner et al., ١٩٩١; Weltzinc et al., ٢٠٠٠).

اما الكلوبولين المناعي IgA فيوجد بشكلين مصلي IgA احادي القطعة وافرازي  
S. IgA ويكون ثنائي القطعة (Kenneth, ٢٠٠٢; Manjarrez et al., ٢٠٠٠). ويلعب  
الضد الافرازي S. IgA المأخوذ من حليب ثدي الام المرضع دوراً كبيراً في حماية الاطفال  
الرضع ضد سلالات بكتريا اشريشيا القولون الممرضة EPEC، حيث يعمل على تثبيط ارتباط  
تلك البكتريا مع الخلايا الظهارية للمعى (Stone et al., ١٩٩٦; Dehaan et al., ١٩٩٨).

وان السموم المنتجة من قبل سلالات بكتريا اشريشيا القولون ETEC تكون مماثلة لسم بكتريا *Shigella sp* والذي يدعى shiga toxin (STXs) حيث تعمل على تحفيز انتاج الضد IgA الذي يعادل سم الشيكاء، وخلايا بكتريا ETEC في مختلف مواقع القناة الهضمية في الارانب الممنعة بهذه السموم (Camara et al., ١٩٩٤; Manjarrez et al., ٢٠٠٠).  
في حالات الاصابة بالتهاب القولون النزفي الذي تسببه سلالات بكتريا اشريشيا القولون STEC المنتجة لسموم shiga toxin. يعمل الكلوبولين المناعي A الافرازي SIgA كمضاد لها من خلال معادلة سموم هذه البكتريا والتقليل من الضرر الحاصل للخلايا الطلائية والاغشية المخاطية للأمعاء والقولون (Levin, ١٩٨٧).  
سلالات بكتريا اشريشيا القولون الممرضة EPEC تنتج مستضدات بروتينية سطحية تعادل بوجود الكلوبولين المناعي الافرازي SIgA. البروتينات والمجاميع المصلية O-Serogroups (Andrew et al., ٢٠٠١; Tana et al., ٢٠٠٢).

اما الكلوبولين المناعي M-IgM

فهو اول كلوبولين مناعي يصنع بواسطة الاطفال الرضع وكذلك اول كلوبولين مناعي يهر في مجرى الدم خلال مرحلة الاصابة وكذلك يكون الكلوبولين المناعي المفرز اولاً في الاستجابة المناعية الاولية.

يظهر IgM على سطح خلايا B الناضجة mature B-cells ، يتكون من خمس وحدات  $H_2L_2$  حيث يترتب بشكل خماسي الاذرع Pentamer لخمس جزيئات مناعية، وتكون جزيئة واحدة سلسلة رابطة J (Joining) خماسي الذراع. الوزن الجزيئي (DA) (٩٠٠.٠٠٠). يملك عشر مواقع رابطة للمستضد متماثلة ومكافئة. يشغل ١٠% من الكلوبولينات المناعية للمصل. له قدرة كافية جداً للتلازن الجزيئي للمستضدات (Hughey et al., ١٩٩٨; Keneth, ٢٠٠٢). الدور المهم للكلوبولين المناعي IgM قدرته الوظيفية الاولية في تحفيز الاستجابة المناعية ضد الممرضات الموجودة في الدم. ارتباطه بقوة مع المتمم، وكذلك اعداد IgM تربط بسطح المايكروبات وتعمل كخلايا التهامية. ويشترك في تفاعلات الضد- مستضد. وفي حالة وجود IgM والمتمم فإن خلايا المايكروبات غالباً ما تقتل وتتحل (Joshuafer & Fred, ١٩٩٧; Jawetez et al., ٢٠٠٤).

يتم تحفيز انتاج IgM من قبل الاطفال الرضع ضد الالتهابات الحاصلة في القناة الهضمية او نتيجة التصاق البكتريا المرضية على الخلايا الطلائية المخاطية للأمعاء خلال مرحلة الاصابة منها بكتريا اشريشيا القولون المرضية والبكتريا المرضية الاخرى (Krebber, ١٩٩٧).

في العديد من الحالات المرضية وجد ان الاضداد القاتلة للبكتريا Bactericidal antibody لامصال الاشخاص المصابين بالتشمع الكبدي كانت مقتصرة على IgM. فعالية امصال القاتلة للبكتريا Bactericidal sera لبكتريا اشريشيا القولون النوع المصلي *E. coli* O<sub>١١١</sub> تكون مقتصرة على وجود IgM ولو بنسبة واطئة مقارنة بالاشخاص الطبيعيين (Randall et al., ١٩٩٠).

-سلالات اشريشيا القولون النوع المصلي serogroups H<sub>v</sub>, O<sub>١٥٧</sub>, O<sub>v</sub>, O<sub>١١٦</sub> تعمل على تحفيز الكلوبولين المناعي IgM.

يتم تحفيز IgM كاضداد معادلة لمتعدد السكري الليبيدي لبكتريا اشريشيا القولون المرضية في البدايات الاولى للعمر وكذلك في حالة الاصابة بمتلازمة الفشل الكلوي والتحلل الدموي Hemolytic-Uremic syndromes (Pluschke et al., ١٩٨٩; Lutz, ١٩٩٨).

٢-١-٦-٢: علاقة المكونات الثالث والرابع للمتمم بمستضدات بكتريا اشريشيا القولون  
يعتبر نظام المتمم Complement system جزء من الجهاز المناعي العفوي وهو  
الخط الدفاعي الاول والثاني ضد البكتريا المرضية والممرضات الاخرى، ويتضمن هذا النظام  
البروتينات المرتبطة في الغشاء والمصل، والتي تعمل وظيفياً في الجهاز المناعي العفوي  
والتكيفي للمضيف هذه البروتينات عالية التنظيم وذات تفاعلات متسلسلة منظمة  
(Kenneth, ٢٠٠٢; Jawetez et al., ٢٠٠٤).

يشير مصطلح المتمم الى قدرة بروتينات المتمم بالتأثير على المكونات الاخرى للجهاز  
المناعي مثل الاضداد. تصنع بروتينات المتمم رئيسياً في الكبد والخلايا البلعمية  
(Janeway et al., ٢٠٠١).

هنالك ثلاثة مسارات لتنشيط المتمم، المسار التقليدي Classical pathway الذي ينشط  
بوساطة المعقدات المناعية المحتوية على الكلوبولين المناعي (IgM) والكلوبولين المناعي  
(IgG) (Demberg et al., ٢٠٠٢).

اما المسار الثاني فهو المسار المتبادل Alternative pathway ينشط مباشرة على  
سطوح الممرضات، وهنالك العديد من المواد الاحيائية مثل السموم الداخلية وعوامل الالتهاب  
الطفيليات (Parasite) ينشط مختلف المسارات، هذا يؤدي الى انتاج معقدات المهاجمة الغشائية  
Membrane attack complexes التي تولد قنوات channels في الغشاء الخلوي ومن ثم  
تحطم الخلايا الهدف (Kenneth, ٢٠٠٢; Demberg et al., ٢٠٠٢).

ويعتبر مسار اللكتين (MBL) Mannose-binding lectin هو المسار الثالث للمتمم  
وينشط بوساطة ارتباط البروتينات مع نهايات المانوز، حيث ان هذه النهايات ترتبط مع السلاسل  
الجانبية لاغشية البكتريا الموجبة سالبة لصبغة جرام، وان جزء من هذا المسار ينشط في حالة  
اختفاء الاضداد (Demberg et al., ٢٠٠٢; Jawetez et al., ٢٠٠٤).

عند تعرض الفرد الى الاصابة بأحد الطفيليات او الممرضات البكتيرية مثل سلالات  
بكتريا اشريشيا القولون المرضية Pathogen وبعد افراز سمومها يتم تحفيز الاستجابة المناعية  
وتنشيط نظام المتمم ومسارته الثلاثة بوساطة تنشيط المكون الثالث للمتمم C<sub>3</sub> والمكون الرابع  
للمتمم C<sub>4</sub> (Tang et al., ٢٠٠٤). ان المكونات الثالث والرابع للمتمم هما بروتينين يفرزان  
قريباً وقاعدياً مباشرة. الكلوكون الذي له علاقة كبيرة بتنظيم تعبيرات C<sub>3</sub> و C<sub>4</sub> ويحفز تحرير  
Lutein Dehydrogenase hormone (LDH)، وكذلك تأثيرات السم الخلوي المفرز من  
مستضدات بكتريا اشريشيا القولون يضعف عندما تستعمل مكافئ المانيتول بدلاً من الكلوكون،  
وكذلك العلاج مع محلول الديليزة لاكيت بفر Lactate buffered dialysis solution يعمل  
على رفع تنظيم تعبيرات C<sub>3</sub> و C<sub>4</sub> ويعمل على زيادة تحرير (LDH) و Human Peritoneal  
Mesothelial cells (HPMC<sub>2</sub>) (Erdi et al., ١٩٩١; Tang et al., ٢٠٠٤).

ويلعب المكون الرابع للمتمم C<sub>4</sub> دوراً كبيراً في تنشيط فعالية المسار التقليدي والمسار  
البديل لذلك من الممكن انتاج المتمم موضعياً ويلعب دور مهم في الدفاع الصفاقي Peritoneal  
defence. تنشيط المسار التقليدي مرتبط مع مستوى انشطار المكون الرابع للمتمم C<sub>4</sub>  
(Springaff et al., ٢٠٠١).

ويلعب المستقبل الثالث للمتمم CR<sub>3</sub>. Complement Receptor type ٣.  
(CR<sub>3</sub>, CD<sub>١١</sub>b/CD<sub>١٨</sub>) يخدم كمستقبل للعديد من النمو الداخلي الباطني الرابط والاعضاء  
المصابة دوراً في الالتصاق ووظائف دفاع المضيف وفي تنظيم انتاج الانترلوكين-١٢  
(IL-١٢) في الخلايا التي تتوسط المناعة (Hourcade et al., ١٩٨٩).

ويملك المكون الثالث للمتمم C<sub>3</sub> قابلية على الابسنة Opsonic، جذب كيميائي Chemostatix والحماية ضد السموم التي تفرزها الممرضات البكتيرية والممرضات الاخرى. والمسارات الثلاثة للمتمم تولد المكون الثالث للمتمم C<sub>3</sub> وينتج عنها ابسنة الممرضات Opsonization والسموم الفرزة منها، وكذلك تحفيز عملية البلعمة Phagocytosis والقتل المباشر للجراثيم (Hughes, ١٩٩٤; Jawetez et al., ٢٠٠٤).

ان مستوى المكون الثالث C<sub>3</sub> والمكون الرابع C<sub>4</sub> ينظم بوساطة العديد من المستقبليات والبروتينات المنظمة الذائبة التي تتضمن البروتينات السطحية للخلية، عامل الانحلال الخلوي وعوامل الغشاء البروتينية ومستقبلي المتمم الاول والثاني وهذه البروتينات مع انشاء عامل المتمم I تعمل على تنظيم تنشيط المتمم، وكذلك الحال للعوامل الذائبة I<sub>1</sub> و H<sub>1</sub> (Goldberger et al., ١٩٩٦; Mint et al., ١٩٩٢; Discipios, ١٩٨٧).

المكون الثالث والرابع موجودة في بلازما الدم، وكذلك بعضها يوجد في سوائل الجسم الاخرى مثبط انزيم البروتيز المحفز للسيرين يعمل بوساطة عملية مفردة لاحتلال فيزيائي للبروتين الهدف (Sottrup, ١٩٨٧; Samonte et al., ٢٠٠٢).

## ٢-٦-٢: الاستجابة المناعية الخلوية

### ١-٢-٦-٢: فرط الحساسية المتأخرة في اللافئ Delayed type hypersensitivity in mammals

فرط الحساسية المتأخرة (DTH) هو احد التفاعلات الجلدية البطيئة التي يتم من خلالها تقدير الاستجابة المناعية الخلوية لمعرفة الحساسية الجلدية لمستضد معين، او مجموعة من المستضدات وهو ذو فائدة كبيرة في تقدير الكفاءة المناعية وكذلك في المسوحات الوبائية (Stites et al., ١٩٩٤). وان المثال التقليدي لفرط الحساسية المتأخرة هو فحص التيوبركلين، حيث ان خنزير غينيا المحس بعصيات السل اللبونة الاصل *M. tuberculosis* عند حقنه بالتيوبركلين او المشتق البروتيني المنقى (PPD) في ادمة الجلد ينتج عن ذلك ظهور تفاعل جلدي (احمرار) في منطقة الحوض بعد مرور ٨-١٠ ساعات من حقن ذلك الارجين، وهذا التفاعل يتمثل بارتشاح خلوي للخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة (وعدد قليل من كريات الدم البيض المحببة) في موقع الالتهاب وذلك عن طريق توسع الاوعية الدموية الموضعية (Clark, ١٩٨٣). ويصل ذلك الارتشاح الى قمته بعد مرور ٢٤-٤٨ ساعة او ٧٢ ساعة من مدة الحقن. حيث تتميز منطقة التفاعل باحمرار Redness وتثخن Thickness وتخر Necrosis (Weir, ١٩٩٨; Roitt et al., ١٩٩٢). وبعد ذلك يبدأ التفاعل بالتلاشي تدريجياً (Rajka & Korossy, ١٩٧٦). ويعتقد ان آلية حدوث التفاعل تتضمن تداخل بعض الخلايا اللمفية المارة في الانسجة مع المستضد المحقون ونتيجة لذلك تثار بقية الخلايا اللمفية الاخرى والخلايا البلعمية لكي تهجر الى موقع وجود المستضد، حيث تقوم الخلايا التائية (Tdt) بإنتاج السايوتوكينات اللمفية التي تعمل على جذب الخلايا اللمفية الاخرى غير المحسنة الى موقع الالتهاب مما يؤدي الى تضخم الاستجابة المناعية، فتتكاثر الخلايا اللمفية (Tdt) تحت تأثير IL-٢ الذي تنتجه الخلايا التائية المساعدة Th١ (Hyde, ٢٠٠٠). وعندما تكون منطقة التفاعل مرتشحة بالخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة مع عدد من الخلايا البلازمية وبقية الخلايا الالتهابية الاخرى فيطلق على هذا لارتشاح اسم الارتشاح الالتهابي المزمن Chronic inflammatory infiltrate وهذا يدل على طول المدة التي يحتاجها التفاعل لكي يتطور ولتمييزه عن الارتشاح لالتهابي الحاد acute

inflammatory infiltrate الذي يتكون بشكل اساس من العدلات (Stites *et al.*, ١٩٩٤). ويمكن ان تنتج تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة جهازياً في خنزير غينيا المحسس عن طريق حقن التيوبوركلين عن طريق الوريد او عن طريق البريتون وقد يؤدي ذلك الى حدوث صدمة Shock بعد مرور ٥-٨ ساعات من حقن المستضد ولكن التفاعل يصل الى قمته بعد مرور ٢٤ ساعة، ويمكن ان يكون ممتياً علمياً ان اساس التفاعلات الجهازية تتم بوساطة تفاعل شوارتزمان (Clark, ١٩٨٣). وهناك جملة من العوامل المؤثرة على تفاعل فرط الحساسية المتأخرة عند التحفيز بمستضد التيوبوركلين وهي جرعة وبنوعيتها الارجين المستخدم، وسبيل الحقن، وصفات الفرد ودرجة تحسس المستلم والعوامل الموضعية والادوية والمواد الكيميائية ونقص الخلايا المسؤولة عن هذا التفاعل، ووجود الهرمونات المحفزة لقشرة الكظر (ACTH) (Rajka & Korossy, ١٩٧٦). وان تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة تحفز خصوصاً بوساطة *Salmonella* و *Brucellae* و *Streptococcus* ومدى واسع من الفايروسات مثل فايروس الحصبة الالمانية German Measles وفايروس النكاف Mumps (Weir, ١٩٩٢).

٢-٢-٦-٢: خلايا الدم البيض وعلاقتها مع مستضدات بكتريا اشريشيا القولون  
تشمل خلايا الدم البيض Leukocytes ثلاث مجاميع رئيسية هي الخلايا الحبيبية Granulocytes والتي يطلق عليها الخلايا البيض متعددة اشكال النوى Polymorphonuclear leukocyte لانقسام انويتها الى عدة اجزاء، والخلايا اللمفية Lymphocyte والخلايا وحيدة النواة Monocyte التي تختلف بخلاياها السلفية واشكالها ووظائفها (Dagg & Lee, ١٩٨٢).

وهي تعمل سوية لحماية الجسم من الالتهابات البكتيرية والفيروسية والطفيلية والاورام (Gannony, ١٩٨٩). يبلغ العدد الكلي لخلايا الدم البيض في الدم المحيطي ١١٠٠ خلية بيضاء في الملمتر المكعب الواحد في الدم في الانسان البالغ (Walter *et al.*, ١٩٨٦)، في حين يبلغ عددها في الارنب والجرذ والفأر .

١-٢-٢-٦-٢: الخلايا البيض الحبيبية Granulocytes  
تتشارك الخلايا الحبيبية الحمضة والقعدة والعدلة بالتفاعلات الالتهابية ووظيفتها الرئيسية هي البلعمة Phagocytosis وهضم الكائنات الدقيقة والمواد الغريبة الاخرى وعناصر النسيج التالفة وبقايا الخلايا (Dagg & Lee, ١٩٨٢).

وتعد العدلات Neutrophils خلايا بلعمية مهاجرة Migratory phagocytic cells وهي الخلايا الاكثر اهمية في دفاع الجسم ضد الاحياء المجهرية حيث تقوم بقتلها وهضمها (Firkin *et al.*, ١٩٨٩; Junqueira *et al.*, ١٩٩٢). وذلك لاحتواء حبيباتها السائتوبلازمية على انزيم المايلوبيروكسيداز Myeloperoxidase الذي يقوم بتحليل بعض المواد التي تعمل على قتل البكتريا، كما تحوي الحبيبات على انزيمات حالة Lytic enzymes تقوم بهضم البكتريا المقتولة (Gannony, ١٩٨٩).

اما الحمضات فيزداد عددها عند تفاعلات الحساسية والاصابة بالفايروسات والفطريات (Junqueira *et al.*, ١٩٩٢). ويبلغ عددها في الانسان ، في حين يبلغ عددها في الارنب والجرذ والفأر على التوالي ( ).

اما القعدات Basophils فلها وظيفة مناعية ايضاً، فعند التعرض الثاني الى مولد الحساسية Allergen وهو مستضد يسبب تفاعلات الحساسية يعمل على تحفيز تحلل واطلاق

الحبيبات القاعدية الموجودة في سايتوبلازم تلك الخلايا أي ان لها دوراً في المناعة ضد الممرضات (Lydyard & Gross, ١٩٩٨).

#### ٢-٢-٢-٦-٢: الخلايا اللمفية Lymphocytes

تبلغ نسبة الخلايا اللمفية بين ٢٠ و ٥٠% من العدد الكلي لخلايا الدم البيض في الانسان، وقد تبقى الخلايا اللمفية في مجرى الدم لبضعة ايام او تستمر لعدة سنوات، ان اغلب الخلايا اللمفية هي خلايا T (T cells) والتي تشكل ٨٠% من الخلايا اللمفية وتكون مسؤولة عن انتاج انزيم Lymphokine الذي يؤثر في الخلايا البلعمية الكبيرة Macrophage باتجاه مواقع الالتهاب. اما المتبقي من الخلايا اللمفية هي خلايا B(B-cells) وتشكل نسبة ١٥% من الخلايا اللمفية وهي المسؤولة بالدرجة الاساس عن انتاج الكلوبولينات المناعية Immunoglobulines (Junqueira et al., ١٩٩٢). ويبلغ عدد تلك الخلايا في الارنب والجرذ الفأر على التوالي.

#### ٢-٢-٢-٦-٣: الخلايا وحيدة النواة Monocytes

تكون اكبر خلايا الدم البيض حجماً وتقدر نسبتها ب ٢-٨% من العدد الكلي لخلايا الدم البيض في الانسان، تبقى في مجرى الدم مدة ١٢-١٠٠ يوم. تظهر الخلايا وحيدة النواة وظيفه مشابهة للخلايا البيض الحبيبية حيث انها تخترق جدران الشعيرات الدموية لتصل الى النسيج الضامة Connective tissues وتتحول الى خلايا بلعمية كبيرة تقوم بالتهام البكتريا والجسيمات الغريبة (Green, ١٩٨٥). اما في الارنب والجرذ والفأر فتبلغ نسبتها هنالك ارتباط وثيق بين مستضدات بكتريا اشريشيا القولون وعدد خلايا الدم البيض، حيث دلت الدراسات انه عند حقن بكتريا اشريشيا القولون او احد مستضداتها في الارانب لانتاج صدمة Shock، ينتج عن ذلك قلة في عدد خلايا الدم البيض Leukopenia نتيجة لتجرثم الدم Bacteremia وحدث التسمم الدموي Sepsis وكذلك انتاج السايتوكينات مثل الانترلوكين ١ (IL-١) وعامل تنخر الورم TNF $\alpha$  (Wakabayashi et al., ١٩٩١). كما دلت التجارب ان حقن متعدد السكريد الشحمي LPS ينتج عنه في بداية الامر قلة خلايا الدم البيض Leukopenia وذلك بسبب وجود البكتريا السالبة لصبغة كرام من ضمنها سلالات بكتريا اشريشيا القولون وان قلة الخلايا يحدث مع بداية ظهور الحمى Fever مما يؤدي الى تحرير الانترليوكين IL-١ (Jawetez et al., ٢٠٠٤; Salyer & Whitt, ٢٠٠٢). هنالك العديد من سلالات تلك البكتريا ومستضداتها تسبب تحطم الخلايا الظهارية المخاطية للمضيف ينتج عنها حدوث التهاب نزفي مزمن يؤدي الى فقدان الكثير من خلايا الدم، وكذلك ان بعض سلالات تلك البكتريا تسبب اسهال حاد يحوي على العديد من خلايا الدم البيض نتيجة افراز سموم هذه البكتريا كل ذلك يؤدي الى قلة خلايا الدم البيض (Guerrant & Bobak, ١٩٩١).

#### ٢-٧: التركيب النسيجي للطحال في اللبائن

يحاط الطحال في اللبائن بمحفظة رقيقة من نسيج ضام كثيف غير منتظم والياف عضلية ملساء (Stites et al., ١٩٩٤). وتمتد من هذه المحفظة حواجز الى متن ذلك العضو، وهذه الحواجز مع الهيكل الشبكي تستند عليه الخلايا المختلفة الموجودة في ذلك العضو، ويوجد نوعان رئيسيان من الانسجة الطحالية وهما اللب الاحمر Red Pulp واللب الابيض White Pulp، فاللب الابيض يتألف من نسيج لمفي يحيط الشريين المركزي ويكونان معاً الاعمدة اللمفية

المحيطة بالشرينات Periarteriolar lymphatic sheaths التي تتألف من مناطق الخلايا اللمفية، حيث توجد الخلايا التائية حول الشرين المركزي، في حين ان الخلايا البائية تنتظم اما في العقيدات اللمفية الاولية (وهي تجمعات من الخلايا البائية غير الناضجة) او في العقيدات اللمفية الثانوية التي تحتوي على المراكز الانتاشية Germinal centers مع خلايا الذاكرة، وتحتوي المراكز الانتاشية ايضاً على الخلايا الشجرية الجريبية والبلاعم الكبيرة حيث ان البلاعم الكبيرة والخلايا البائية تستجيب الى المستضدات غير المعتمدة على التوتة في المنطقة الحافية Marginal zone (التي تحيط العقيدات اللمفية الثانوية)، وتقوم الخلايا الشجرية بتهيئة المستضدات الى الخلايا البائية في الطحال (Roitt *et al.*, ١٩٩٨). اما اللب الاحمر فيحتوي على الجيوب الوريدية والحبال الخلوية المحتوية على البلاعم الكبيرة، وكريات الدم الحمراء والصفائح الدموية وكريات الدم البيض المحببة بالاضافة الى العديد من الخلايا البلازمية، حيث يعد الطحال اضافة الى وظيفته المناعية مخزناً لكريات الدم الحمر والصفائح الدموية وكريات الدم البيض المحببة، وكذلك يعمل على تطيم كريات الدم الحمر والصفائح الدموية (Roitt *et al.*, ١٩٩٨). وتشارك ايضاً منطقة اللب الاحمر في الطحال في توليد الخلايا الدموية النخاعية (Balaz's *et al.*, ١٩٩٩). كما ان تطور الخلايا البائية يصاحب بوساطة قابليتها للدخول المتخصص الى الانسجة اللمفية المحيطة

(Balogh *et al.*, ١٩٩٨)، فبعد التمايز الاولي للخلايا البائية وانتخابها في نقي العظم الاحمر فأنها سوف تهاجر الى الجهاز اللمفي المحيطي، حيث ان الطحال لا يعد مصدراً اضافياً للخلايا اللمفية فقط وانما يسهم في المراحل النهائية لتمايز الخلايا البائية التي تبتدى من نقي العظم الاحمر (Balogh & Kumanovics, ١٩٩٥).

### Chapter Three الفصل الثالث

٣- المواد وطرائق العمل Materials & Methods

١-٣: الحيوانات المختبرية Laboratory Animals

تم استعمال (٢٠) من الارانب المحلية البالغة *Oryctolagus cuniculus* حسب تصنيف متحف التاريخ الطبيعي معززة بأراء (Donoghue & Hime, ١٩٧٩) وبمعدل خمسة مكررات لكل معاملة بسبب وجود تغاير في الاستجابة المناعية بين الحيوانات المختلفة (Beck *et al.*, ١٩٩٣) وكانت الارانب ذات اوزان بين (كيلو ونصف-كيلوين) وبعمر تراوح بين (٦-٨) اشهر وجرت اقلمتها بجو التجربة لمدة اسبوعين تحت الظروف القياسية للاكل والشرب والتأهيل (Schneider *et al.*, ١٩٩٠).

٢-٣: المواد والمحاليل المستخدمة

١-٢-٣: المحلول الملحي الطبيعي Normal Saline solution

يحضر هذا المحلول بتركيز (٠.٨٥%) وذلك بأذابة ٠.٨٥ غم من مادة كلوريد الصوديوم NaCl شركة BDH (الوزن الجزيئي ٥٨.٤٤) في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل، وتم تعقيم المحلول في جهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م° وضغط ١٥ بار ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا المحلول في تحضير المحلول الملحي الفورمالين Formal saline ومعايرة الاضداد المصلية مع المستضدات للعينات المأخوذة من الحيوان المختبري (Gravey *et al.*, ١٩٧٧) وايضاً استخدم في تحضير بعض محاليل التجربة.

٢-٢-٣: محلول الملح الفورمالين Formal saline

جرى تحضير هذا المحلول بعد حساب النسب الحقيقية للفورمالديهايد (H-CHO) شركة BDH (الوزن الجزيئي ٣٠.٣) في محلوله واطافة حجم منه الى ماء الملح الوظيفي لكي يتم تحضير تراكيز كما في أدناه:- (kwapinski, ١٩٨٢)

١-٢-٢-٣: محلول الملح الفورماليني المعقم (٠.٥%)

جرى تحضير هذا المحلول بأضافة ٠.٥ مل من محلول الفورمالديهايد (٣٧%) الى ٩٩.٥ مل من المحلول الملحي الطبيعي المعقم ليصبح التركيز النهائي ٠.٥%. استخدم هذا المحلول كمذيب للكوليبولينات المناعية (kwapinski, ١٩٨٢).

٢-٢-٣-ب: محلول الملح الفورماليني المعقم (٠.٣%)

جرى تحضير هذا المحلول بأضافة ٠.٣ مل من محلول الفورمالديهايد (٣٧%) الى ٩٩.٧ مل من المحلول الملحي الطبيعي المعقم ليصبح التركيز النهائي ٠.٣%. استخدم هذا المحلول في تحضير المستضد الجسمي (O-Antigen) لبكتريا *E. coli* (المصدر موجود)

٢-٢-٣-ج: المحلول الملحي الفورماليني المعقم (٠.٦%)

جرى تحضير هذا المحلول بأضافة ٠.٦ مل من محلول الفورمالديهايد (٣٧%) الى ٩٩.٤ مل من المحلول الملحي الطبيعي المعقم ليصبح التركيز النهائي ٠.٦%. استخدم هذا المحلول في تحضير المستضد السوطي (H-Ag) Flagellar Antigen لبكتريا *E. coli* (المصدر موجود)

### ٣-٢-٣: محلول ازيد الصوديوم Sodium azide

جرى تحضير هذا المحلول بأذابة ١ غم من مادة ازيد الصوديوم ( $\text{NaN}_3$ ) شركة BDH (الوزن الجزيئي ٦٥.٠١) في ١٠٠ مل من الماء المقطر بحيث اصبح التركيز ١% استعمل هذا المحلول في حفظ عينات المصل Serum لمدة طويلة (Frei et al., ١٩٩٥).

### ٤-٢-٣: محلول كبريتات الامونيوم المشبع Ammonium sulfate Solution

تم تحضيره بأضافة بلورات كبريتات الامونيوم ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) شركة BDH -الوزن (١٣٢.١٣) بشكل تدريجي الى قارورة زجاجية حاوية على ٥٠ مل من الماء المقطر الذي سبق تسخينه الى ٦٠° م مع الهز المستمر الى الحد الذي تصبح فيه البلورات المضافة لا تذوب، بعد ذلك ترك المحلول لفترة من الزمن حتى تصل درجة حرارته الى درجة حرارة الغرفة، وسوف تظهر طبقة من كبريتات الامونيوم غير ذائبة في اسفل القارورة الزجاجية، فأن الراشح هو كبريتات الامونيوم المشبع، استخدم هذا المحلول لترسيب الاضداد وفصل الكلوبيوالينات المناعية (Johnston & Thorpe, ١٩٨٢).

### ٥-٢-٣: محلول بايوريت Biuret solution

جرى تحضير هذا المحلول بإذابة ٠.٣ غم من كبريتات النحاس المائية ( $\text{CuSO}_4 \cdot ٥\text{H}_2\text{O}$ ) شركة BDH -الوزن الجزيئي (٢٤٩.٥) في ٥٠ مل من الماء المقطر وذلك في قارورة حجم ٥٠٠ مل ٩ غم. وفي قارورة اخرى ذوب ١.٢ غم من مادة تترترات الصوديوم-البوتاسيوم ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_7 \cdot ٤\text{H}_2\text{O}$ ) شركة BDH (الوزن الجزيئي ١٦٦) في ٥٠ مل من الماء المقطر. وفي قارورة اخرى ذوب ٦ غم من هيدروكسيد الصوديوم شركة BDH في ٦٠ مل من الماء المقطر.

بعد ذلك اضيف ببطئ محلول تترترات الصوديوم البوتاسيوم الى محلول كبريتات النحاس المائية ثم اضيف بعد ذلك محلول هيدروكسيد الصوديوم مع الهز المستمر خلال هذه العملية، بعد ذلك خفف هذا المحلول الى ٢٠٠ مل باستعمال الماء المقطر أي اضيف ٤٠ مل من الماء المقطر. ثم رشح المحلول البايوريت للتخلص من الشوائب.

### ٦-٢-٣: محلول حامض التانيك Tannic acid solution

حضر هذا المحلول بأذابة ٠.٥ غم من مسحوق حامض التانيك  $\text{C}_76\text{H}_52\text{O}_{46}$  -شركة BDH (الوزن الجزيئي ١٧٠١.٢٢) - في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل ليصبح التركيز ٠.٥%. ثم استعمل هذا المحلول لإزالة المستضدات الموجودة على سطوح كريات الدم الحمر للخراف (Garvey et al., ١٩٧٧).

### ٧-٢-٣: محلول البوريت الملحي Borate-saline solution

حضر هذا المحلول من اذابة ٠.٦ غم من حامض البوريك boric acid -شركة BDH - وتترا بوريث الصوديوم Sodium tetraborate -شركة TAAB - وكلوريد الصوديوم ٠.٤٣ غم شركة BDH (الوزن الجزيئي ٥٨.٤٤) في ١٠٠ مل من الماء المقطر استخدم هذا المحلول لعزل وتنقية الكلوبيوالين المناعي-كاما (المصدر موجود).

٢-٣-٨: محلول ثوما Thoma's solution  
حضر باضافة ١ مل من حامض الخليك الثلجي الى ١٠٠ مل من الماء المقطر، ثم اضيف الى المزيج ١٠ ملغم من صبغة Gentain. استخدم هذا المحلول لعد خلايا الدم البيض Total leucocyte count في الارانب (١٩٨٤، Diace & Lewis).

٢-٣-٩: محلول ماكفرلاند Macfrland solution  
يتكون هذا المحلول من جزئين:-  
١- محلول A ١% BaCl<sub>2</sub>: يحضر باضافة ٠.١ غم من BaCl<sub>2</sub> الى ١٠ مل من الماء المقطر مع الهز حتى الذوبان.  
٢- محلول B ١% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: يحضر بمزج ١ مل من حامض الكبريتيك المركز مع ٩٩ مل من الماء المقطر مع الهز.  
بعد ذلك يمزج ٦ مل من محلول A مع ٩٤ مل من محلول B. استخدم هذا المحلول كمعايرة لتركيز المستضدات المختلفة لبكتريا *E. coli* (المصدر موجود).

٢-٣-١٠: محلول السيفر Alsever's solution  
حضر هذا المحلول بأذابة ٢٤.٦ غم من مادة الكلوكوز - شركة BDH - و ٩.٦ غم من مادة سترات الصوديوم الثلاثية - شركة TAAB - و ٥.٠٤ غم من مادة كلوريد الصوديوم NaCl - شركة BDH - في ١٢٠٠ مل من الماء المقطر، وعدل الاس الهيدروجيني الى ٦.١ بواسطة ١٥% حامض الليمون Citric acid ، ثم رشح المحلول بمرشح دقيق قطر ثقبه ٠.٢٢ مايكرومتر. واستعمل هذا المحلول لمنع تجلط الدم (Talib, ١٩٩٦).

٢-٣-١١: مثبت بوان Bouin's fixative  
حضر هذا المحلول بمزج ٧٥ مل من حامض البكريك المائي المشبع - شركة Merck - مع ٥ مل من الفورمالين ٤٠% - شركة BDH - مع ٥ مل حامض الخليك الثلجي - شركة BDH - وان هذا المحلول تم استخدامه في تثبيت العينات النسيجية (Baker & Silverton, ١٩٨٥).

٢-٣-١٢: صبغة هيما توكسيلين- شب هارس Harris Alum-Haematoxyline stain  
حضرت هذه الصبغة بمزج ٢٠ غم من شب البوتاسيوم - شركة BDH - مع ١ مل صبغة هيما توكسيلين - شركة BDH - و ٥ غم اوكسيد الزئبق - شركة Fluka - واذابتها في ٢٠٠ مل ماء مقطر، ثم اضيف اليه ١٠ مل من كحول الايثانول المطلق - شركة Fluka - واستخدمت هذه الصبغة في تصنيع المقاطع النسيجية (Baker & Silverton, ١٩٨٥).

٢-٣-١٣: صبغة الايوسين الكحولي Eosin stain

حضرت هذه الصبغة بأذابة ٠.٥ غم من صبغة الايوسن – شركة Riedle- في ١٠٠ مل من ٧٠% كحول الايثانول واستخدمت هذه الصبغة لتصبغ المقاطع النسجية (Baker & Silverton, ١٩٨٥).

### ١٤-٢-٣: لاصق هاوبت Haupt's Adhesive

حضر هذا المحلول من اذابة ١ غم جيلاتين – شركة Fluka في ١٠٠ مل ماء مقطر في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧م، ثم اضافة ٢ غم فينول – شركة BDH. وبعدها ٥ مل غليسول – شركة BDH. واستخدم هذا المحلول في الصاق المقاطع النسجية على الشرائح الزجاجية (Baker & Silverton, ١٩٨٥).

### ١٥-٢-٣: صبغة لشممان Leishman Stain

تم تحضير هذه الصبغة بأذابة ٠.١٥ غم منها شركة Merck في ١٠٠ مل من الكحول الايثيلي المطلق – شركة Fluka. وجرى بعد ذلك وضع الصبغة والكحول في قارورة سدت فوهتها باحكام بوساطة القطن، وسخنت هذه القارورة مدة ١٥ دقيقة في حمام مائي مع الرج المستمر، واستخدمت هذه الصبغة لتمييز وتفریق كريات الدم البيض بأنواعها في مسحات الدم التي اخذت من الارانب (Baker & Silverton, ١٩٨٥).

### ١٦-٢-٣: محلول الفينول Phenol solution

#### أ- محلول الفينول-A

حضر هذا المحلول بأذابة ٠.٠١ غم من كبريتات النحاس المائية  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  شركة BDH (الوزن الجزيئي ٢٤٩.٥) في كمية قليلة من الماء المقطر، ثم اضيف ٢ غم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH شركة BDH. واخيراً يضاف اليه ٠.٠٣ غم من مادة تترترات الصوديوم-البوتاسيوم Sodium-Potassium tartrate شركة TAAB (الوزن الجزيئي ١٦٦).

وبعد ذوبان هذه المواد يكمل الحجم النهائي الى (١٠٠ مل) بوساطة الماء المقطر.

#### ب- محلول الفينول-B

يوجد جاهز في الاسواق والمختبرات العلمية لان تحضيره صعب لاحتواءه على بعض المواد الخطرة. هذا الكاشف من شركة BDH-limited poole (England)، اخذت منه كمية (٥ مل) وخففت بالماء المقطر المعقم بنسبة (١:١).

### ١٧-٢-٣: محلول الالبومين وتخفيفه القياسية Standard Albumin solution

حضر هذا المحلول بأذابة ٦٠ غم من الالبومين البقري المخفف شركة BDH (الوزن الجزيئي ٦٥٤٠٠) في كمية قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠.٦ عياري) واكمل الحجم النهائي الى لتر باستعمال نفس المحلول ليكون التركيز النهائي للالبومين ٦٠ غم/لتر. من هذا المحلول تم تحضير التخفيف القياسية (١:١, ٢:١, ٤:١, ٨:١, ١٦:١, ٣٢:١, ٦٤:١, ٢٨:١) على التوالي، والتي تمثل التراكيز (٦٠, ٣٠, ١٥, ٧.٥, ٣.٧٥, ١.٨٧٥, ٠.٩٣٧٥).

٠.٦٨٧٥ (٠.٤٦٨٧٥) ملغم/لتر على التوالي. تم التخفيف باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠.٦ عياري). جرى استعمال هذه المحاليل لغرض تحضير المنحني القياسي Standard curve لمعرفة تركيز الكلوبيولين المناعي- كما ومعرفة تركيز البروتين الكلي (Bioshop et al., ١٩٨٥).

حضرت سلسلة تخافيف منها وجرة تقدير الكثافة الضوئية لكل تخفيف في سلسلة التخافيف وباستعمال تحليل الانحدار الخطي البسيط، احتسبت القيمة المقدرة للتركيز وحددت معادلة الخط المستقيم البسيطة وكانت معادلة من الدرجة الاولى للعلاقة بين قيمة الكثافة الضوئية (X) والتركيز (Y).

استخدم محلول البايوريت لتوفر مواد الاولية وعدم الحاجة فيه الى اجهزة قياس معقدة علماً ان القراءة بطول موجي ٥٤٠ نانومتر جدول (١-٣) شكل (١-٣) بالنسبة الى طريقة بايوريت وهذا يتفق مع باحثين اخرين (Bioshop et al., ١٩٨٥). استخدم طريقة لوري لقياس تركيز البروتين الكلي وذلك لحساسيتها العالية ودقتها علماً ان القراءة بطول موجي ٧٤٠ نانومتر جدول (٢-٣) شكل (٢-٣) بالنسبة الى طريقة لوري.

$$Y^{\wedge} = bx_i + a$$

$Y^{\wedge}$  = تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحني القياسي لتقدير كمية الكلوبيولين المناعي وتركيز البروتين الكلي.

$X_i$  = الكثافة الضوئية

$a$  = تمثل الفرق بين متوسط لتركيز وبين حاصل ضرب معامل الانحدار (b) تبين متوسط قيم الامتصاص في قراءة المطياف الضوئي.

$b$  = تمثل عامل الانحدار وبحسب المعادلة الاتية

$$b = \frac{S_{XY}}{S_{XX}}$$

$S_{XY}$  = مجموع مربعات الانحراف القيم X/Y

$S_{XX}$  = تمثل مجموعة مربعات الانحراف القيم X

وتحسب a من المعادلة التالية:-

$$a = \bar{Y} - b \bar{X}$$

$\bar{Y}$  = الوسط الحسابي للتركيز

$\bar{X}$  = الوسط الحسابي للكثافة الضوئية

وحساب عامل الارتباط بواسطة المعادلة الاتية:-

$$r = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sqrt{\sum X^2 - [\frac{(\sum X)^2}{n}] \sum Y^2 - [\frac{(\sum Y)^2}{n}]}}$$

جدول (١-٣) البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي لتركيز محلول الالبومين وتخافيفه القياسية.

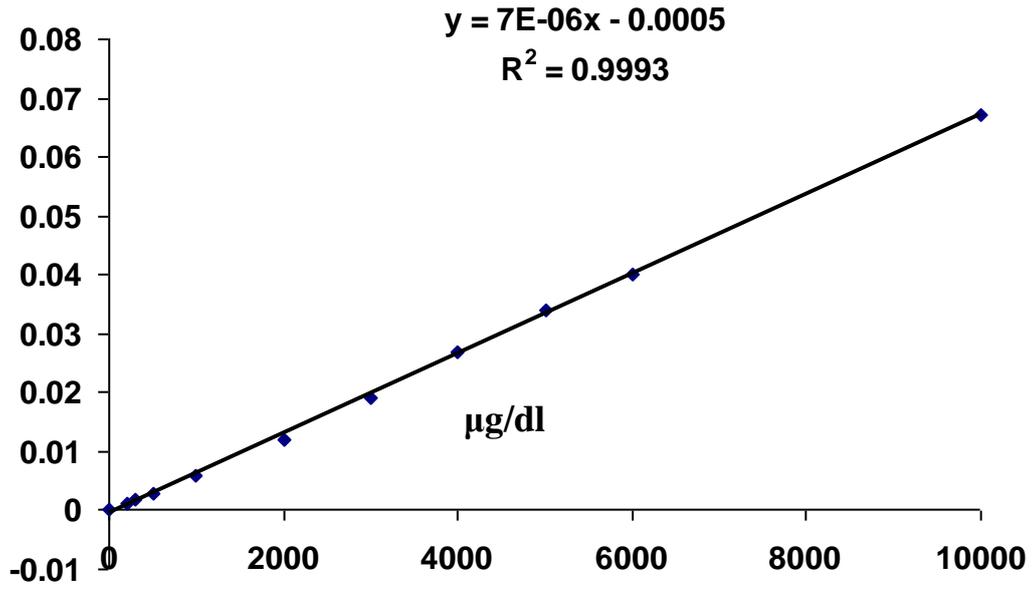
$X_i$	$Y_i$	$XY$	$X^2$	$Y^2$
0.001	6.	0.06	0.000001	36.00
0.002	3.	0.06	0.000004	9.00
0.003	10	0.030	0.000009	100.00
0.006	7.0	0.042	0.000036	49.00
0.012	3.70	0.0444	0.000144	13.69
0.019	1.870	0.03553	0.000361	3.4969
0.027	0.9370	0.02530	0.000729	0.8779
0.034	0.46870	0.01584	0.001156	0.2196
$\Sigma 0.104$	$\Sigma 119.03$	$\Sigma 0.231$	$\Sigma 0.0024$	$\Sigma 2799.70$

$$b = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sum X^2 - [\frac{(\sum X)^2}{n}] \quad \sum Y^2 - [\frac{(\sum Y)^2}{n}]}$$

$$a = -bX + Y$$

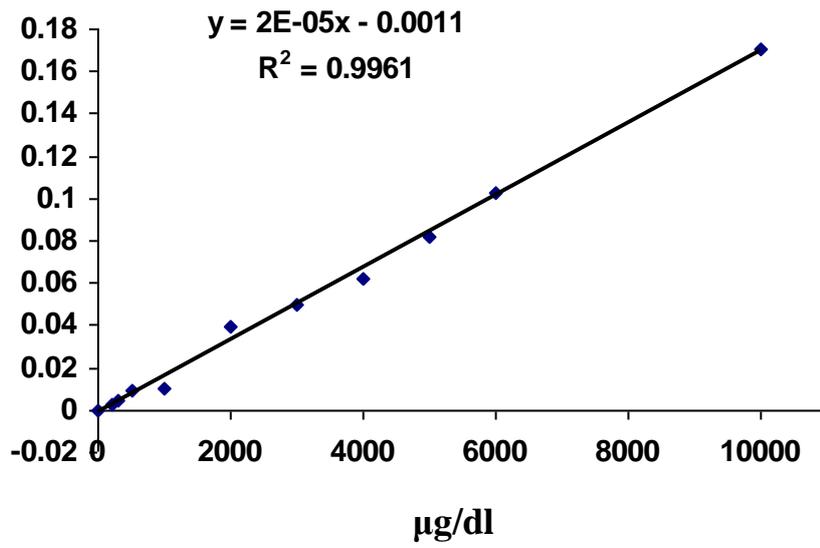
$$\hat{Y} = bX + a$$

$$\hat{Y} = 1E - 1X - \dots$$



شكل (٣-١) المنحني القياسي لتقدير الكلوبولين المناعي- كما ( $\delta$ -Globuline).

يوجد هنا جدول عرض



شكل (٢-٣): المنحني القياسي لتقدير تركيز البروتين الكلي في امصال الارانب.

٣-٣: عزلات بكتريا اشريشيا- القولون *Escherichia coli* strains  
تم الحصول على عزلات من بكتريا اشريشيا القولون مشخصة تشخيصاً اولياً من  
مستشفى الولادة والاطفال في الحلة، وذلك من اطفال مصابين بالاسهال بأعمار اقل من سنة  
تراوحت بين (٦-٨) اشهر، ولقد اجري على هذه العزلات العديد من الاختبارات التشخيصية  
التأكيديية وبأستخدام كواشف واوساط زرعية مختلفة.

٤-٣: الاوساط الزرعية Culture Media

١-٤-٣: Tryptic Soy Agar

حضر بأذابة ٩ غم من الوسط Tryptic Soy Agar – شركة BDH في كمية قليلة من  
الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، وبعد ذوبان هذه المادة نضع  
في كل انبوب (١٢-١٥) مل، ثم غطيت هذه الانابيب وعقمت بوساطة الموصدة Autoclave  
بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا الوسط في تحضير  
المستضد الجسمي O-Antigen (Strukus, ١٩٩٧).

٢-٤-٣: Tryptic Soy broth

حضر بأذابة ٩ غم من الوسط Tryptic Soy broth – شركة BDH في كمية قليلة من  
الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، وبعد ذوبان هذه المادة نضع  
تم تعقيمها بوساطة بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥  
دقيقة. استخدم هذا الوسط في تحضير المستضد السطحي (H- Flagellium Antigen  
(Strukus, ١٩٩٧) Antigen).

٣-٤-٣: الوسط المغذي الصلب Nutrient agar

حضر هذا الوسط بأذابة (٢٦ غم) من الوسط المغذي الصلب Nutrient agar  
– شركة Oxoid في كمية من الماء المقطر وبعد ذوبان هذا الوسط يكمل الحجم النهائي الى  
٥٠٠ مل من الماء المقطر، استخدم هذا الوسط لغرض تنمية البكتريا ودراسة الخصائص  
المظهرية للمستعمرات وكذلك في حفظ السلالات. ثم متعقيم هذا الوسط بوساطة الموصدة  
Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة (Strukus, ١٩٩٧).

٤-٤-٣: الوسط المغذي السائل Nutrient broth

حضر هذا الوسط بأذابة ٤ غم من الوسط Nutrient broth – شركة  
(Oxoid-Biokit S.A) ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، ثم عقم  
بوساطة بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة.  
استخدم هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا وتحضير العوالق البكتيرية المختلفة  
(Strukus, ١٩٩٧).

٥-٤-٣: وسط الماكونكي الصلب MacoConkey agar

حضر هذا الوسط بأذابة (٢٠ غم) من الوسط الماكونكي الصلب MacoConkey agar – شركة Himedia (Himedia-Biokit S.A) في كمية قليلة من الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر، تم تعقيمه بوساطة بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا الوسط لغرض اختبار نمو البكتريا علية ودراسة خصائص النمو (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٦-٤-٣: وسط اكار اليوريا Urea agar

حضر بأذابة ٥ مل من محلول ٤٠% من اليوريا المعقمة بطريقة الكلوروفورم الى وسط Ureabase agar شركة (Himedia) المحضر من اذابة ٢.٤ غم من هذا الوسط في ٩٥ مل من الماء المقطر المعقم، وزعت المحتويات في انابيب اختبار معقمة وتركت لتتصلب بشكل مائل الاكار. استخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز Urease (Christensen, ١٩٤٦; MacFaddin, ٢٠٠٠).

٧-٤-٣: وسط اكار الجيلاتين Gelatin agar

حضر بأضافة ٤.٤% غم من الجيلاتين – شركة (Judex) الى الوسط المغذي الصلب Nutrient agar، ووزع في اطباق نظيفة ومعقمة. استخدم لغرض التحري عن قابلية البكتريا على تحليل الجيلاتين (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٨-٤-٣: وسط اكار النشأ Starch agar

حضر بأضافة ٢% نشأ Soluble Starch شركة BDH الى الوسط المغذي الصلب Nutrient agar. استخدم هذا الوسط لاختبار قابلية البكتريا على تحليل النشأ (Strukus, ١٩٩٧).

٩-٤-٣: وسط تخمر السكريات Sugar fermentation

أ- الوسط الاساس Medium base

حضر حسب ما جاء في (MacFaddin, ١٩٧٩) بأذابة ٥ غم بيتون Bacto-pepton و ١ غم من خلاصة لحم البقر Bacto-beef extract و ٢.٥ غم من كلوريد الصوديوم NaCl و ٠.٠١٨ غم من دليل احمر الفينول Phenol red في ٥٠٠ مل من الماء المقطر عدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٤، وزعت المحتويات على انابيب اختبار واضيف لكل منها انبوبة درهم Durham tube للتحري عن انتاج الغاز وعقمت الانابيب بالطريقة الاعتيادية Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة (MacFaddin, ٢٠٠٠).

ب- محلول السكر Sugar solution

تم تحضير محاليل السكريات بتركيز ١% وعقمت بوساطة بخار الكلوروفورم، وبما ان معظم السكريات تتلف بالحرارة فقد اضيف القليل من الكلوروفورم الى محلول السكر ورج جيداً ومن ثم ترك يركد ساعة وصار بعدها المحلول معقماً (Smith, ١٩٨٢). ثم سحب من الاعلى بوساطة ماصة معقمة حجم ١ مل من محلول السكر واضيف الى كل انبوبة من الانابيب المعقمة

السابقة في الفقرة (أ). استخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج الحامض وتوليد الغاز من السكريات (Smith, ١٩٨٢).

٣-٤-١٠: وسط ماء البيبتون Pepton water  
حضر بأذابة ٥ غم من الوسط Pepton water شركة (Hazardous) في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر من الماء المقطر. ووزع الوسط على انابيب اختبار. استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج جذور الاندول حسب طريقة (Cruicksank *et al.*, ١٩٧٥)، وعقم بالطريقة الموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١١: وسط احمر المثيل فوكس بروسكور MR-VP  
حضر بأذابة ١.٧ غم من الوسط شركة (HiMedia M٠٧٠) في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل من الماء المقطر. ووزع الوسط على انابيب اختبار وعقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة ووزع على انابيب اختبار. استخدم الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على توليد الحامض والاستيل مثيل كاربينول (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١٢: وسط سيمون ستريت Simmon's citrate  
حضر هذا الوسط بأذابة ٢.٤٢ غم من وسط Simmon's citrate شركة (HiMedia M٠٠٩) في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل من الماء المقطر. ووزع في انابيب اختبار معقمة وتركنت لتتصلب بشكل مائل الاكار. عقم هذا الوسط بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات Citrate بوصفها مصدراً وحيداً للكربون (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١٣: وسط Kligler Iron agar  
حضر هذا الوسط بأذابة ٥.٧٥ غم من الوسط Kligler Iron agar شركة (HiMedia M٠٠٩) في كمية من الماء المقطر وبعد ذوبان الوسط اكمل الحجم النهائي الى ٥٠٠ مل من الماء المقطر. ووزع في انابيب اختبار معقمة بعد ان عقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة، وترك ليتصلب بشكل مائل الاكار. استخدم للكشف عن البكتريا المنتجة للغاز H<sub>2</sub>S (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٣-٤-١٤: وسط اختبار الحركة Motility Medium  
حضر هذا الوسط بأذابة ١٠ غم من الوسط شركة (HiMedia-Biokit S.A) في كمية من الماء المقطر وبعد ذوبان الوسط اكمل الحجم النهائي الى ٢٥٠ مل من الماء المقطر. وعقم بواسطة المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة، ووضع في انابيب اختبار معقمة وترك ليبرد بشكل عمودي. استخدم لغرض الكشف عن قابلية البكتريا على الحركة (Difco, ١٩٨٤).

٣-٤-١٥: وسط Eosin Methylene blue (EMB)

حضر هذا الوسط بأذابة ٣٧.٥ غم من الوسط (EMB) شركة (HiMedia) في كمية قليلة من الماء المقطر وبعد ذوبان هذا الوسط اكمل الحجم النهائي الى ٢٥٠ مل من الماء المقطر. ثم عقم بوساطة المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م<sup>٠</sup> وضغط ١٥ باوند ولمدة ١٥ دقيقة، ووضع في انابيب اختبار. استخدم هذا الوسط لغرض تفريق بكتريا *Escherichia coli* (MacFaddin, ٢٠٠٠).

٥-٣: تحضير المستضدات البكتيرية

١-٥-٣: تحضير معلق بكتريا *E. coli* المقتولة بالحرارة Killed antigen، لثق حوالي ١٢ انبوب مائل Slant على وسط Nutrient agar لغرض نموها في سطح هذه الانابيب، غسل السطح النامي باستخدام محلول الملح الوظيفي، ثم جمعت المادة المغسولة في قارورة مفردة. سخنت القارورة في درجة حرارة ٦٠ م<sup>٠</sup> لمدة ساعة في الحمام المائي لقتل هذه البكتريا، ثم بعد ذلك قرب تركيز هذه الجراثيم الى ما يقرب من (٦) من قياس ماكفرلانند (المصدر موجود).

٢-٥-٣: تحضير المستضد الجسمي Somatic antigen

١- باستعمال ماصة معقمة نقل تحت ظروف معقمة بعض القطرات من المزروع البكتيري المأخوذ من المرق الـ Broth الى الوسط الصلب المسمى Tryptic Soy agar الى ستة انابيب مائلة صلبة Slant بحيث رسب هذا الزرع او النمو على كل سطوح الـ Slant ، وحضنت الانابيب لمدة ٤٨ ساعة في درجة حرارة ٣٧ م<sup>٠</sup>.

٢- في نهاية اليوم الثاني نقل تحت ظروف معقمة (١-٢) مل من المحلول Normal saline على سطح النمو، ومن ثم غلق الغطاء. مزج السلاين مع الزرع Culture بحيث اصبح معظم الزرع في المعلق Suspension. بعد ذلك نقل هذا المعلق الى فلاسك معقم وكررت هذه العملية مع الانابيب الستة الاخرى.

٣- وضعت بعد ذلك هذه الانابيب في حمام مائي (١٠٠ م<sup>٠</sup>) واستمر بالغليان لمدة ساعتين. (تم اضافة الماء الى الحمام المائي حتى لا ينقص الماء).

٤- بعد اكتمال التسخين نقل المعلق الى انبوب طرد مركزي معقم وطردت مركزياً لمدة ٢٠ دقيقة بسرعة وفي درجة حرارة ٥ م<sup>٠</sup>.

٥- همل الراشح ثم علق راسب البكتريا في كمية كافية من المحلول الملحي الفورمالين المعقم ٠.٣% Formal saline sterile، وذلك لانجاز عكورة ما يقارب القياس (٦) لـ ماكفرلانند Macrfland (ثم حفظ في الفريزر).

٦- تم الكشف عن التلوث وذلك بنقل (٠.١) مل من المعلق الى انبوبة زرع حاوية على Tryptic Soy agar ثم حضن ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ م<sup>٠</sup>. (المصدر موجود)

٣-٥-٣: تحضير المستضد السوطي Falagellar antigen

١- تحت ظروف معقمة تم نقل (٠.٥) مل من المعلق البكتيري بالماصة واخذت النقلة من المرق المغذي من الجزء العلوي للانبوب الذي حصل فيه النمو (لغرض حجز اغلب الكائنات الحية).

٢- نقل هذا النمو الى فلاسك حاوي (١٠٠) مل من مادة الوسط الزرع المعقم Tryptic Soy agar. ثم حضن في درجة حرارة ٣٧ م<sup>٠</sup> لمدة ٢٤ ساعة.

٣- في نهاية مدة التحضين تم اضافة ١٠٠ مل من ٠.٦% من المحلول الملحي الفورمالين المعقم Formal saline sterile الى الفلاسك ثم ترك لمدة اربعة ايام في درجة حرارة الغرفة ٢٥ م<sup>٠</sup>.

- ٤- في نهاية الاربعة ايام نقل المعلق الى انايبب طرد مركزي معقمة وطررد مركزياً لمدة ٣٠ دقيقة بسرعة ٣٥٠٠ دورة/دقيقة، ثم سكب الراشح وحفظ الراشب.
- ٥- اضيف الى الراشب قليلاً جداً من المحلول الملحي الفورمالين المعقم.
- ٦- تم نقل كل رواسب الانايبب الى فلاسك معقم واضيف اليه قليلاً من المحلول الملحي الفورمالين المعقم حتى يصبح مقارب الى القياس الموجود لمحلول ماكفر لاند M.S (٦). المصدر موجود

### ٦-٣: تمنيع الحيوانات المختبرية

استخدمت طريقتين لتمنيع الحيوانات المختبرية. الاولى طريقة الحقن تحت الجلد Subcutaneous injection، والثانية طريقة الحقن بالبريتون IntraPeritoneally Injection. تم استخدام مساعد مناعي في تمنيع الحيوانات وهو مساعد فرويند الكامل الذي هو التيوبوركليين Freund's complete adjuvunets. Tuberculine بمزجه مع المستضد البكتيري. والاخر هو مساعد فرويند غير الكامل Freund's incomplete adjuvunets والذي هو زيت زهرة oil of Sunflowers ومزج مع المستضدات البكتيرية. حيث تم المساعد المناعي مع المعلق البكتيري بنسبة ١:١.

وكان منوال التمنيع كالآتي:-

- ١- الجرعة الاولى:- تم حقن خمسة ارانب بجرعة مقدارها (١ مل) من المعلق البكتيري الممزوج مع المساعد المناعي فرويند الكامل Freund's complete adjuvunets شركة تحت الجلد Subcutaneous injection في المنطقة تحت الجلد اربع حقنات (٠.٢٥ مل) على كل جانب من جانبي العنق وكذلك منطقة بين الفخذ والبطن (Groin region).
- ٢- الجرعة الثانية: بعد اسبوعين (٢ weeks) تم حقن تلك الارانب الخمسة بنفس المعلق البكتيري وبذات الجرعة (١ مل عبر IntraPeritoneally وبكامل الجرعة مع المساعد المناعي غير الكامل Freund's incomplete adjuvunets.
- ٣- الجرعة الثالثة:- بعد اسبوعين (٢ weeks) تم حقن تلك الارانب الخمسة بذات الجرعة (١ مل) من المعلق البكتيري ومساعد مناعي غير كامل. كما تحقن تحت الجلد كما في الجرعة الاولى.
- ٤- الجرعة الرابعة:- بعد اسبوعين (٢ weeks) تحقن تلك الارانب بذات الجرعة والمعلق البكتيري كما في الجرعة الثانية.
- ٥- بعد اسبوعين من الجرعة الرابعة تشرح الارانب.
- ٦- بالنسبة الى ارانب السيطرة Control فقد حقنت بالمحلول الملحي الوظيفي Normal saline بنفس الجرعة (١ مل) وبنفس المنوال اعلاه.

ملاحظة:-

يعاد التجريع على المجاميع الاخرى من الارانب وبنفس المنوال ولكن باختلاف المستضد البكتيري.

### ٧-٣: استحصال الامصال وحفظها Serum collection and Preservation

بعد انتهاء منوال تمنيع الحيوانات ثم تشریحها وسحب الدم من القلب مباشرة حيث جمع الدم في انايبب معقمة وتركت كي يتخثر الدم، بعدها وضعت هذه الانايبب في جهاز الطرد

المركزي ونبذت لمدة ١٠ دقائق وبسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة. ثم فصل المصل Serum بواسطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة ووضع في انابيب لحفظ العينات وحفظت في المجمدة لحين الاستعمال.

٣-٧-١: تقدير تركيز البروتين الكلي في المصل

تم استخدام طريقة لوري Lawry method في تقدير تركيز البروتين الكلي في المصل وكما يلي:-

١- مزج ١٠٥ مل من محلول (فينول) Phenol solution A (A). وايضاً ١ مل من

المحلول البروتيني المراد قياس تركيزه Serum في انبوبة اختبار.

٢- حضر محلول الملح الوظيفي Saline كبلانك Blank يحوي ١.٥ مل من محلول A و ١

مل من الملح الوظيفي Saline في انبوبة اختبار اخرى.

٣- تركت الانبوتين ١ و ٢ في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة.

٤- بعد ذلك تم نقل وبسرعة ٠.٤ مل من محلول B (Phenol solution B) الى كلا الانبوتين ومزجتا فوراً.

٥- تركت تلك الانابيب لمدة ٣٠ دقيقة مرة اخرى.

٦- تم قراءة الامتصاصية Absorption لكل بروتين على طول موجي (٧٤٠ نانومتر) مقابل البلانك Saline-Blank.

٧- رسم منحنى يمثل التركيز مقابل الامتصاصية لكل المحاليل التي حضرت وعمل Best fit line خلال النقاط التي حصل عليها.

٨- استخدمت المعادلة الرياضية التالية  $Y=2E-0.05X-0.0011$

$Y$  = تركيز البروتين الكلي (مايكروغرام/دي لتر)

$X$  = الامتصاصية Absorption (Lawry, ١٩٥١; Mendels et al., ١٩٧٦)

٣-٧-٢: عزل الاضداد بواسطة كبريتات الامونيوم المشبعة

١- نأخذ ١.٥ مل من المصل واضيف اليه بشكل تدريجي قطرات من كبريتات الامونيوم المشبعة Ammonium Sulfate saturation وبمقدار (٠.٧٥ مل) وبعد اخر اضافة من كبريتات الامونيوم المشبعة توضع الانابيب في درجة حرارة الغرفة مع الهز المستمر لمدة ساعة كاملة.

٢- طردت مركزياً بسرعة ٤٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة، حيث يكون الراسب هو الكلوبولين المناعي- كما، ولكنه يحتوي بعض البروتينات المصلية أي ليس نقياً بشكل كامل.

٣- ذوب الراسب مرة ثانية وذلك بتعليق الراسب في ١.٥ مل من المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline (٠.٨٥%) مع الهز المستمر.

٤- كررت الخطوتين ١ و ٢ على التوالي لكي نضمن تنقية افضل.

٥- لعزل الكلوبولين المناعي - كما  $\delta$ -Globulin ذوب الراسب في (٠.٥ مل) من محلول Borate-saline solution.

٦- تم قياس تركيز الاضداد بواسطة طريقة البايوريت (المصدر موجود).

٣-٧-٣: قياس تركيز الكلوبولين المناعي- كما

استعملت طريقة بايوريت لقياس تركيز الكلوبولين المناعي - كما حسب طريقة (Bishop et al., 1985) وكالاتي:-

- ١- وضع ٢ مل من محلول الملح الفسيولوجي في انبوبة اختبار خاصة بجهاز المطياف الضوئي (Spectronic ٢١) واضيف اليها (٣ مل) من محلول بايوريت.
- ٢- اضيف الى هذه الانبوبة (٠.٢ مل) من محلول الكلوبولين المناعي - كما الذي حضر في الفقرة (٢-٧-٢) وتترك بدرجة حرارة الغرفة للتفاعل لمدة ٣٠ دقيقة.
- ٣- لتحضير البلانك وذلك لمعايرة الجهاز (انبوبة السيطرة) اضيف (٢ مل) من المحلول الملحي الفسيولوجي، ثم اضيف (٣ مل) من محلول بايوريت الى هذه العملية.
- ٤- تترك هذه الانبوبة بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة لغرض التفاعل.
- ٥- قرأت الامتصاصية على طول موجي مقدار ه ٥٤٠ نانومتر ضد Saline-reagent blank.
- ٦- رسم المنحني القياسي الذي يمثل الامتصاصية مقابل التركيز، بعد ذلك من خلال النقاط التي حصلنا عليها حساب الانحراف القياسي لكل نقطة من هذه النقاط.
- ٧- استخدمت المعادلة الرياضية الاتية:-

$$Y=7E-06X-0.0005$$
$$R^2=0.9993$$

$Y$  = التركيز الكلي للكلوبولين المناعي كما بوحدة ملغم/دي لتر  
 $X$  = الامتصاصية Absorption

- ٣-٧-٤: معايرة الكلوبولينات المناعية الجهازية المتخصصة بالمستضد البكتيري في البداية تم تحضير عالق كريات الدم الحمر للخراف المغطاة بالمستضد البكتيري ومن ثم اجراء التلازن الدموي غير المباشر وكالاتي:-
- ٣-٧-٤-١: تحضير عالق كريات الدم الحمر للخراف المغطاة بالمستضد البكتيري تم دبغ وتغطية الكريات الحمر بمستضدات البكتريا المختلفة لاشريشيا القولون على وفق طريقة (Garvey et al., 1977) كالاتي:-
- ١- تم الحصول على عالق كريات الدم الحمر للخراف في اثناء ذبح الحيوان باستعمال قنينة زجاجية معقمة.
- ٢- تم اضافة مانع التخثر محلول السيفر Alsever's solution الى عالق كريات الدم الحمر للخراف بنسبة ١:١ ومزج معه بلطف، وتم حفظ الدم بدرجة حرارة ٤ م.
- ٣- نقل ٣ مل من دم الخراف بوساطة ماصة نظيفة ومعقمة الى انبوبة الطرد المركزي بعد ذلك نبذ بجهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة.
- ٤- سحب الراشح بوساطة ماصة باستور معقمة وتم الاحتفاظ بالراسب ونقل اليه ١٠ مل من محلول الملح الوظيفي وبعد ذلك مزج جيداً بوساطة ماصة باستور.
- ٥- نبذت هذه الانبوبة في جهاز الطرد المركزي ٥ دقائق بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة ثم ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب.
- ٦- تم اضافة ١٠ مل من محلول الملح الوظيفي الى راسب كريات الدم الحمر ومزج جيداً بوساطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة.
- ٧- اخذ ٣ مل من العالق اعلاه (الفقرة ٦) اضيف اليه ٣ مل من محلول حامض التانيك Tannic acid (٠.٥%) ثم مزجاً جيداً بوساطة ماصة باستور معقمة وبعد ذلك وضعت الانبوبة في حمام مائي درجة حرارة ٣٧ م لمدة ١٠ دقائق.

- ٨- نبذت الانبوبة في جهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق وبسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة بعد ذلك ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب.
- ٩- تم اضافة ٣ مل من محلول الملح الوظيفي الى راسب كريات الدم الحمر ومزج جيداً بوساطة ماصة باستور نظيفة ومعقمة، اضيف الى هذا المعلق ٣ مل من المستضد البكتيري للـ *E. coli* وذلك لتغطية كريات الدم الحمر كافة لهذا المستضد وترك هذا المعلق لمدة ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة.
- ١٠-نبذت الانبوبة الحاوية على عالق كريات الدم الحمر المغطاة بالمستضد في جهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق وبسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة.
- ١١- ترك الراشح وتم الاحتفاظ بالراسب، اضيف اليه ٥ مل من الملح الوظيفي لاجل غسل كريات الدم الحمر، ثم نبذت الانبوبة بجهاز الطرد المركزي بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ٥ دقائق وترك الراشح واحتفظ بالراسب.
- ١٢- تم اضافة ٤ مل من محلول الملح الوظيفي الفسيولوجي الى راسب كريات الدم الحمر المغطاة بالمستضد وذلك لغرض استخدامه في معايرة الاضداد الجهازية المصلية.

٣-٧-٤-٢: التلازن الدموي غير المباشر

- استعمل طبق المعايرة لغرض اجراء التلازن الدموي غير المباشر وفقاً لطريقة Garvey واخرون (١٩٧٧) وكالاتي:-
- ١- وضع في كل حفرة ٥٠ مايكروليتر من المحلول الملحي الفسيولوجي.
  - ٢- اضيف الى الحفرة الاولى ٥٠ مايكروليتر من المصل المحضر وخط بالماصة المايكروية.
  - ٣- نقل ٥٠ مايكروليتر من الحفرة الاولى الى الحفرة الثانية وخط بالماصة المايكروية.
  - ٤- كررت الخطوة السابقة الى حين الوصول الى اخر حفرة، حيث اهمل منها ٥٠ مايكروليتر وبذلك يكون المصل قد خفف مرات عديدة كي نحصل على تخافيف ٢/١ و ٤/١ و ٨/١ و ١٦/١ و ٣٢/١..... ٤٠٩٦/١ بحيث يبقى حجم السائل في الحفر ثابتاً.
  - ٥- اضيف الى كل حفرة ٥٠ مايكروليتر من عالق كريات الدم المغطاة بالمستضد البكتيري ورج الطبق بلطف.
  - ٦- حضن الطبق بدرجة حرارة ٣٧°م ولمدة ٤٥ دقيقة.
  - ٧- اخرج الطبق من الحاضنة وتم تدويره بلطف وسجل مقدار العيار.
  - ٨- وضع الطبق في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة وسجل العيار مرة اخرى.

٣-٧-٥: فحص الانتشار المناعي الشعاعي Single Radioactive Immunodiffusion assay

- استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد لتقدير مستوى الكلوبولينات المناعية IgG و IgM و IgA والتمم C<sub>٣</sub> و C<sub>٤</sub> وصفت باختبار منسيني Mancini test (Mancini et al., ١٩٦٥). وكذلك حسب ما ورد في تعليمات الشركة المصنعة المرفقة مع الاطباق الخاصة بهذا الفحص (Biomaghreb, ٢٠٠٢). حيث ان الهلام Gel الموجودة فيه الحفر حاوي على الضد احادي المتخصص Antimonospecific.
- يتم انتشار النموذج Sample بشكل شعاعي خلال الهلام والمستضد يكون حلقة راسب مع الضد الاحادي، ويتم احتساب النتيجة بوساطة جدول القياسات المرفق مع عدة الفحص (Rowe et al., ١٩٧٢; Palmer et al., ١٩٧٢) وكانت طريقة العمل كالاتي:-

- ١- فتح الطبق وترك لمدة ٥ دقائق بدرجة حرارة الغرفة وذلك للسماح بإزالة أي رطوبة موجودة في الطبق عن طريق التبخر.
  - ٢- وضع ٥ مايكروليتر من عينات المصل Serum في حفر الاطباق المرقمة من ١-١٢ والحاوية على الاكاروز Agarose، و٠.١٥% من Sodium azide والمصل المضاد احادي التخصص Monospecific Anti-serum.
  - ٣- وضعت قطعة قطن رطبة او Wet gauze في مركز الطبق وذلك لتجنب جفاف الاكاروز Agarose dehydration، ثم غلق الطبق بأحكام جيد وبلطف.
  - ٤- وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة ٢٣م لمدة ٤٨ ساعة بالنسبة للمتمم C<sub>٣</sub>، IgG، IgA، C<sub>٤</sub> ولمدة ٧٢ ساعة بالنسبة للـ IgM.
  - ٥- تم اخراج الاطباق في الحاضنة وبعدها قياس القطر لحلقة الترسيب المتكونة حول كل حفرة بواسطة المسطرة الخاصة بالقياس.
- تم استعمال الجدول المرفق مع عدة الفحص المجهزة من الشركة لايجاد قيمة التركيز المقابلة لقطر حلقة الترسيب مباشرة وقد تم تسجيل النتائج بوحدة mg/dl.

٨-٣: جمع عينات الدم مع مانع تجلط

## Chapter Four      الفصل الرابع The Results      النتائج

٤-١ : اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية.

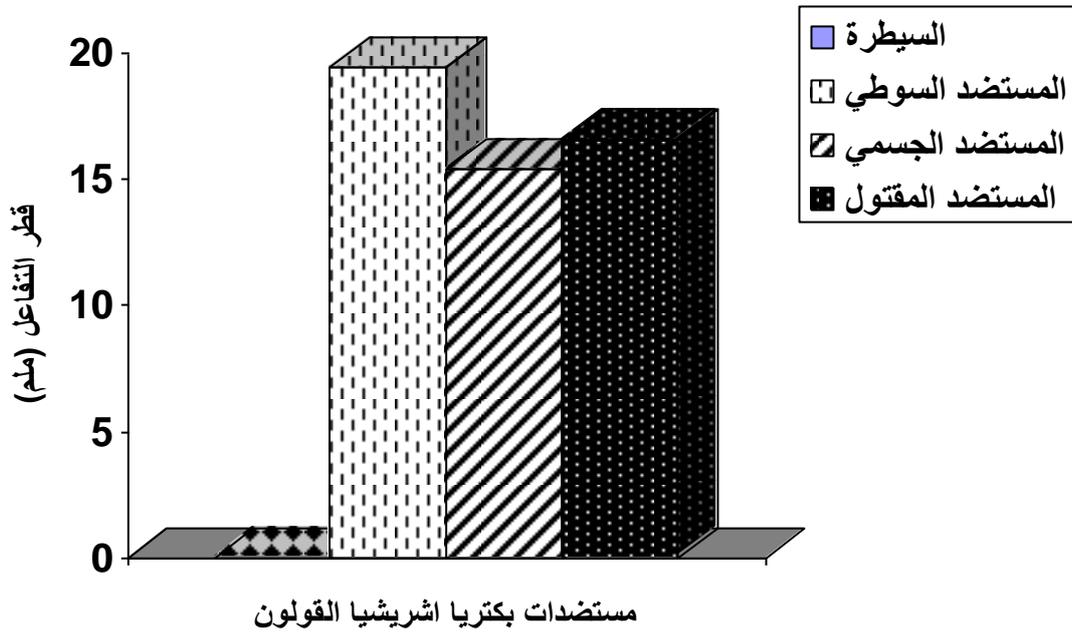
٤-١-١ : اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في الاستجابة المناعية الخلطية والمتخصصة بدلالة فرط الحساسية الانية والمختبر في الجلد.

جرى تمنيع كل من حيوانات التجربة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون، في حين جرعت حيوانات السيطرة بمحلول الملح الوظيفي Normal Saline فقط. وتمت دراسة فرط الحساسية الانية بعد ٢٤ ساعة من حقن ٠.١ مل من المستضد في الادمة. اذ بلغ متوسط اقطار التفاعل (ملم) للمستضدات المقتولة والجسمية السوطية ١٦.٦ و ٥.٤ و ١٩.٤ ملم على التوالي. في حين نلاحظ علامات فرط الحساسية الانية في حيوانات السيطرة ٠ ملم. وكما هو موضح في الجدول (٤-١) والشكل (٤-١).

جدول (٤-١) الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة بمستضدات بكتريا اشريشيا القولون والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (ملم) بعد ٢٤ ساعة من حقن المستضدات.

Sign.	P.V	Maximum	Minimum	الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
		٠	٠	٠	٠	٠	السيطرة control
H.S	٠٠ ٠٠١	٢٣	١٦	١.٢	٢.٧	١٩.٤	المستضد السوطي Flagellar Ag.
		١٨	١١	١.٢	٢.٧	٥.٤	المستضد الجسيمي

							Somatic Ag.
		١٩	١٤	٠.٩٢	٢.٠٧	١٦.٦	المستضد المقتول Killed Ag.



شكل (٤-١) مستويات الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة بمستضدات المستضد المقتول والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (مم) بعد ٢٤ ساعة من حقن المستضدات.

٤-١-١-١: التقويم الاحصائي لاثـر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في الاستجابة المناعية الخلطية بدلالة فرط الحساسية الانية

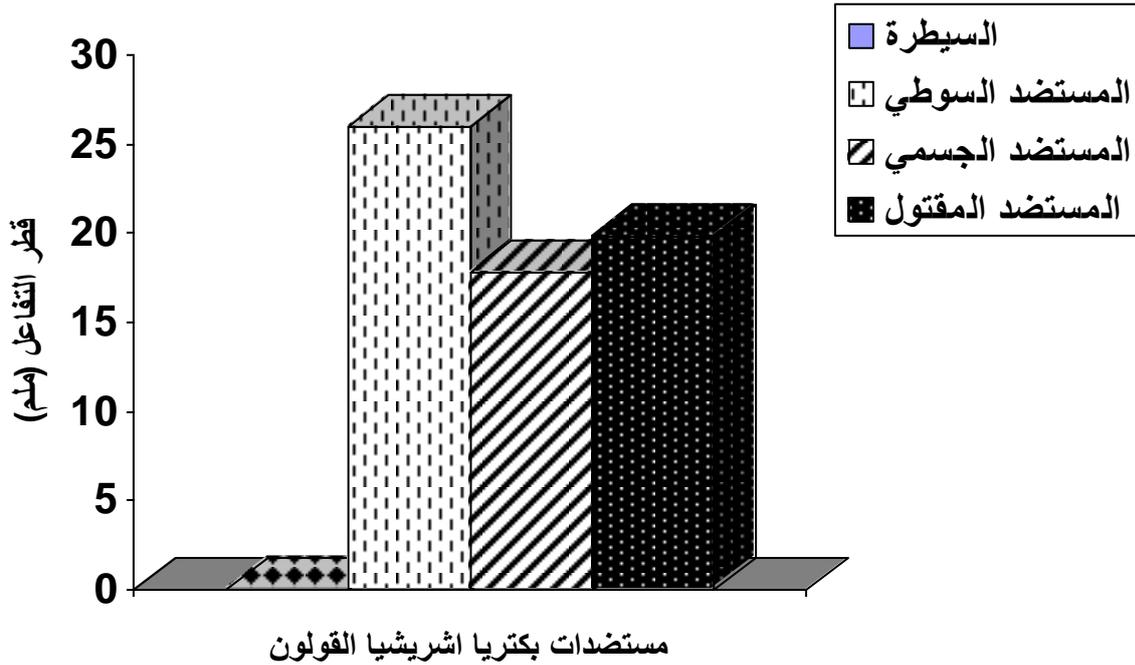
جرى احتساب معدل قطر التفاعل (ملم) لاثـر كل انواع مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده. كما تم احتساب الخطأ المعياري لانواع مستضدات بكتريا اشريشيا القولون بعد ذلك قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكل من المستضد المقتول-السيطرة، المستضد الجسمي- السيطرة، المستضد السوطي-السيطرة. حيث دلت نتائج التـمـنيـع ان هنالك فرق عالي المعنوية  $H.S P < 0.01$  في قياس الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بين كل انواع المستضدات المدروسة وذلك لعدم وجود مقارنة مع نموذج السيطرة والسبب يعود لعدم وجود استجابة مناعية ضدية لحيوانات السيطرة.

٤-١-٢: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد  
جرى دراسة اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون الممنعة في حيوانات التجربة بدلالة فرط الحساسية المتأخر بدلالة قطر التفاعل (ملم) والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد وذلك بعد مرور ٢٤ ساعة من دراسة اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون بدلالة فرط الحساسية الانية، اذ بلغ متوسط اقطار التفاعل للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٢٦ و١٩.٨ و٧.٨ ملم على التوالي، في حين لم يلاحظ ايضاً في حيوانات السيطرة علامات فرط الحساسية المتأخرة وكما هو موضح في الجدول (٢-٤) والشكل (٢-٤).

جدول (٢-٤) الاستجابة المناعية الخلوية بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (ملم) بعد ٤٨ ساعة من حقن مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في الارانب.

Sign.	P.V	Maximum	Minimum	الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
		٠	٠	٠	٠	٠	السيطرة control
H.S	٠.٠٠٠٠١	٣٠	٢١	١.٧١	٣.٨	٢٦	المستضد السوطي Flagellar Ag.
		٢٠	١٣	١.٣١	٢.٩	١٧.٨	المستضد الجسمي Somatic Ag.

		٢٣	١٧	١.٠٦	٢.٣	١٩.٨	المستضد المقتول Killed Ag.
--	--	----	----	------	-----	------	----------------------------------



شكل (٤-٢) مستويات الاستجابة المناعية الخلوية بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (مم) بعد ٤٨ ساعة من حقن مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في الارانب.

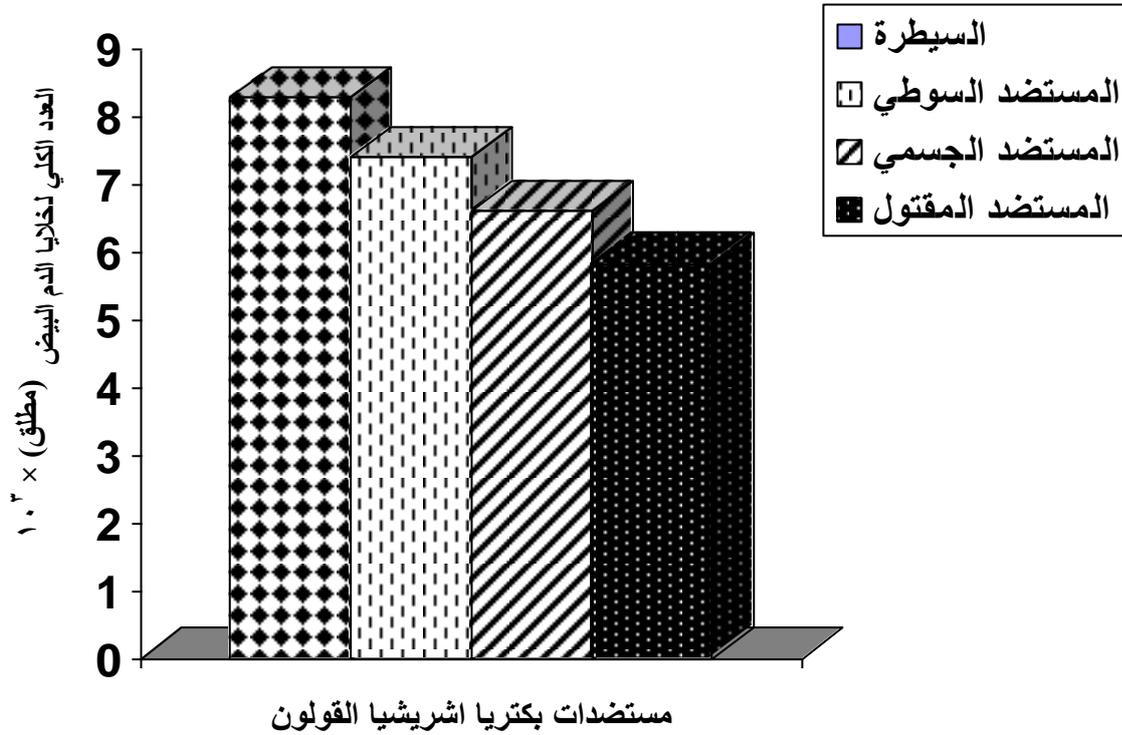
٤-٢-١-٢: التقويم الاحصائي لآثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون على الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر  
جرى احتساب معدل قطر التفاعل (مم) في الجلد بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا لآثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون بالنسبة لدورها في الاستجابة المناعية الخلوية وتم احتساب الخطأ المعياري كل على حده. بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكل انواع المستضدات مع نموذج السيطرة. اذ دلت نتائج التمنيح باستخدام انواع مختلفة من مستضدات هذه البكتريا ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S في قياس الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بين تلك المستضدات وذلك لعدم وجود مقارنة مع نموذج السيطرة والسبب يعود لعدم وجود استجابة مناعية خلوية لحيوانات السيطرة.

٤-١-٣: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون على العدد الكلي لخلايا الدم البيض بعد انتهاء فترة تمنيع حيوانات التجربة بمستضدات بكتريا اشريشيا القولون جرى اخذ عينات دم منها وتم عمل مسحات من الدم على السلايد لغرض عد خلايا الدم البيض الكلي ودراسة اثر كل مستضد على العدد الكلي لتلك الخلايا ومقارنته مع مجموعة السيطرة. اذ بلغ

متوسط العدد الكلي لخلايا الدم البيض ٥.٨٢ و ٦.٦ و ٧.٤٨ ( $10^3 \times$ ) للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين كان ذلك المتوسط في عينة السيطرة هو ٨.٢٨ ( $10^3 \times$ )، وكما هو موضح في الجدول (٣-٤) والشكل (٣-٤).

جدول (٣-٤) العدد الكلي لخلايا الدم البيض في الارانب الممنعة بأنواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sig n.	P.V		الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
H.S	٠.٠٠٠١	٢ & ٤	٠.١٩	٠.٤٢	٨.٢٨	السيطرة control
H.S	٠.٠٠٠٢	٣ & ٤				
H.S	٠.٠٠٠١	٢ & ٣	٠.١٢	٠.٢٦	٧.٤٨	المستضد السوطي Flagellar Ag.
H.S	٠.٠٠٠١	١ & ٣	٠.١٠	٠.٢٢	٦.٦	المستضد الجسمي Somatic Ag.
H.S	٠.٠٠٠١	١ & ٤				
H.S	٠.٠٠٠١	١ & ٢	٠.٠٨	٠.١٩	٥.٨٢	المستضد المقتول Killed Ag.



شكل (٤-٢) مستويات العدد الكلي لخلايا الدم البيض في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٢-١-٢: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون على العدد الكلي لخلايا الدم البيض

جرى احتساب معدلات العدد الكلي لخلايا الدم البيض لحيوانات التجربة والممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لكل انواع تلك المستضدات وقورنت مع نموذج السيطرة. حيث اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S لحساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض المستحصلة من حيوانات التجربة بين تلك المستضدات المقتولة والجسمية والسوطية بالمقارنة مع نموذج السيطرة.

٤-١-٤: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في العد التفريقي لخلايا الدم البيض بعد انتهاء فترة تمنيع حيوانات التجربة بمستضدات بكتريا اشريشيا القولون جرى اخذ عينات دم منها وتم عمل مسحات من الدم على السلايد لغرض العد التفريقي لخلايا الدم البيض المختلفة ولكل مستضد على حده ومقارنتها مع نموذج السيطرة.

ويبين جدول (٤-٤) وجود تباين في العد التفريقي لخلايا الدم البيض بين حيوانات المعاملة وحيوانات السيطرة. اذ بلغ متوسط عدد خلايا الدم البيض العدلة Neutrophils ٢.٥٥ و ٢.٩٩ و ٢.٠٤ (× ١٠<sup>٣</sup>) للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين كان

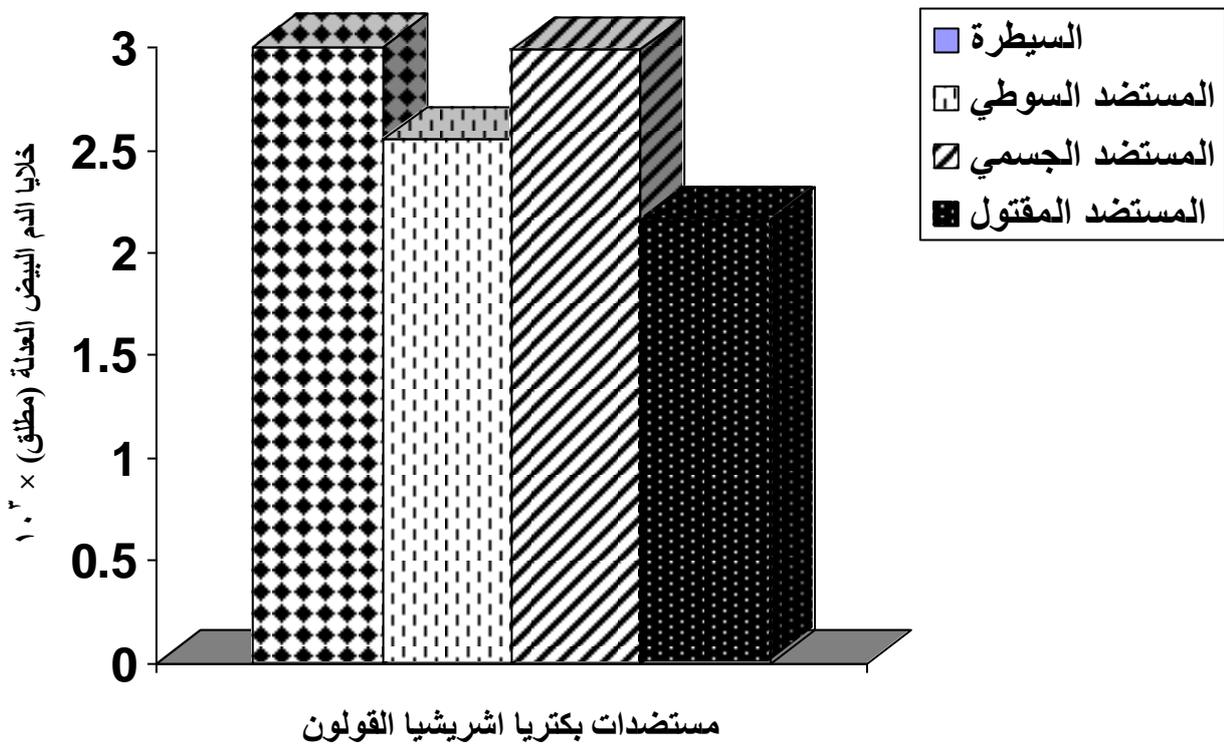
ذلك المتوسط في نموذج السيطرة  $3.11 (10^3 \times)$ ، وكما هو موضح في شكل (١-٤-٤).

ويبين الشكل (٢-٤-٤) والجدول (٤-٤) ان متوسط اعداد خلايا الدم البيض اللمفية Lymphocytes للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية كان  $1.14$  و  $1.25$  و  $1.65$  و  $1.14 (10^3 \times)$  على التوالي ، بينما كان ذلك المتوسط في نموذج السيطرة  $2.61$ . وكذلك يوضح الجدول (٤-٤) ان متوسط عدد الخلايا وحيدة النواة الدموية Monocytes قد بلغ  $0.015$  و  $0.04$  و  $0.02 (10^3 \times)$  للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي. بينما كان المتوسط في حيوانات السيطرة  $0.35 (10^3 \times)$  شكل (٣-٤-٤).

اما متوسط عدد خلايا الدم البيض الحمضة Eosinophils قد بلغ  $0.003$  و  $0.013$  و  $0.006 (10^3 \times)$  للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين بلغ ذلك المتوسط لحيوانات السيطرة  $0.098 (10^3 \times)$  وكما هو موضح في الجدول (٤-٤) والشكل (٤-٤).

هنا جدول بالعرض

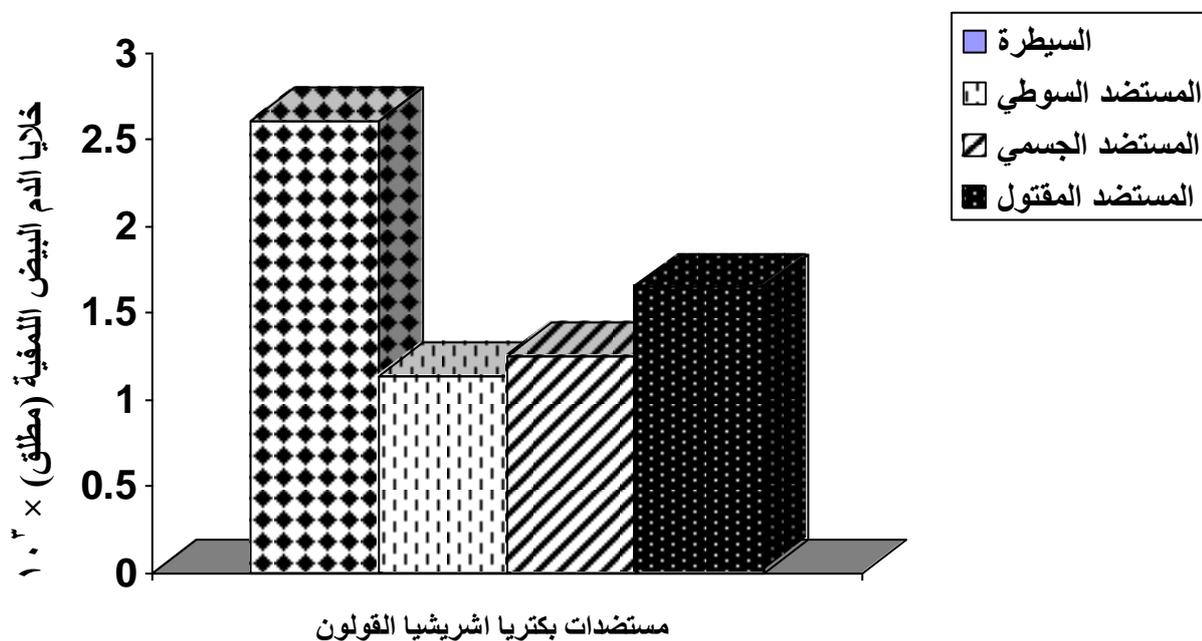
شكل (٤-٤-١) مستويات خلايا الدم البيض العدلة Neutrophils في الارانب الممنعة بانواع



مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

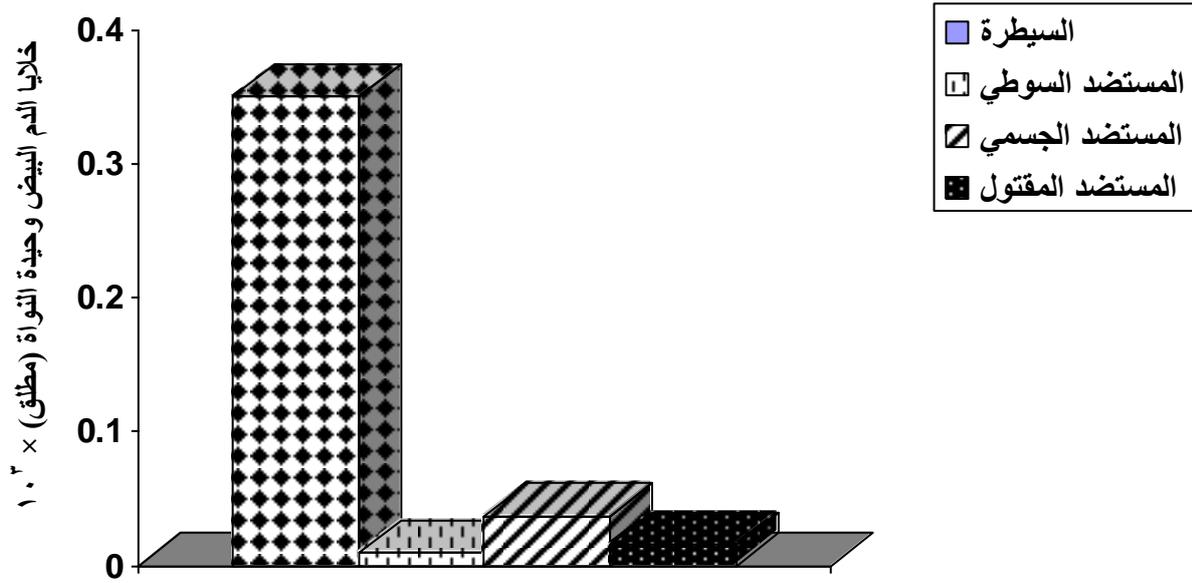
٤-١-٢-٢: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض العدلة واثرها في الاستجابة المناعية الخلوية. جرى احتساب معدلات العد التفرقي لخلايا الدم البيض العدلة Neutrophils لحيوانات التجربة الممنعة بأنواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات وقورنت مع نموذج السيطرة. حيث دلت نتائج التمنيع ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S لتمنيع المستضد المقتول مقارنة مع المستضد الجسمي والمستضد السوطي، كما نلاحظ ان هنالك فرق غير معنوي  $(P > 0.05)$  N.S لنتائج التمنيع لكل انواع مستضدات بكتريا اشريشيا القولون مقارنة مع نموذج السيطرة.

شكل (٤-٤-٢) مستويات خلايا الدم البيض اللمفية Lymphocytes في الارانب الممنعة بانواع



مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٢-١-٢: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض اللمفية واثرها في الاستجابة المناعية الخلوية. جرى احتساب معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيض اللمفية Lymphocytes لحيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون ولكل حالة على حده، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات وتمت مقارنتها مع نموذج السيطرة. حيث اظهرت نتائج التمنيح بتلك المستضدات ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S في العد التفريقي لخلايا الدم اللمفية لتمنيح المستضد المقتول مقارنة مع المستضد السوطي ونموذج السيطرة، كما نلاحظ ان هنالك فرق غير معنوي  $P > 0.05$  N.S لنتائج تمنيح المستضد المقتول مقارنة مع المستضد الجسمي. كما دلت النتائج فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S لتمنيح المستضد الجسمي مقارنة مع المستضد السوطي وكذلك الحال بالمقارنة مع نموذج السيطرة.

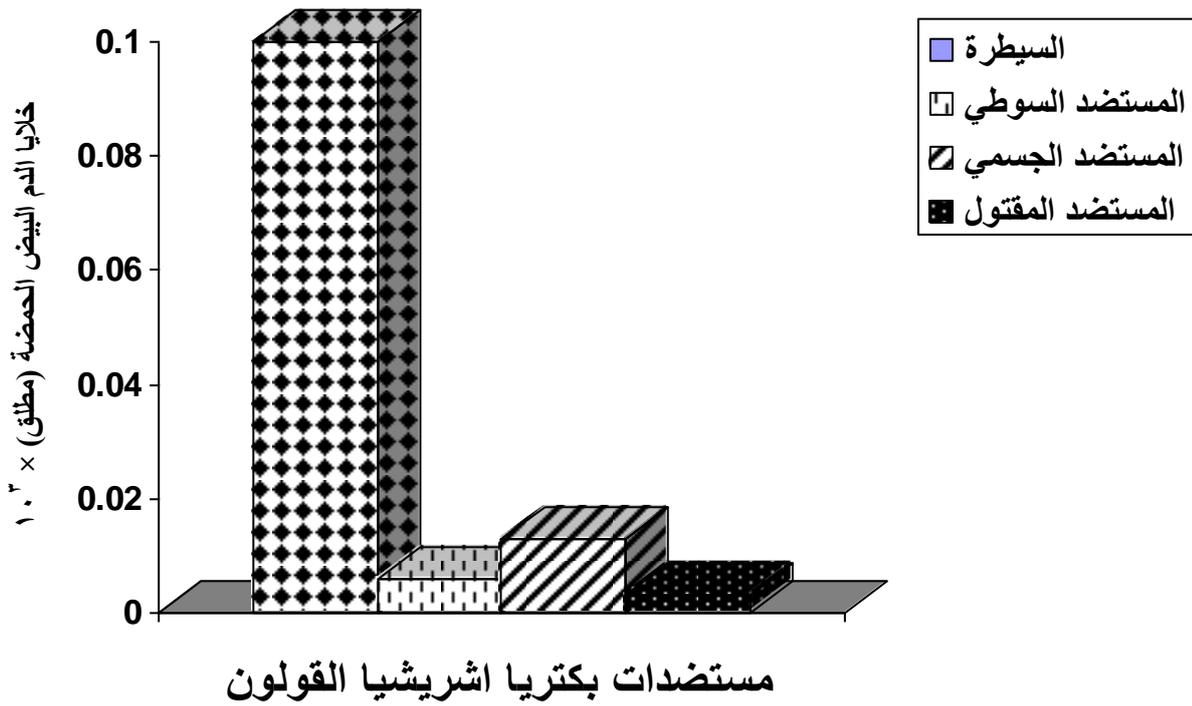


### مستضدات بكتريا اشريشيا القولون

شكل (٤-٤-٣) مستويات خلايا الدم البيض وحيدة النواة Monocytes في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٣-١-٣: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض وحيدة النواة Monocytes واثرها في الاستجابة المناعية الخلوية.

بعد انتهاء فترة التمنيع بالمستضدات واخذ عينات دم من حيوانات التجربة تم حساب معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيض وحيدة النواة Monocytes في الحيوانات الممنعة بمستضدات بكتريا اشريشيا القولون، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لكل انواع مستضدات هذه البكتريا ومقارنتها مع نموذج السيطرة. حيث دلت نتائج التمنيع بهذه المستضدات ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S في العد التفريقي لخلايا الدم البيض وحيدة النواة في الحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي ونموذج السيطرة. وكذلك هو الحال للحيوانات الممنعة بالمستضدات الجسمية والسوطية بالمقارنة مع نموذج السيطرة. في حين كان هنالك فرق غير معنوي  $P > 0.05$  N.S بين الحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد السوطي وكذلك هو الحال بالنسبة للارانب الممنعة بالمستضد الجسمي بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد السوطي.



شكل (٤-٤-٤) مستويات خلايا الدم البيض الحمضة Eosinophils في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٤-١-٤: التقويم الاحصائي للعد التفريقي لخلايا الدم البيض الحمضة Eosinophil وأثرها في الاستجابة المناعية الخلوية.

بعد انتهاء فترة التمنيع واخذ عينات دم من حيوانات التجربة تم حساب معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيض الحمضة في الحيوانات الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات ومقارنتها مع نموذج السيطرة. وتبين من نتائج التمنيع ان هنالك فرق معنوي  $P < 0.01$  S. في العد التفريقي لخلايا الدم البيض الحمضة في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية بالمقارنة مع نموذج السيطرة.

كما اظهرت النتائج وجود فرق غير معنوي  $P > 0.05$  N.S في الحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي.

٤-٢: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في الاستجابة المناعية الخلوية  
٤-٢-١: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز البروتين الكلي وأثره في الاستجابة المناعية الخلوية

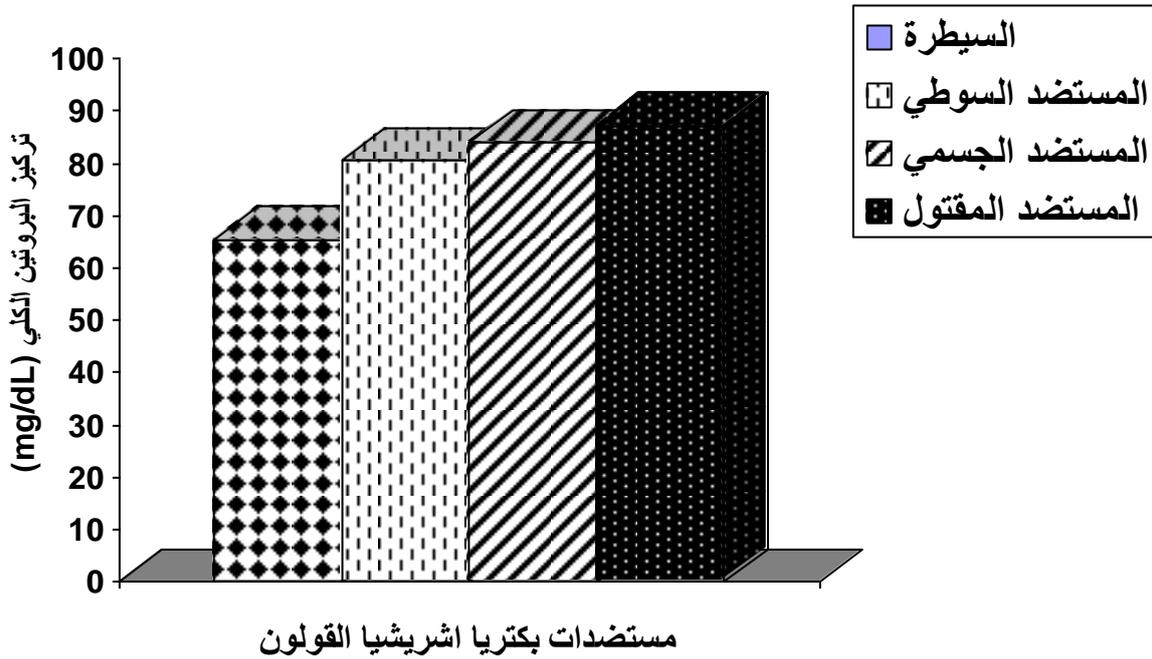
بعد انتهاء فترة التمنيع جرى اخذ عينات دم من حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون واستحصلت الامصال بعد ذلك تم قياس تركيز البروتين الكلي (mg/dL) لكل الارانب الممنعة بمستضدات تلك البكتريا وكذلك ارانب السيطرة. حيث بلغ متوسط تركيز البروتين الكلي ٨٧.٣ و ٨٣.٩ و ٨٠.٦٩ mg/dL للارانب الممنعة بالمستضدات

المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين كان متوسط التركيز في نموذج السيطرة ٦٥.٥ mg/dL. وكما هو موضح في الجدول (٥-٤) والشكل (٥-٤).

جدول (٥-٤) تراكيز البروتين الكلي (mg/dL) في مصل الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sig n.	P.V		الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
N.S	٠.٠٦	١ & ٢	٠.٤٨	٠.٩٨	٨٧.٣	السيطرة control
H.S	٠.٠٠٩	١ & ٣				
H.S	٠.٠٠١	١ & ٤	١.٢١	٢.٧١	٨٣.٩	المستضد السوطي Flagellar Ag.
N.S	٠.٢٣	٢ & ٣	١.٤٧	٣.٣	٨٠.٦	المستضد الجسيمي Somatic Ag.
H.S	٠.٠٠٥	٢ & ٤				
H.S	٠.٠١١	٣ & ٤	٢.٢٩	٥.٢	٦٥.٥١	المستضد المقتول Killed Ag.

شكل (٤-٥) مستويات تراكيز البروتين الكلي (mg/dL) في مصل الارانب الممنعة بانواع



مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-١-٢-٢: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز البروتين الكلي واثره في الاستجابة المناعية الخلطية

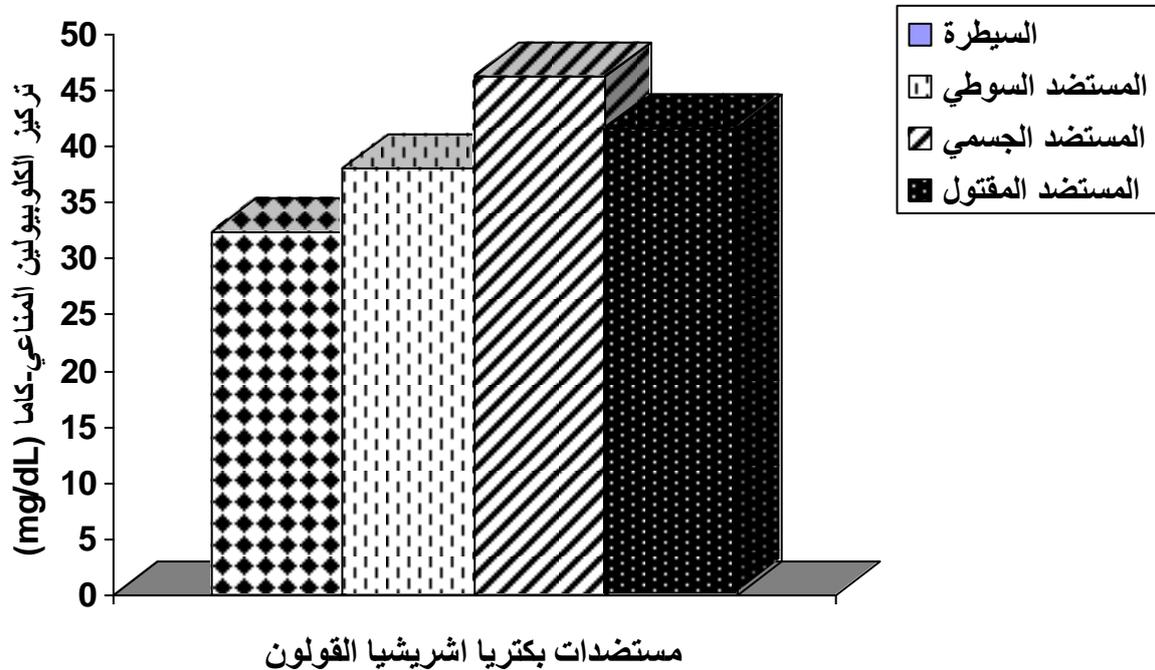
جرى احتساب معدلات تراكيز البروتين الكلي في امصال حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده واثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وتم احتساب الخطأ المعياري لكل انواع تلك المستضدات لكل حالة على حده. بعد ذلك قورنت المعدلات والخطأ المعياري لكل انواع تلك المستضدات مع نموذج السيطرة. حيث اظهرت نتائج التمنيع ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S في تركيز البروتين الكلي بين كل الحيوانات الممنعة بالمقارنة مع حيوانات السيطرة، كما يلاحظ ان هنالك فرق غير معنوي  $P > 0.05$  N.S في تركيز البروتين الكلي للارانب الممنعة بالمستضد المقتول مقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي. وكذلك الحال بالنسبة لتلك الممنعة بالمستضد الجسمي بالمقارنة مع الممنعة بالمستضد السوطي.

٤-٢-٢: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما واثره في الاستجابة المناعية الخلطية

جرى الحصول على الامصال من الحيوانات الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون وقياس تركيز الكلوبولين المناعي-كاما mg/dL لكل من امصال حيوانات التجربة الممنعة بتلك المستضدات وكذلك في امصال حيوانات السيطرة، اذ بلغ متوسط تركيز الكلوبولين المناعي-كاما للارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٤١.٧ و ٤٦.٢ و ٣٨.١ mg/dL على التوالي، في حين كان ذلك المتوسط في ارانب السيطرة ٣٢.٤١ mg/dL. وكما هو موضح في الجدول (٤-٦) والشكل (٤-٦).

جدول (٤-٦) تراكيز الكلوبولين المناعي-كاما (mg/dL) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sig n.	P.V		الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
N.S	٠.١٠٨	١ & ٢	١.٩٢	٤.٢٩	٤١.٧	السيطرة control
S.	٠.٠٢٩	١ & ٣				
S.	٠.٠٢٨	١ & ٤	٠.٨٥	١.٩١	٤٦.٨	المستضد السوطي Flagellar Ag.
H.S	٠.٠٠٤	٢ & ٣	٠.٩٥	٢.١٣	٣٨.١	المستضد الجسمي Somatic Ag.
H.S	٠.٠٠٠١	٢ & ٤				
N.S	٠.٢٩٤	٣ & ٤	٠.٥٩	١.٣٢	٣٢.٤١	المستضد المقتول Killed Ag.



شكل (٤-٦) مستويات تراكيز الكلوبولين المناعي-كاما (mg/dL) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٢-٢: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما

جرى احتساب معدلات تركيز الكلوبولين المناعي-كاما في امصال حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات وقورنت مع نموذج السيطرة. اذ اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرق غير معنوي  $P < 0.05$  N.S في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما mg/dL لنتائج التمنيح بالمستضد المقتول مقارنة مع نتيجة التمنيح بالمستضد الجسمي. كما تبين ان هنالك فرق معنوي  $P > 0.05$  S. لنتائج التمنيح بالمستضد السوطي مقارنة مع نموذج السيطرة. كما لوحظ ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S لنتائج التمنيح بالمستضد الجسمي مقارنة مع التمنيح بالمستضد السوطي وكذلك الحال عند مقارنته مع نموذج السيطرة.

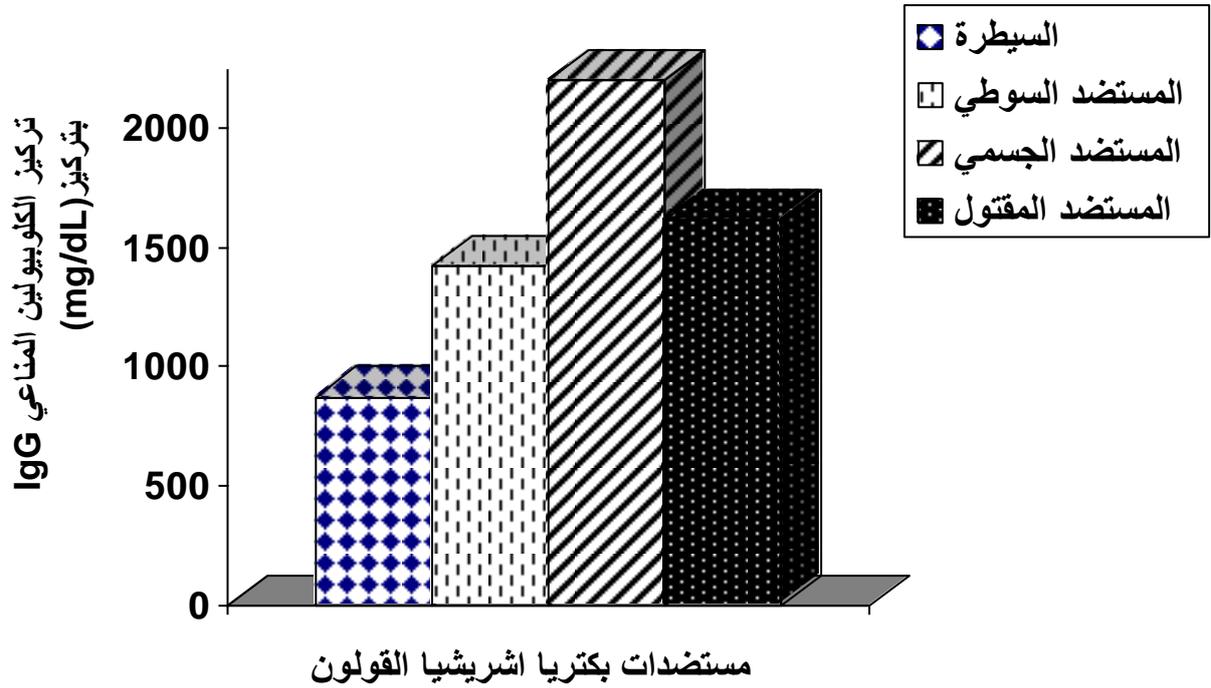
٤-٢-٣: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي IgG  
تم تقدير مستوى الكلوبولين المناعي IgG في امصال حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون وكذلك حيوانات السيطرة بواسطة طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد. اذ بلغ متوسط الكلوبولين المناعي IgG mg/dL في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ١٦١٥.٩ و ٢٢٠٣ و ١٤٢٢ mg/dL على التوالي، بينما بلغ المتوسط في نموذج السيطرة ٨٤٧ mg/dL. وكما هو موضح في الجدول (٤-٧) والشكل (٤-٧).

جدول (٤-٧) تركيز الكلوبولين المناعي IgG (mg/dL) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sign.	P.V		الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
H.S	٠.٠٠٥	١ & ٢	١٥٢.٧	٣٠٥	١٦١٥.٩	السيطرة control
N.S.	٠.٠٨٦	١ & ٣				
H.S.	٠.٠٠٠١	١ & ٤	٧٩.٧	١٥٧.٦	٢٢٠.٣	المستضد السوطي Flagellar Ag.
H.S	٠.٠٠٠١	٢ & ٣	٧٧.٥	١٥٩	١٤٢٢	المستضد الجسمي Somatic Ag.
H.S	٠.٠٠٠١	٢ & ٤				

H.S	٠.٠٠٠٠١	٣ & ٤	٠.٢٢	١٥٥	٨٤٧	المستضد المقتول Killed Ag.
-----	---------	-------	------	-----	-----	-------------------------------

شكل (٧-٤) مستويات تركيز الكلوبولين المناعي IgG (mg/dL) المتخصص في الارانب



الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

١-٣-٢-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي IgG.

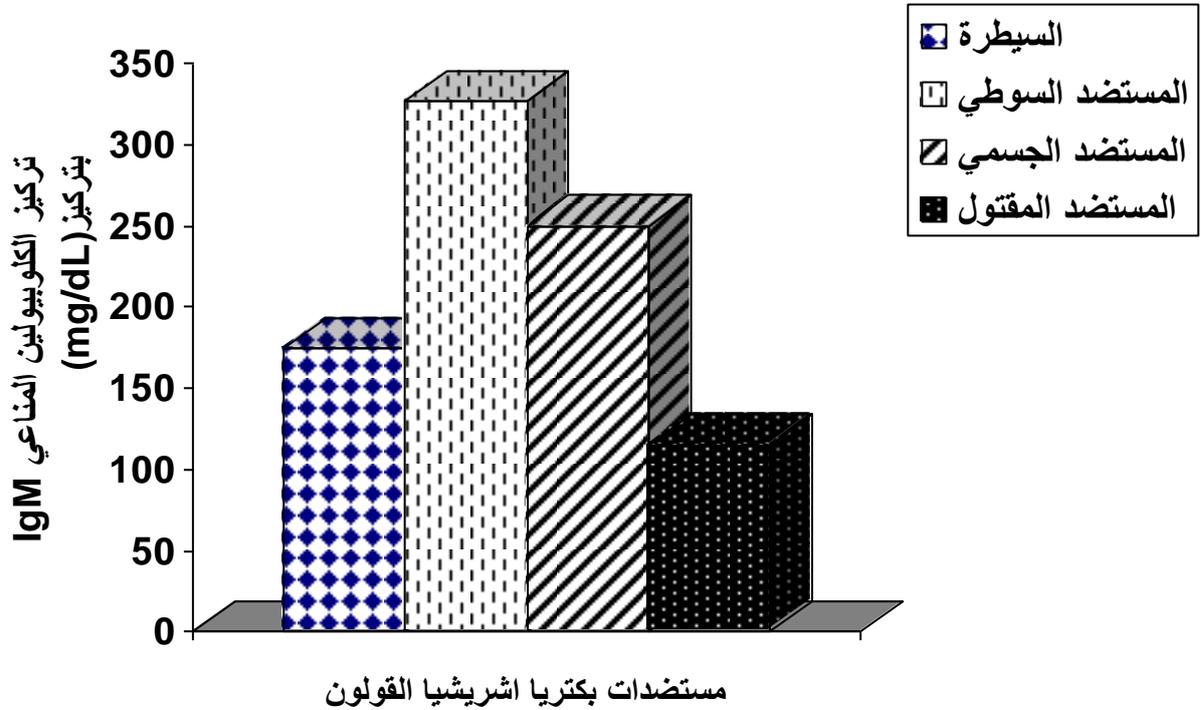
جرى احتساب معدلات تركيز الكلوبولين المناعي IgG في امصال حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات تلك البكتريا كل على حده وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات وقورن مع نموذج السيطرة. اذ اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S في تركيز الكلوبولين المناعي IgG mg/dL في الارانب الممنعة بالمستضد المقتول مقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي ونموذج السيطرة. وكذلك الحال بالنسبة لنتائج التمنيح بالمستضد الجسمي بالمقارنة مع التمنيح بالمستضد السوطي ونموذج السيطرة. كما نلاحظ ان هنالك فرق غير معنوي N.S عند التمنيح بالمستضد المقتول مقارنة مع التمنيح بالمستضد السوطي.  $P > 0.05$

٤-٢-٤: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبيولين المناعي IgM  
تم قياس مستوى الكلوبيولين المناعي IgM في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة  
من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون وارانب السيطرة بوساطة طريقة الانتشار المناعي  
الشعاعي المنفرد. اذ بلغ متوسط التركيز في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية  
والسوطية ١٧٤.٤ و ٣٢٦.٩ و ٢٤٩.٨ mg/dL على التوالي، بينما بلغ المتوسط في نموذج  
السيطرة ١١٤.٦ mg/dL. وكما هو موضح في الجدول (٨-٤) والشكل (٨-٤).

جدول (٨-٤) تركيز الكلوبيولين المناعي IgM (mg/dL) المتخصص في الارانب الممنعة  
بأنواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sign .	P.V	Maximum	Minimum	الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
H.S	٠٠٠ ٠٠١	١٤٠.٢	٨٢.٦	١٠.١	٢٢.٤	١١٤.٦	السيطرة control
		٢٨٠	٢١٧	١٢.٥	٢٨.١	٢٤٩.٨	المستضد السوطي Flagellar Ag.
		٣٦٨.١	٢٨٨	١٦	٣٥.٧	٣٢٦.٩	المستضد الجسمي Somatic Ag.
		٢٠٢.٢	١٤٧	١٠.٣	٢٣.٢	١٧٤.٤	المستضد المقتول Killed Ag.

شكل (٤-٨) مستويات تركيز الكلوبولين المناعي IgM (mg/dL) المتخصص في الارانب



الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٢-٤-٢: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي IgM.

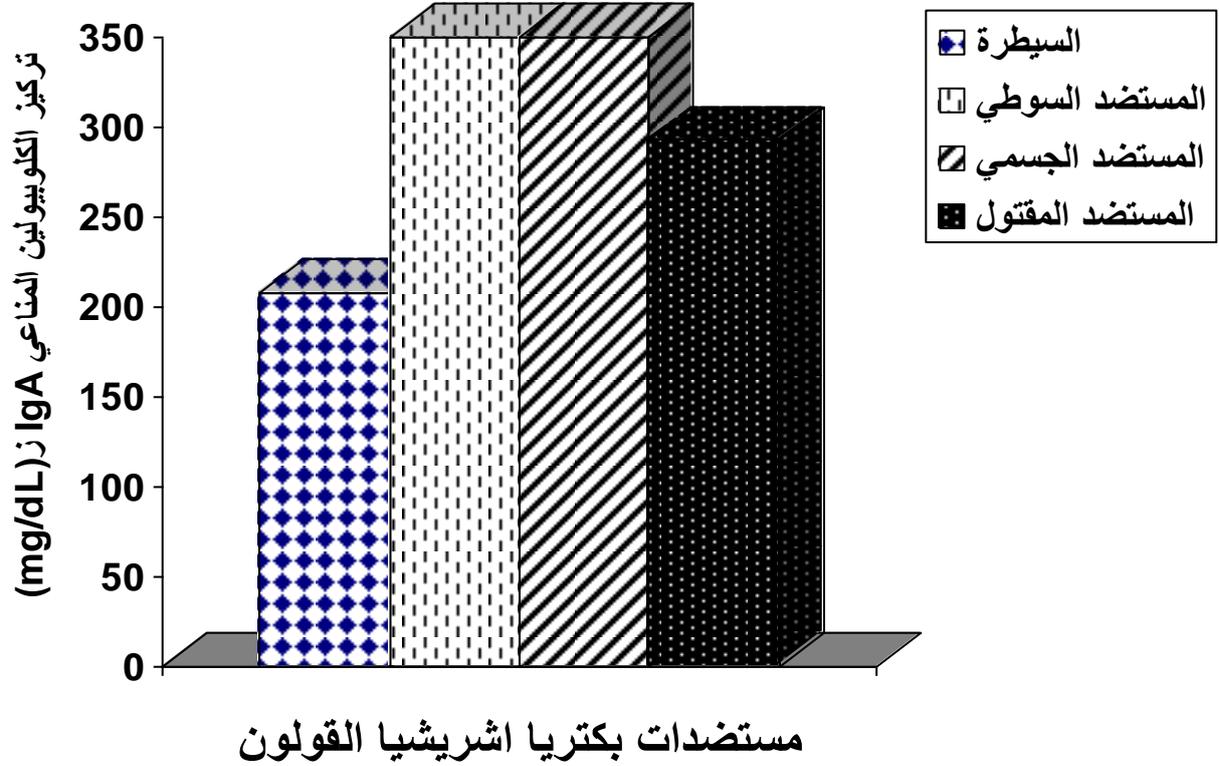
جرى احتساب معدلات تركيز الكلوبولين المناعي IgM في امصال حيوانات التجربة الممنعة بأنواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري وقورن مع نموذج السيطرة. اذ اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S في تركيز الكلوبولين المناعي IgM mg/dL بين الارانب الممنعة بالمستضدات المختلفة لبكتريا اشريشيا القولون بالمقارنة مع حيوانات السيطرة.

٤-٢-٥: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي IgA تم قياس اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي IgA لجميع امصال حيوانات التجربة وكذلك امصال نموذج التجربة. اذ بلغ متوسط الكلوبولين المناعي IgA للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٢٢٢.٧ و ٥٧٧.٥ و ٤٢٣.٤ mg/dL على التوالي، في حين بلغ المتوسط في نموذج السيطرة ٢٠٧.٨ mg/dL. وكما هو موضح في الجدول (٤-٩) والشكل (٤-٩).

جدول (٩-٤) تركيز الكلوبولين المناعي IgA (mg/dL) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sign.	P.V	Maximum	Minimum	الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
H.S	٠.٠٠٠ ١	٢٥٣.١	١٦١.٩	١٧.٤	٣٩.١	٢٠٧.٨	السيطرة control
		٢٦٣.٦	٣٧٠.٩	١٦.٢	٣٦.٢	٤٢٣.٤	المستضد السوطي Flagellar Ag.
		٦٢٦.٥	٥٢٠.٤	١٩.٤	٤٣.٤	٥٧٧.٥	المستضد الجسمي Somatic Ag.
		٣٥٨.٣	٢٢١.٢	٢٤.٤	٥٤.٦	٢٩٢.٧	المستضد المقتول Killed Ag.

شكل (٩-٤) مستويات تركيز الكلوبولين المناعي IgA (mg/dL) المتخصص في مصول



الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٣-٥-٢-٤: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز الكلوبولين المناعي IgA.

جرى احتساب معدلات تركيز الكلوبولين المناعي IgA في امصال حيوانات التجربة كل على حده وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لكل انواع تلك المستضدات وقورنت مع نموذج السيطرة. اذ دلت نتائج التمنيح بهذه المستضدات ان هنالك فرق عالي المعنوية  $H.S P < 0.01$  في تركيز الكلوبولين المناعي IgA mg/dL بين امصال ارانب التجربة بالمقارنة مع حيوانات السيطرة.

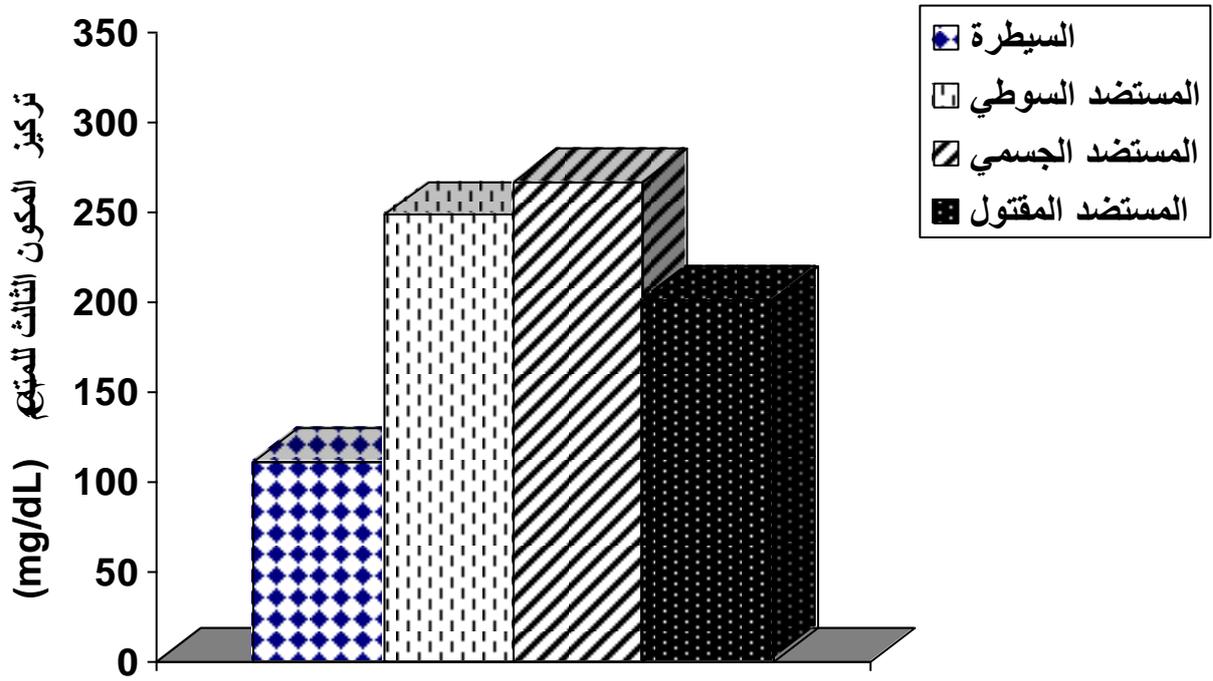
٤-٢-٦: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز المكون الثالث للمتمم (C<sub>٣</sub>)  
 جرى قياس مستوى تركيز المكون الثالث للمتمم Complement C<sub>٣</sub> في امصال  
 حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده  
 بوساطة طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد ودراسة اثر هذه المستضدات في تركيز  
 المكون الثالث للمتمم mg/dL ومقارنته مع نموذج السيطرة. اذ بلغ متوسط التركيز في الارانب  
 الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسطحية ٢٠٠.٩ و ٢٦٦.٥ و ٢٤٨.٥ mg/dL على  
 التوالي، بينما بلغ المتوسط في نموذج السيطرة ١١٠.٩ mg/dL. وكما هو موضح في الجدول  
 (١٠-٤) والشكل (١٠-٤).

جدول (١٠-٤) تركيز المكون الثالث للمتمم (mg/dL) C<sub>٣</sub> المتخصص في مصول الارانب  
 الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sign.	P.V	Maximum	Minimum	الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
H.S	٠٠ ٠١	١٣٢.١	٨٨.٣	٨.٢١	١٨.٤	١١٠.٩	السيطرة control
		٢٧٥.٧	٢١٦.١	٨.٢١	٢٣.٩	٢٤٨.٥	المستضد السوطي Flagellar Ag.
		٢٩٩.٦	٢٣٠.٤	١٢.٧١	٢٨.٤	٢٦٦.٨	المستضد الجسيمي Somatic Ag.

		٢١٦.١	١٨١.٩	٥.٨٨	١٣.٢	٢٠٠.٩	المستضد المقتول Killed Ag.
--	--	-------	-------	------	------	-------	-------------------------------

شكل (٨-٤) مستويات تراكيز المكون الثالث للمتمم C<sub>٣</sub> (mg/dL) المتخصص في مصول



### مستضدات بكتريا اشريشيا القولون

الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٢-٦-٢: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز المكون الثالث للمتمم C<sub>٣</sub>.

جرى احتساب معدلات تركيز المكون الثالث للمتمم C<sub>٣</sub> في امصال حيوانات التجربة الممنعة بمستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري ومقارنته مع نموذج السيطرة. اذ اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S في قيمة المكون الثالث للمتمم بين الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية بالمقارنة مع نموذج السيطرة.

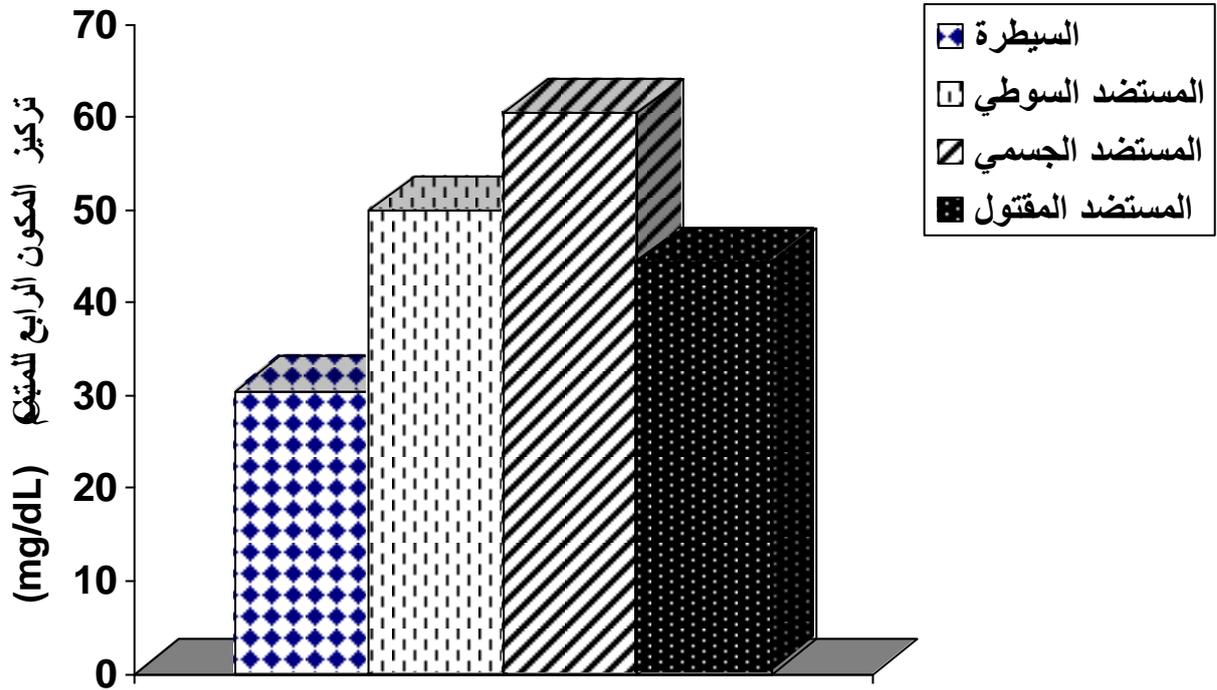
٤-٢-٧: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في تركيز المكون الرابع للمتمم (C<sub>٤</sub>)  
تم قياس مستوى تركيز المكون الرابع للمتمم Complement C<sub>٤</sub> لامصال حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون وكذلك امصال حيوانات السيطرة، اذ بلغ متوسط التركيز في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٤٤.٤ و ٦٠.٤ و ٤٩.٩ mg/dL على التوالي، في حين كان المتوسط في نموذج السيطرة ٣٠.٥ mg/dL. وكما هو موضح في الجدول (١١-٤) والشكل (١١-٤).

جدول (١١-٤) تركيز المكون الرابع للمتمم C<sub>٤</sub> (mg/dL) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sign.	P.V	Maximum	Minimum	الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
H.S	٠٠ ٠١	٣٧.٢	٢٤	٢.١٣	٤.٧٦	٣٠.٥	السيطرة control

		٥٧.٢	٤١	٢.٨١	٦.٣	٤٩.٩	المستضد السوطي Flagellar Ag.
		٦٨.١	٥٢.٥	٣.٠١	٦.٧٤	٦٠.٤	المستضد الجسمي Somatic Ag.
		٥٠.٩	٣٨.٧	٢.٤١	٥.٤٦	٤٤.٤	المستضد المقتول Killed Ag.

شكل (٤-١١) مستويات تراكيز المكون الرابع للمتمم C٤ (mg/dL) المتخصص في مصول



### مستضدات بكتريا اشريشيا القولون

الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٢-٥: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في مستوى تركيز المكون الرابع للمتمم C.

جرى احتساب معدلات تركيز المكون الرابع للمتمم Complement C في امصال الحيوانات الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون كل على حده وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري ومقارنته مع نموذج السيطرة. اذ اظهرت نتائج التمنيع ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S لتقدير المكون الرابع للمتمم (mg/dL) بين الارانب الممنعة بالمستضدات المختلفة لتلك البكتريا مقارنة مع نموذج السيطرة.

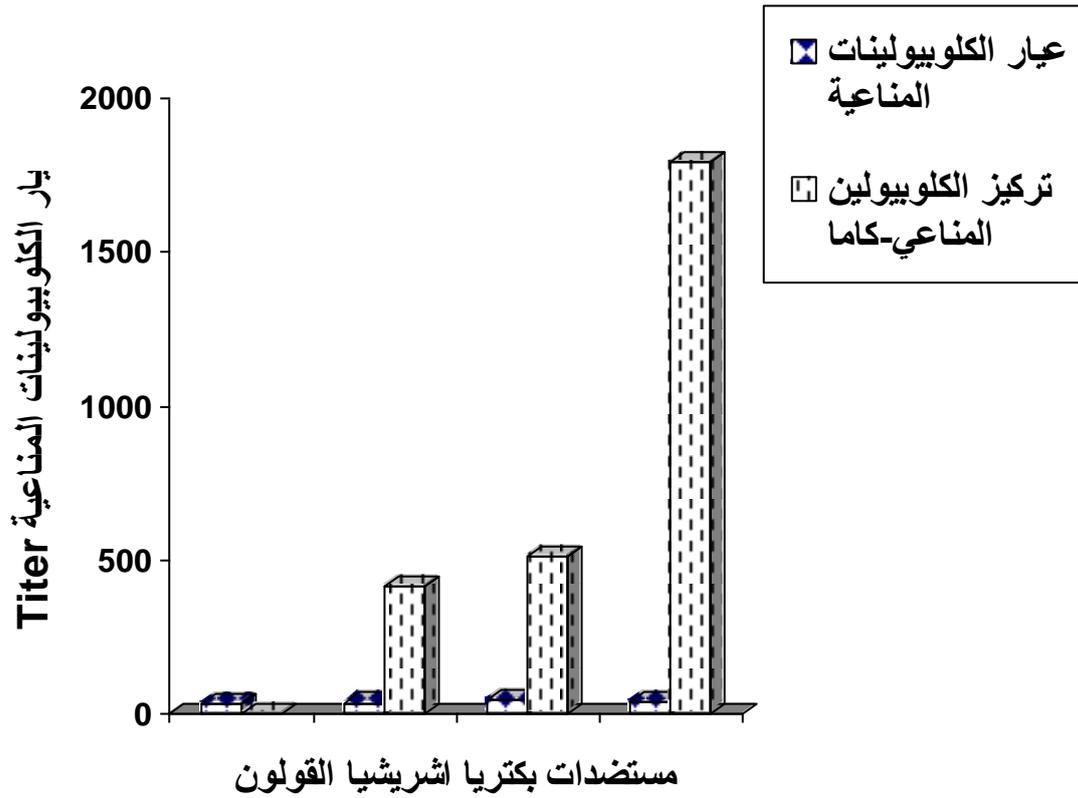
٤-٢-٨: اثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في عيار الضد وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية

بعد انتهاء فترة تمنيع الحيوانات جرى اخذ عينات دم واستحصلت الامصال منها وحدد مدى عيار الضد المتخصص لكل مستضد من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون، فكان متوسط العيارات في امصال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ١٧٢٢ و ٥١٢ و ٤١٦ على التوالي، بينما بلغ متوسط عيار الضد لنموذج السيطرة ٠ وقورنت عيارات الضد مع تراكيز الكلوبولين المناعي-كما المتخصصة بمستضدات هذه وكما هو موضح في جدول (٤-١٢).

جدول (٤-١٢) عيار الكلوبولينات المناعية وتركيز الكلوبولين المناعي-كما (mg/dL) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

Sign.	P.V	الخطأ المعياري S.E	الانحراف المعياري S.D	المتوسط Mean	نوع المستضد Antigen Types
-------	-----	-----------------------	-----------------------------	-----------------	------------------------------

		العيار Titer	التركيز mg/d L	العيار Titer	التركيز mg/d L	العيار Titer	التركيز mg /d L	
H.S	٠.٠ ٠.٥	٠	٠.٥٩	٠	١.٣ ٢	٠	٣٢ .٤ ١	السيطرة control
H.S	٠.٠ ٠.٣	٩٦	٠.٥٩	١.٣ ٢	٢.١ ٤	٤١ ٦	٣٨ .١	المستضد السوطي Flagellar Ag.
H.S	٠.٠ ١.٣	٧٨.٣	٠.٨٥	١٧٥ .٧	١.٩ ١	٥١ ٢	٤٦ .٢	المستضد الجسمي Somatic Ag.
H.S	٠.٠ ٠.٢	٣١٣. ٢	٢.٠٥	٧٠١	٤.٥ ٧	١٧ ٢٢	٤١ .٧	المستضد المقتول Killed Ag.



شكل (٤-١٢) مستويات عيار الكلوبوليونات المناعية وتركيز الكلوبولين المناعي-كاما المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون.

٤-٢-٨-٦: التقويم الاحصائي لأثر مستضدات بكتريا اشريشيا القولون في عيار الضد وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية.

جرى احتساب معدل عيارات الضد المتخصص بمستضدات بكتريا اشريشيا القولون بالنسبة لدوره في الاستجابة المناعية الخلطية الثانوية وكذلك احتساب الخطأ المعياري لكل حالة على حده، بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكل انواع مستضدات هذه البكتريا للمستضد المقتول- سيطرة، والمستضد الجسمي- سيطرة والمستضد السوطي-سيطرة. حيث اوضحت نتائج التمنيح ان هنالك فرق عالي المعنوية  $P < 0.01$  H.S بين تركيز الكلوبولين

المناعي- كما في الارانب الممنعة بالمستضد المقتول و عيارية التفاعل والشيء ذاته ينطبق على الارانب الممنعة بالمستضدات الجسمية والسوطية عند مقارنتها مع نماذج السيطرة.

٣-٤: التغيرات النسيجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون

اظهرت نتائج تمنيع الارانب بأنواع مختلفة من مستضدات بكتريا اشريشيا القولون ان هنالك تغيرات نسيجية متباينة في طحال الارانب الممنعة، حيث يوجد تباين في الاحتقان الدموي وتكاثر الخلايا الحويصلية وتغلغل الخلايا الالتهابية ووضوح المركز الانتاشي. اذ كان الاحتقان الدموي في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية شديداً، شديداً وضعيف على التوالي. كما نلاحظ ايضاً ان هنالك اختلاف في تكاثر الخلايا الحويصلية اذ كان متوسط، ضعيف ومتوسط في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي.

كما دلت النتائج على ان تغلغل الخلايا الالتهابية كان ضعيفاً، متوسطاً ومتوسطاً في طحال الارانب المحقونة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي. في حين كان هنالك وضوح شديد في المركز الانتاشي لكل حيوانات المعاملة وكما هو موضح في الجدول (٤-١٣).



## المصادر العربية

الزبيدي، طارق صالح. (١٩٨٤) علم المناعة والمصول. مطبعة دار السلام، بغداد.

السعد، مها رؤوف وطارق الزبيدي. (١٩٩١). علم المناعة. ص ١٢٨-١٣٠، الطبعة الثانية.

## المصادر الاجنبية:

Abdel-Hamid, A.M. (١٩٩٦). Effect of low level of dietary aflatoxins on Baladi rabbits. Arch. Anim. Nutr., ٤٦: ٥٧٨-٥٨٣.

Albert, M.L.; B. Santer; N. Bhardwaj.(١٩٩٨). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class ١-restricted CTLs. Nature. ٣٩٢. ٨٦. [Medline].

Aldus, C.F; Van Amerongen, R.M.C.; Anens, M.W.; Peck, J.H. Wichers & G.M. Wyatt. (٢٠٠٣). Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*. J. Applied Microbiology, ٩٥: ٣٨٠-٣٨٩.

Alfons B. & Patrick, M. (٢٠٠١). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. Journal of Leukocyte Biology, ٧٠: ٨٤٩-٨٦٠.

Anderson, D.P. (١٩٩٢). Immunostimulants, adjuvants and Vaccine carriers in fish: application to agriculture, p: ٢٨١-٣٠٧.

Andra, B.S.; Klaus, B.; Harald, L.; Anthony, P.M.& Ulrich, S. (٢٠٠٠). Biological activities of lipopolysaccharide are determined by the shape of their lipid A portion. Eur. J. Biochem., ٢٦٧: ٢٠٠٨-٢٠١٣.

Andrew, J.S.; Macpherson, A.L.; Kathy, M.C.; Gregory, R.H.; Bernard, O.; Dermatt; Gordon, D. & Rolf, M.Z. (٢٠٠١). IgA production without  $\mu$  or S chain expression in developing B cells. Center for Molecular and Immunology, U.S.A , ٢: ٦٢٥-٦٣١.

Armando, N.; Jose, L.; Henze, M.A.; Garcia-de & Alejandro, C. (٢٠٠٣). Antibody responses to *Escherichia coli* O<sub>1٥٧</sub> and other lipopolysaccharides in healthy children and adults. Clinical and Diagnostic Lab. Immun., ١٠: ٧٩٧-٨٠١.

Arriaga, Y.L.; B.A., Harrille & L.A., Dreyfus. (١٩٩٥). Contribution of individual disulfide bonds to biological action of E. coli heat-stable enterotoxin B. Infect. Immun., ٦٣: ٤٧١٥-٤٧٢٠.

- Authors, F. (٢٠٠٢). Diarrheagenic *Escherichia coli* U.S. Food & Drug Administration. Bacteriogenic Analytical Manual online. ٨<sup>th</sup> ed. Revision A, ٢٠٠٢.
- Baack, J.S.; J.H., Gibbs; R.C., Pottes; T., Kardjito; T.M., Grange; E.S., Jawad & V.A., Spence. (١٩٩٠). Histometric studies on tissue-related phenotypic heterogeneity of murine B cells. *Develop. Immunol.*, ٦: ١٧٩-١٨٥.
- Baker, F.J. & R.E., Silverton. (١٩٨٥). Introduction to medical laboratory technology. ٦<sup>th</sup> ed., Academic press, London.
- Balaz's, M.; L., Grama & P., Balogh. (١٩٩٩). Detection of phenotypic heterogeneity within murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies. *HY BR: DOMA*, ١٨: ١٧٧-١٨٢.
- Balogh, P. & A. Kumanovics. (١٩٩٥). Tissue-associated phenotypic heterogeneity of peripheral B cells in mice. *Immunol.*, ٨٦: ٥٦٠-٥٦٧.
- Balogh, P.; A., Kumanovics & I., Juhasz. (١٩٩٨). Studies on tissue-related phenotypic heterogeneity of murine B cells. *Develop. Immunol.*, ٦: ١٧٩-١٨٥.
- Beck, J.S.; J.H., Gibbs; R. C. Pottes; T. Kardjito; T.M. Grange; E.S. Jawad & V.A. Spence. (١٩٩٠). Histometric studies on biopsies of tuberculin skin test showing evidence of ischaemia and necrosis. *J. Pathol.*, ١٥٩: ٣١٧٣٣٢.
- Benjamini, E.; Coico, R.; Sunshine, G. (٢٠٠٣). *Immunology*. ٥<sup>th</sup> ed. Wiley Liss.
- Berry, J.T.; M.P., Doyle & J.L., Schoeni. (١٩٨٥). Colonization of chickencecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Infect. Immun.*, ٦٩: ٣١٠-٣١٥.
- Biomagreb. (٢٠٠٢). Literature of radial immunodiffusion plate. Manufactured. Tunisia.
- Bishop, M.G.; Dben-Von Laufer, J.L.; Fody, E.P. & Thirty three contributors. (١٩٨٥). Clinical chemistry principles, produres and correlations. The Murray printing company, Philadelphia P: ١٨١-١٨٢.
- Black, E. (١٩٩٠). Epidemiology of travell's diarrhea & relative importance of various pathogens. *Rev. Infect. Dis.*, ١٢: ٥٧٣-٥٧٩. [Medline].
- Blanco, J.; Blanco, M.; Gonzalez, E.(١٩٩٣). Serotype and colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in various countries. *Eur. J. Epidemial*, ٩: ٤٨٩.
- Bopp, C.A.; Murray, P.R. & C., Desautels. (٢٠٠٣). *Escherichia, Shigella & Salmonella*. In: Manual of clinical microbiology. ٨<sup>th</sup> ed. ASM press.

- Bouvet, J.P. & Fischetti, V.A. (1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infection & Immunity*, 67: 2687-2691.
- Bradshaw, L.J. (1996). *Laboratory Immunology*. 2<sup>nd</sup> ed., Saunders college publishing, Washington, U.S.A.
- Brandtzaeg, P. & I.N., Farstad. (1999). The human mucosal B-cell system, mucosal immunology P.L. Ogra; W. Strober; J. Mastecky; J. R., McGhee; M.E., Lamm & Bienenstock, Academic press, Sandiego, CA, pp: 439-468.
- Brandzaeg, P.; Krajci, P.; Lamm, M.E. & Kaetzel, C.S. (1994). in *Handbook of mucosal Immunology* (ed. Ogra. P.L) 113-120 (Academic press, San Diego.).
- Broche, F. & Tellado, J.M. (2001). Defence mechanism of the peritoneal cavity. *Curropincrit Care*, 7: 105-16.
- Burrell, R. (1979). *Experimental immunology*. 5<sup>th</sup> ed., pp: 12-80. Buvgeess publishing company, USA.
- Camara, L.M.; Carbonare, S.B.; Silva, M.L.; Crneiro-Sampaio. (1994). Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to Hela cells by humans colostrums: detection of specific SIgA related to EPEC outer membrane proteins. *Internet Arch. Allergy Immunol.*, 103: 307-310.
- Carlin, N.I.; Lindberg, A.A.; Rock, K. & Bundle, D.R. (1984). The *Shigella flexneri*: O-Ag polysaccharide chain. Nature of the biological repeating unit. *Eur. J. Biochem.*, 139: 189-194.
- Catia, M. P.; Beatriz, E. C.; Maria, E. S.; Almeida & Beatriz A. C. (2001). Antibody response against *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin expressed as fusions to flagellin. *Society for General Microbiology*, 147: 861-867.
- Celik, I.; Stover, C.; Botto, M. (2001). Role of the classical pathway of complement activation in experimentally induced polymicrobial peritonitis. *Infect. Immun.*, 69: 7304-9.
- Chao, K.L. & L.A., Dreyfus. (1997). Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial of cells. *Infect. Immun.*, 65: 3209-3217.
- Chapman, P.A.; Siddons, C.A.; Wrigh, D. (1993). Cattle as a possible source of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidermiol infect* 111: 439.
- Charkrabarti, S. & Sinha, A.K. (1996). Antibody response to outer membrane protein in *Shigella dysenteriae* type 1 infection with special

- reference to appearance of Murine antibodies. Indian. J. Med. Res., 10: 142-27.
- Clark, W.R. (1983). The experimental foundation of modern immunology. 2<sup>nd</sup> ed., Academic press, John Wiley and Sons. U.S.A.
- Claus, N. & Robert, G. (2002). Complement's participation in acquired immunity. Journal of Leukocyte Biology, 72: 249-261.
- Clman, R. (1989). The role of plasma protease in septic shock. N. Engl. J. Med., 320: 1207-1209.
- Conlan, J.W.; R.J. North. (1992). Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *listeria monocytogenes*. *Francisella tularensis* & *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. Infect. Immune., 64: 5164.
- Cockerill, J.K., M.S. Wehner, E.J., Bolen, J.J., Sando, J, Linden, R.L. Guerrant & C.L. Sears. (1992). Regulation of intestine guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (Sta) and protein kinase C. Infect Immun., 60: 504-513.
- Dacie, J. V. & Lewis, S.M. (1984). Practical haematology. 6<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone, Edinburg.
- Dagg, J. & Lee, F. D. (1982). The blood and bone marrow. In Anderson, J. R. (ed.) Muir's textbook of pathology 9<sup>th</sup> ed., Edward Arnold publ., London.
- Dehaan, L; W.R. Verweij; I.K.; Feil; E. Agsterib Beund; J. Wilschut. (1998). Role of GM<sub>1</sub> binding in the mucosal immunogenicity & adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. Immunology, 94: 424-430.
- Demberg, T.B.; Pollok, KD.; Gerke; O. Gotze & Schlaf, G. (2002). Rat complement factor H: Molecular cloning, Sequencing & quantification with a newly established ELISA. Scand. J. Immunol., 56: 149-160.
- Dickinson, B.L. and J. D. Clements. (1990). Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity. Infect. Immune. 63: 1617-1623.
- Difco. (1984). Manual of dehydrated culture media and reagent for microbiology and clinical laboratory producers. 10<sup>th</sup> ed., Difco laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.
- Discipio, R.G. (1992). Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. J. Immunol., 149: 2092-9.
- Dodds, A.W.; Law, S.K.A. (1998). The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C<sub>r</sub>, C<sub>i</sub> and α<sub>2</sub>-macroglobulin. Immunol. Rev., 166: 10-26.

- Doyle, J; Evans, J. & Dolores, G-E. (١٩٩٦). *Escherichia coli* in Diarrheal disease. Medical Microbiology. Chap. ٢٥, p:١-٩.
- Dreyfus, L.A., B.M Hurville, D.E., Howard, R. Shaban, D.M., Beatty & S.J., Morris. (١٩٩٣). Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, ٩٠:٣٢٠٢-٣٢٠٦.
- Duff, G. (٢٠٠٣). Verotoxigenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures & slurries. Journal of Applied Microbiology, ٩٤: ٩٤ S-١٠٣ S.
- Dytoc, M.; Sone, R.; Cockerill, F. (١٩٩٣). Multiple determinants of verotoxin-producing *Escherichia coli* O١٥٧:H٧ attachment-effacement. Infect. Immun., ٦١: ٣٣٨٢.
- Eisenstein, B.I.; Azaleznik, D.F. (٢٠٠٠). Eenterobacteriaceae In: Mandel, Douglas & Bennett's principles and practice of infectious diseases, ٥<sup>th</sup> ed. Mandell, G.I.; Bennett, J.E.; Dolin, R. (editors). Churchill Livingstone.
- Erdei, A.; Fust, G.; Gergely, J. (١٩٩١). The role of C<sub>r</sub> in the immune response. Immunol. Today, ١٢: ٣٣٢-٧.
- Evans, D.J.& Evans, D.G. (١٩٩٠). Colonization factor antigens of human pathogens. Current Topics Microbiol. Immunol., ١٥١: ١٢٩.
- Fargeas, M.T.; V., Theodoru; J., More; J.M., Wal; J., Fioramonti & L., Bueno. (١٩٩٥). Boosted systemic and local responsiveness after intestinal inflammation in orally sensitized guinea pigs, Gastroenterology, ١٠٩: ٥٣-٦٢.
- Feng, P. & S.R. Monday. (٢٠٠٠). Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. Mol. Cell. Probes., ١٤: ٣٣٣-٣٣٧.
- Feresa, S. & H. Nyati. (١٩٩٠). Fate of pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains in two fermented milk products. J. Appl. Bacteriol., ٦٩: ٨١٤-٨٢١. [Medline].
- Fernando, G.B.; Eric, R.H.; David, N.T.; Galina, V. & Gregory, M.g. (٢٠٠٢). Safety and immunogenicity of a prototype enterotoxigenic EsVaccine administered. Infect. Immunol., ٧٠: ١٨٧٤-١٨٨٠.
- Firkin, I.; Chesterman, C.; Penington, D. & Rush, B. (١٩٨٩). Clinical haematology in medical practice. ٥<sup>th</sup> ed., Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Francis, D.H.; R.A., Moxley & C.Y. Andraos. (١٩٨٩). Edema disease-like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O١٥٧:H٧ infected Immunol., ٥٧: ١٣٣٩-١٣٤٢. [Medline].

- Fransilla, R.M.; Soderlund, C.S.; Brown, W.G.; M. Spaw & K., Hedman. (١٩٩٦). IgG subclass response to human parvovirus B١٩. *Infection Clin. Diagn. Virol.*, ٦: ٤١-٤٩.
- Frei, J.; C., Heuck; W., Riesen; I.T., Lang; P.G., Hill; M.N., El-Nagten & L., Poller. (١٩٩٥). Production of basic diagnostic laboratory reagents, WHO, regional publications, Eastern Mediterranean, Series.
- Fukuta, S., J.L., Magnani, E.M., Twiddy, R.K., Holmes & V. Ginsbury. (١٩٩٨). Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin Lth-I, LT-IIa, & LT-IIb. *Infect. Immun.*, ٥٦: ١٧٤٨-١٧٥٣.
- Gannong, W.F. (١٩٨٩). Review of medical physiology. ٤<sup>th</sup> ed., Middle East Edition, Beirut.
- Garvey, J.S.; N.E. Cremer & D.H. Sussdorf. (١٩٧٧). Methods in immunology. (٣<sup>rd</sup> ed.) pp: ٣٥٦-٣٥٩. W.A. Benjamin, Inc. Massachusetts.
- Giron, J.A.; Ho, A.; Schoolnik, G.K. (١٩٩١). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, ٢٥٤: ٧١٠.
- Glauser, M.; Zanetti, G.; Baumgartner, J. & Cohen, J. (١٩٩١). Septic shock pathogenesis. *Lancet.*, ٣٣٨: ٧٣٢-٧٣٦.
- Goldberger, G.; Bruns. G.A.P.; Ritz, M.; Edge, M.D.; Kuitakowaski, D.J. (١٩٨٧). Human complement factor I. Analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome ٤. *J. Biol. Chem.*, ٢٦٢: ١٠٠٦٥-٧١.
- Green, J.H. (١٩٨٥). Basic clinical physiology. ٣<sup>rd</sup> ed., Oxford university press. Oxford.
- Gregory, S.; A.J., Sagnimeni
- Griffin, P.M. & R.V. Tauxe. (١٩٩١). The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O١٥٧:H٧, other enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vibro. *Infect. Immune.*, ٦٦: ١٥٧٠-١٥٧٨.
- Guillobel, H.C.R.; M.G., Luna; E.F., Camacho; D.F., Almedia & L.C.S., Ferreira. (١٩٩٨). Immunization against the colonization factor antigen I of enterotoxigenic *Escherichia coli* by administration of a bivalent *Salmonella typhimertun* are A strain. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, ٣١: ٥٤٥-٥٥٤.
- Guo, H.; L., Feng; J., Tao; C. Zhang & L. Wang. (٢٠٠٤). Identification of *Escherichia coli* O١٧٢ O-antigen gene cluster and development of a serogroup-specific PCR assay. *Journal of Applied Microbiology*, ٩٧: ١٨١-١٩٠.

- Guth, B.E., E.M. Twiddy, L.R.M Trabulsi & R.K. Holmes. (1997). Variation in chemical properties and antigenic determinants among type ii heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 65: 529-536.
- Herbert, W.J. (1960). Multiple emulsions: A new from mineral-oil antigen adjuvant. Lancet., 2: 771-80.
- Hill, W.E.; K.C., Jinneman; P.A. Trost; J.L. Bryant; J. Bond & M.M. Wekell. (1993). Multiplex polymerase chain reaction detection of Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli* FDA LIB 3811.
- Holst, O.; Muller-Loennies, S.; Lindner, B. & Brade, H. (1993). Chemical structure of the lipid-A of *Escherichia coli* J-S. Eur. J. Biochem., 214: 690-701.
- Hourcade, D.; Holers, V.M.; Atkinson, J.P. (1989). The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. Adv. Immunol., 40: 381-416.
- Hughes, A.L. (1994). Phylogeny of the C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>/C<sub>5</sub> complement component gene family indicates that C<sub>5</sub> diverged first. Mol. Biol. Evol., 11: 417-20.
- Humason, G.L. (1972). Animal tissue techniques. 3<sup>th</sup> ed., pp. 1-8. W.H. Freeman & co., San Francisco, U.S.A.
- Huyashi, C.G.; T.Tobe; T. Han; G.K. Schoolnik; E. Ohtsubo & C. Sasakawa. (1999). Complete DNA sequences and structural of analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor. Infect. Immune., 67: 5400-5462.
- Hyde, R.M. (2000). Immunology., 4<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins publishing company, USA.
- Hyghey, C.T.; J.W., Brewer; A.D., Colosia; W.F., Ross & R.B., Corley. (1998). Production of IgM hexamers by normal and autoimmune B cells, implication for the physiologic role of hexameric IgM. J. Immunol., 161: 4091-4097. [Abst.]. /Free Full Text/.
- Hyoikrya, R.; Young, S., K.; Philippe, A.G. & Frederick, J. (2002). *Escherichia coli* strain RDEC-1 AF/R1 endogenous fimbrial glyconjugate receptor molecules in rabbit small intestine. Infection and Immunity, 69: 640-649.
- Itoh, Y.; Y. Sugita-Konishi; F. Kasuga; M. Iwaki; Y. Harva-Kuda; N. Saito; Y. Noguchi; H. Konuma & S. Kumagai. (1998). Enterohemorrhagic *E. coli* O<sup>157</sup>:H<sup>7</sup> present in radish sprouts. Appl. Environ. Microbiol., 64: 1032-1035.
- Jann, T. & Jann, B. (1984). Structure and biosynthesis of O-antigens. In: Riestchel, E. T. ed.; Proctor, R.A.; Sereies ed. Chemistry of endotoxin.

- Amsterdam, The Netherlands; Elsevier, ١٣٦-١٨٦. Handbook of Endotoxin, Vol. ١.
- Jawetz, M; Adelber, K.; Geo, F.; Brooks; Janet, S.; Butel & Stephen, A.M. (٢٠٠٤). Medical immunology, ٢٣ ed. International Edition. McGraw-Hill comp. Inc, USA.
- Jeanne, A.J. (٢٠٠٠). Comparison of a baculovirus-based VP<sub>r</sub> enzyme immunoassay (EIA) to an *Escherichia coli* based VPI ETA for detection of human parvovirus B<sub>19</sub> immunoglobulin M & immunoglobulin G in sera of pregnant women. Journal of Microbiology., ٣٨: ١٤٧٢-١٤٧٥.
- Johnson, T.R. (٢٠٠٠). *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads. Machiuvellium Masqueraders or Taxonomic. J. Med. Microbial., ٤٩: ٥٨٣-٥.
- Johnstone, A. & Thorpe, R. (١٩٨٢). Immunochemistry in practice, Black-Well Scientific publication, London.
- Jones, S.; Holmes, C.J.; Mackenzie, R. (٢٠٠٢). Continuous dialysis with bicarbonate/lactate-buffered peritoneal dialysis fluids result in long-term improvement in ex vivo peritoneal macrophage function. J. Ann. Soc. Nephrol, ١٣: S ٩٧-١٠٣.
- Jashua, F. & Fred, F. (١٩٩٧). Deficient serum bactericidal activity against *Escherichia coli* in patients with cirrhosis of the liver. Journal of Clinical Investigation, ٦٣: ٩١٢-٩٢١.
- Junqueira, L.C.; Cameiro, J. & Kelly, R.O. (١٩٩٢). Basic histology. ٦<sup>th</sup> ed., Prentice-Hall International Inc. U.S.A.
- Kagnoff, M.F. (١٩٩٤). Intestinal immunity, In: J.A., Stein; J.J., Hutton; P.O., Kholer; R.A. Rourke; H. Y., Reynolds; M.A., Samuels.; M.A., Sande; J.S., Trier & N.J., Zvaifler, Internal Medicine, ٤<sup>th</sup> ed., pp: ٣٥٩-٣٦١. mosby-Year Book, Inc.
- Kantle, N.U.; J., Zivng; M., Hakkinen; C.O., Elson & J., Mestecky. (١٩٩٩). Differential homing commitments of antigen-specific T-cells after oral or parenteral immunization in humans. J. Immunol., ١٦٢: ٥١٧٣-٥١٧٧.
- Kaper, J.B. & J. P. Natro. (١٩٩٨). Diarrheagenic *E. coli*. Clin. Microbiol. Rev., ١١: ١٣٢-٢٠١.
- Kuplan, B.S.; Trompeter, R.S.; Moake, J.L., eds.(١٩٩٢). Hemolytic-uremic syndrome & thrombotic thrombocytopenic purpura, NewYork: Marcel Dekker, Inc.
- Karmali, M.A. (١٩٨٩). Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., ٢: ١٥-٣٨.

- Kenneth, T. (٢٠٠٢). Immune defense against microbial pathogens. Todar's online textbook of bacteriology: University of Wisconsin-Madison. Dep. Bacteriology.
- Kim, J.M.; Y.-K. Oh; J.H. Lee; G.H., Lee; H. Son & I.-H. Choi. (٢٠٠٥). Induction of proinflammatory mediators requires activation of the TRAF, NIK & NF- $\kappa$ B signal transduction pathway in astrocytes infected with *Escherichia coli*. *Clinical & Experimental Immunology*, ١٤٠: ٤٥٠-٤٦٠.
- Klipstein, F.A.; Engert, R.F.; R.F. Clements, J.D. & Houghten, R.A. (١٩٨٣). Vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli* based on synthesis heat stable toxin cross-linked to the B-subunit of heat-labile toxin. *J. Infect. Dis.*, ١٤٧: ٣١٨-٣٢٦. [Medline].
- Kreber, A. (١٩٩٧). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods*, ٢٠١: ٣٥-٥٥.
- Kroese, F.G.M. et al. (١٩٩٩). Many of the IgA producing plasma cells in the murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int. Immunol.*, ١: ٧٥-٨٤.
- Kwapinski, J.B. (١٩٧٢). Methodology of immunochemical and immunological research. New York, London, John Wiley & Sons, Inc.
- Kwewabra, S. (١٩٧٥). Amino acid sequence of tuberculin active protein from *M. tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, ٢٥٠: ٢٥٦٣-٢٥٦٨.
- Kwok, C.; Korm, R.M.; Davis, M.E. (١٩٩٨). Characterization of whole genome radiation hybrid mapping resources for non-mammalian. *Vertebrates, Nucleic acids. Res.*, ٢٦: ٣٥٦٢-٦.
- Lancer, W.I., C. Constable, S., Moe, M.G., Jobling, H.M., Webb, S., Ruston, J.L., Madara, T.R., Hirst, R.K., Holmes. (١٩٩٥). Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin in polarized epithelia role of COOH-terminal KDEL, *J. cell Biol.*, ١٣١: ٩٥١-٩٦٢.
- Levine, M.M. (١٩٨٧). *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic & entero. Adherent. *J. Infect. Dis.*, ١٥٥: ٣٧٧-٣٨٩.
- Limin, Z.; Min, H.; Min, L.; Robert, B. & Olle, Stendahl. (٢٠٠٤). Pathogen-induced apoptotic neutrophils express heat shock proteins and elicit activation of human macrophages. *Journal of Immunology*, ١٧٣: ٦٣١٩-٦٣٢٦.
- Lin, C.K.; Tsen, H.-Y.; W.-R. Chi. (١٩٩٦). Use of novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of heat-labile toxin I, heat-stable toxin I and II enterotoxigenic *Escherichia coli* in milk. *J. Clin. Microbiol.*, ٥٩: ٧٩٥-٨٠٢.

- Lindberg, A.A.; Karnd, A. & Weintranb, A. (١٩٩١). The lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor. Rev. infect. Dis., ١٣(Suppl. ٤): S ٢٧٩-٨٤.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randal, B.J. (١٩٥١). Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., ١٩٣: ٢٦٥-٧٥.
- Lutz .C. (١٩٩٨). IgD can largely substitute for loss of IgM function in B-cells. Nature, ٣٩٣: ٧٩٧-٨٠١.
- Lydyard, P. & Gross, C. (١٩٩٨). Cells involved in the immune response. In: Roitt, I.; Brostoff, J. & Male, D. (Eds). Immunology ., ٥<sup>th</sup> ed., Mosby Inter. Ltd. London.
- Macfaddin, J. (٢٠٠٠). Biochemical test for identification of medical bacteria. ٣<sup>rd</sup>. Awolters Kluwer company. Baltimore.
- Mackenzie, R.K.; Topley, N.; Nenbauer, A.; Coles, G.A.; Williams, J.D. (١٩٩٧). Staphylococcal exoproducts down-regulate cytolooxygenase ١ and ٢ in peritoneal macrophages. J. Laboratory Clin. Med., ١٩٢: ٢٣-٣٤.
- Malin, M.; H. Suomalainen; M. Saxelin & E. Isolauri. (١٩٩٦). Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. Ann. Nutr. Metab., ٤٠: ١٣٧-١٤٥.
- Mancini, G.; Carbonaro, A.O.; Heremans, J.F. (١٩٦٥). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifusion. Immunochemistry, ٢:٢٣٥-٥٤.
- Manjarrez, H.A.; S., Gavilanes; Chavez, B.; A., Navarro, O. & A., Cravioto. (٢٠٠٠). Antigen detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* using secretory immunoglobulin A antibodies isolated from human breast milk. Infection & Immunity, ٦٨:٥٠٣٠-٥٠٣٦.
- Martinson, E.; Wieslander, A.; Kjellstrand, P.; Boberg, U. (١٩٩٢). Toxicity of heat sterilized peritoneal dialysis fluids is derived from degradation of glucose. As AIO J., ٣٨: M ٣٧٠-M ٣٧٢.
- Mc Queen, C.E.; E.C., Boedeker; M. Le; Y. Hamada & W. R. Brown. (١٩٩٢). Mucosal immune response to RDEC-١ infection: Study of lamina propria antibody-producing cells and biliary antibody. Infect. Immunol., ٦٠: ٢٠٦-٢١٢.
- Melamed, D.; Miri, E.; Leider, N. & Nemazee, D. (٢٠٠٠). Unexpected auto antibody production in membrane IgM deficient/Ipr mice. J. Immunol., ١٦٥: ٤٣٥٣-٤٣٥٨.
- Mezoff, A.G., R.A. Giannella, M.N. Eade & M.B. Cohen. (١٩٩٢). *Escherichia coli* enterotoxin (STa) binds to receptors, stimulates

- guanyl cyclase, and impairs absorption in rat colon. *Gastroenterology*, 102:816-822.
- Michinaga, O.; Kensuke, S.; Koji, N.; Masakeshi, T.; Hamabata, T.; Shinji, T. & Yoshifumi. (2001). Protective effect of *Lactobacillus casei* strain shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:111 infection in infant rabbits. *Infection & Immunity*, 69:1101-1108.
- Milissa, S.; Weisun, H.; Blake, P. & Lolis, E. (1998). Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor, *EMBO J.*, 17:3034-3041.
- Minta, J. O.; Wong, M.J.; Kozak, C.A.; Kunnath-Muglia, L.M.; Goldberger, G. (1996). cDNA cloning, sequencing and chromosomal assignment of the gene for mouse complement factor I (C<sub>1</sub> b/C<sub>1</sub> b; inactivator), Identification of a species-specific divergent segment in factor I. *Mol. Immunol.* 33: 101-112.
- Mortensen, R.F. & W., Zhong. (2000). Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *Journal of Leukocyte Biology*, V. 67, Issue 4: 490-500.
- Mueller-Loennies, S.; Zahringer, U.; Seydel, U.; Kusumoto, S.; Ulmer, A.J. & Rietschel, E.T. (1998). What we know and don't know about the chemical and physical structure of lipopolysaccharide in relation to biological activity. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 397: 51-72.
- Muriel, D.D.; Chris, L.C.; Sherie, K.D. & John, W.S. (2000). Pure lipopolysaccharide or synthetic lipid A induces activation of O<sub>2</sub> Ras in primary macrophage through a pathway dependent on Src family kinases and p<sup>13</sup>K. *Journal of Immunology*, 170: 8236-8241.
- Nairn, R. & Helbert, M. (2002). *Immunology for medical students*. Mosby.
- Nashor, T.O.; C.R., Stokes; P.J., Cripps & F.J., Bourne. (1988). The humoral immune response of mice to intramammary immunization with ovalbumine. *Immunol.*, 60: 319-321.
- Nataraj, C.; G.R., Huffman; R.J., Kurlander. (1998). H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>- restricted, listeri, monocytogenes-immune CD<sub>8</sub> T cells respond to multiple for mylated peptides and to a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. Immunol.* 10-7. [Abstract].
- Nzegwu, H.C. & R.J. Levin. (1994). Neurally maintained hypersecretion in undernourished rat intestine activated by *Escherichia coli* STa enterotoxin and cyclic nucleotides in vitro. *J. Physiol. (London)*, 479:109-119.

- Okamoto, K.; Okamoto, K.; Yukitake, J.; Kawamoto, Y. & Miyama, A. (۱۹۸۷). Substitution of cysteine residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by oligonucleotide-direct mutagenesis. *Infect Immun.*, ۵: ۲۱۲۱-۲۱۲۵.
- Paape, M.J.; A.J., Guidry; N.C., Jain & R.H., Miller. (۱۹۹۱). Leukocyte defense mechanisms in the udder. *Flemish. Vet. J.*, ۶۲: ۹۵-۱۰۹.
- Paeng, N.; Kido, N.; Schmidt, G. (۱۹۹۶). Augmented immunological activities of recombinant lipopolysaccharide possessing the mannose homopolymerase the O-specific polysaccharide. *Infect. Immunol.*, ۶۴: ۳۰۵-۳۰۹. [Abstract].
- Parslow, I.G.; Stites, D.P. & Terr, A.I. (۲۰۰۱). Basic and clinical immunology. Prentice-Hall International, Inc., London.
- Passwell, J.H.; Frier, S.; Shor, R.; Farzam, N.; Block, C.; Lison, M.; Shiff, E. & Ashkenazi, S. (۱۹۹۵). *Shigella* lipopolysaccharides antibodies in pediatric populations. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, ۱۱۱: ۸۵۹-۶۵.
- Paul, W.E. (editors): (۲۰۰۳). *Fundamental Immunology*. ۵<sup>th</sup> ed. Lippincott Ravein.
- Pell, J.M. & Aston, R. (۱۹۹۵). Principles of immunomodulation *J. Inf. Cen.*, ۴۲: ۱۲۳-۱۳۳, Elsevier Science Inc.
- Perdigon, G.; S., Alvarez; M., Rachid; G., Agüero & N., Gobbato. (۱۹۹۷). Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.*, ۷۸: ۱۵۹۷-۱۶۰۶. (Abstract/Free Full Text).
- Pickett, C.L.M E.M. Twiddy, C.Coker & R.K. Holmes. (۱۹۸۹). Cloning, nucleotide sequence & hybridization studies of the type II b. heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, ۱۷۱: ۴۹۴۵-۴۹۵۲.
- Play Fair J. HL & Chain BM. (۲۰۰۱). *Immunology at glance*. ۷<sup>th</sup> ed., Blackwell science, Iran.
- Pluschke, G.; G., Bordmann; M.E., Daoudaki; J.D., Lambris; M., Achtman & M., Neibert. (۱۹۸۹). Isolation of rat IgM to IgG hybridoma isotype switch variants and analysis of the efficiency of rat Ig in complement activation. *Eur. J. Immunol.*, ۱۹: ۱۳۱-۱۳۵. [Medline].
- Pritchard, D.F. (۱۹۹۵). Gastrointestinal nematodes; the Karkar experience. *P.N.G. Med. J.*, ۳۸: ۲۹۵-۲۹۹.
- Pugin, J.; Ulevitch, R.S. & Tobias, P.S. (۱۹۹۵). Mechanism of cellular activation by endotoxin. *Prog. Surg.*, ۲۰: ۸-۱۷.
- Rajka, E. & S. Korossy. (۱۹۷۶). Immunological aspects of allergy and allergic diseases, ۸: ۳۷-۴۷ Plenum press, Hungary.

- Randall, T.D.; L.B., King & R.B., Corley. (١٩٩٠). The biological effects of IgM hexamer formation. Eur. J. Immunol., ٢٠: ١٩٧١-١٩٧٩. [Medline].
- Reis, M.H. L.; Guth; B.E.C.; Gomes, T.A.T.; Murahorschi, J. & Trabulsi, L.R. (١٩٨٢). Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat-labile toxin or heat-stable toxin or both in children with and without diarrhea in Sao Paulo. J. Clin. Microbiol., ١٥: ١٠٦٢-١٠٦٤. [Medline].
- Remick, D. (١٩٩٥). Applied molecular biology of sepsis. J. Critcare, ١٠: ١٩٨-٢١٢.
- Reske, K. & Jann, K. (١٩٧٢). The OS antigen of *Escherichia coli* structure of the polysaccharide chain. Eur. J. Biochem., ٣١: ٣٢٠-٨.
- Richardson, S.E.; Karmali, M.A.; Becker, L.E. & Smith, C.R. (١٩٨٨). The histopathology of the hemolytic uremic syndrome (Hus) associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infections. Human pathology, ١٩: ١١٠٢-١١٠٨.
- Rietschel, E.T.; Brade, H.; Holst, O.; Brade, L.; Muller-Loennies, S.; Mamar, U.; Zahringer, U.; Beckmann, F.; Seydel, U.; Brandenburg, K.; Ulmer, A.J.; Heine, L.F. & Schumann, R.R. (١٩٩٦). Bacteriol endotoxin chemical constitution, biological recognition host response, and immunological detoxification. Curr. Top. Microbial. Immunol., ٢١٦: ٣٩-٨١.
- Roitt, I. & Rabason, A. (٢٠٠٠). Really essential Medical Immunology, Blackwell science Ltd.
- Roitt, I.; Brostoff, J. & Male, D. (٢٠٠١). Immunology. ٦<sup>th</sup> ed., Mosby, London.
- Roitt, I.; J. Brostoff and Male. (١٩٩٨). Immunology, ٥<sup>th</sup> ed., Mosby International, Ltd.
- Rowe, P.C.; Orrbine, E.; Wells, G.A. (١٩٩١). Epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Canadian children from ١٩٨٦ to ١٩٨٨. J. Pediatr., ١١٩: ٢١٨-٢٢٤.
- Rusch, V. (١٩٨٢). Report of a meeting on the immunity of mucose membranes. Scand J. Immunol., ١٥: ٥٣١-٥٤٥.
- Salyers, A.A. & Whitt, D.D. (٢٠٠٢). Bacterial pathogenesis, ٢<sup>nd</sup> ed. American Society for Microbiology.
- Samonte, I.E.; Sarto, A.; Mayer, W.E.; Shintani, S. & J. Klein. (٢٠٠٢). Linkage relationships of genes coding for  $\alpha 2$ -Macroglobulin C $\gamma$  & C $\epsilon$  in the zebrafish: Implication for the evolution of the complement & mbc systems. Scand. J. Immunol., ٥٦: ٣٤٤-٣٥٢.

- Sanchez, M. J.; Svennerholm, A.-M. & Holmgren, J. (1986). Immunoactive chimeric ST-LT enterotoxins of *Escherichia coli* generated by in vitro gene fusion. FEBS Lett 208: 194-198. [Medline].
- Savarino, S.J.A., McVeigh, J. Watson, J. Molina, A. Cravicto, P. Echeverria, M.K. Bhan, M.M. Levine & A. Fasano. (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 173: 1019-1022.
- Schneider, E.; Volecker, G.F. & Hsude, W. (1990). Age and sex dependence on phospholipids concentration in human erythrocyte. I. Z. Med. Lab. Diagn., 31: 86-89.
- Schoppet, M.H.; I., Huppertz. (2001). Differential stimulation of helper and cytotoxic T cells by dendritic cells after infection by *Yersinia enterocolitica* in vitro cells. Immunol., 280: 43. [Medline].
- Schromm, A.B.; Brandenburg, K.; Loppnow, H.; Zahringer, U.; Rietschel, E. T.; Carroll, S.F.; Koch, M.H.J.; Kusumoto, S. & Seydel, U. (1998). The charge of endotoxin molecules influences their conformation and interleukin-6 inducing capacity. J. Immunol., 161: 5474-5479.
- Sears, C.L. & J.B. Kaper. (1996). Enteric bacterial toxins mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol. Rev., 60: 167-210.
- Sebetti-Como, K.K.S.; Reagem, S.; Alaive, K.; Parrott, C.M.; Simonds, S.; Hrabowy. (1997). Outbreaks of *Escherichia coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> infection associated with eating alfalfa sprouts Michigan and Virginia , June-July 1997. morbid. Mort. Weekly. Rep., 46: 741-744.
- Seldenrijk, C.A.; H.A., Drexhage; S.G., Meumissen & S.T., Pals. (1989). Dendritic cells and scavenger macrophage in chronic inflammatory bowel disease Gut., 30: 484-491.
- Shibasaki, M.; Kawabata, Y; Yokochi, T; Nishida, A. & Tokada, H, E. (1999). Complement-dependent accumulation and degradation of platelets in the lung and liver induced following injection of lipopolysaccharides. Infect. Immun., 67: 5186-5191. (Abst.).
- Shnawa, I.M.S. and Thwaini, Q.N. (2000). Lapin mucosal humoral versus systemic humoral and cellular immune responses post to intratesticular administration of heat killed C. fetus. J. Baby. Univ. (In press).
- Sixma, T. K., K.H. Kalk, B.A. Van Zanten, Z. Dauter, J.Kingma, B. Witholt & W. G. Hol. (1993). Refined structure of *Escherichia coli*

- heat-labile enterotoxin, a close relative of Cholera toxin. J. Mol. Biol., ٢٣٠:٨٩٠-٩١٨.
- Smith, J. W.; W.L., Hand & J.P. Sanford. (١٩٨٢). Synthesis and secretion of local immunoglobulin by the intestinal tract of newborn rabbits. J. Infect. Dis., ١٢٤: ٤٩٤-٤٩٨.
- Soberg, M. (١٩٦٩). In vitro migration inhibition of peripheral blood leucocyte in delayed type hypersensitivity. Acta. Medica-Scand.
- Sottrup-Jensen, L. (١٩٨٧).  $\alpha_2$ -macroglobulin and related thiol ester plasma proteins. In: The plasma proteins; structure; function & genetic control. Putnam, FW, ed, Orlando, F.L. Academic press, ١٩٨٧, ١٩١-٢٩١.
- Spangler, B.D. (١٩٩٢). structure & function of Cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol. Rev., ٥٦:٦٢٢-٦٤٧.
- Springall, T.; Sheerin, N.S.; Abe, K.; Holers, V.M.; Wan, H.; Sacks, S.H. (٢٠٠١). Epithelial secretion of  $C_{\gamma}$  promotes colonization of the upper urinary tract by *E. coli*. Nat. Med., ٧: ٨٠١-٦.
- Stass, H.F. & F.A. Ennis. (١٩٩٩). IL-١ is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadministered with protein immunogens. J. Immunol., ١٦٢: ٦١٤١-٦١٤٧.
- Stephen, H.G. and Edward, J.W. (٢٠٠٢). Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. Journal of Leukocyte Biology, ٧٢: ٢٣٩-٢٤٨.
- Stevens, A. & Lowe, J.S. (١٩٩٧). Human histology. ٢<sup>nd</sup> ed., Mosby, Philadelphia.
- Stites, D.P.; Terr, A.I. & Parslow, T.G. (١٩٩٤). Basic and clinical immunology, ٨<sup>th</sup> ed., Prentice-Hall International, Inc., London.
- Stites, D.P.; Terr, A.I.; Parslow, T.G. & Imboden, J.B. (٢٠٠١). Basic and clinical immunology, Prentice-Hall International, Inc., London.
- Stone, K.D.; H.Z., Zhang; L.K., Carlson & M.S., Donnenberg. (١٩٩٦). A Cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for biogenesis of a type IV pilus. Mol. Microbiol., ٢٠:٢٢٥-٢٣٧. [Medline].
- Strober, W. & S.P., James. (١٩٩٤). The mucosal immune system, In D.P. Stites; A.I., Terr & T.G., Parslow. Basic and clinical immunology, pp: ٥٤١-٥٥٥. Prentice Hall International Inc, London.
- Stukus, E.P. (١٩٩٧). Inver stigating microbiology. A laboratory manual for General Microbiology company. U.S.A.
- Sultmann, H.; Sato, A.; Murray, B.W. (٢٠٠٠). Conservation of major histocompatibility complex class III region synteny between zebrafish

- & human as determined by radiation hybrid mapping. J. Immunol., 160: 6984-93.
- Suseelan, K.N.; Bhatia, C.R. & Mita, R. (1997 a). Characteristics of two major lectins form *Mung bean* (*Vigna radiata*) seeds. Plant Food Human Nutr., 50: 211-222.
- Suseelan, K.N.; Bhatia, C.R. & Mita, R. (1997 b). Purification and characterization of two major lectins form *Vigna mungo* (Black gram). J. Biosci., 2: 439-450.
- Sven Muller, L.; Ottoholst, Buko, L. & Helmut Brade. (1999). Isolation and structural analysis of phosphorylated oligosaccharides obtained from *Escherichia coli*. J. Lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem., 260: 235-249.
- Talib, V.H. & Khurana, S.R. (1996). A hand book of medical laboratory technology. 0<sup>th</sup> ed., C.B.S. publ., New Delhi.
- Talib, V.H. (1996). A Hand book of medical laboratory technology. 1<sup>st</sup> ed., WHO, India.
- Tana, S.W.; E. Isogai & K. Oguma. (2002). Induction of intestinal IgA & IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to caco-2 cells by oral immunization with liposomes. Letters in Applied Microbiology, 36: 130-139.
- Tang, S.; J.C. Leung; L.Y. Chan; L.W. Tsang & S.H. Sacks. (2004). Regulation of complement C<sub>r</sub> & C<sub>s</sub> synthesis in human peritoneal mesothelial cells by peritoneal dialysis fluid. Clin. Exp. Immunol., 136: 80-94.
- Taniguchi, T., Y., Fujino, K. Yamamoto, T., Miwatani & T. Honda. (1990). Evidence that the N-terminal amino acid sequence of pilus colonization factor antigen III produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli* is similar to that of TCPA pilin of Vibrio cholerae. J. Infect. Dis., 170: 1049-1050.
- Tenbergen, S.T., R. Hirst, J. Angstrom & K.A. Karlsson. (1994). Comparison of the glycolipid-binding specificities of Cholera toxin & Porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: Identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. Glycoconjugate J., 11: 533-540.
- Tesh, V.L.; O'Brien, A.D. (1992). Adherence and colonization mechanisms of enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*. Microb. Pathogenesis, 12: 240.
- Thomas, J.K.; Goldsby, R.A. & Osborne. (2000). Immunology, 4<sup>th</sup> ed, W.H. Freeman & Company, New York.

- Thompson, M.R.; H. Brandwein; M. LaBine-Racke & R. A. Giannella. (١٩٨٤). Simple and reliable enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies for detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins. J. Clin. Microbiol., ٢٠:٥٩-٦٤.
- Tizard, I. (١٩٩٧). Immunology, Saunders college publishing, London.
- Tozzi, A.E.; Gorietti, S. & Caprioli, A. (٢٠٠١). Epidemiology of human infection by *Escherichia coli* O١٥٧ and other verocytotoxigenic producing *E. coli*. In verocytotoxigenic *E. coli* ed. Duffy, G.; Garvey, P. & McDowell, D.A.P. ١٧١. Trumbull, C.T. Food. Science & Nutrition press, Inc. ISBN. O٩١٧٦٧٨. ٥٢-٤.
- Turlinton, D.M.; Corcoran, L.M. & Strasser, A. (١٩٩٧). Continued differentiation during B lymphopoiesis requires signals in addition to cell survival. Int. Immunol., ٩: ١٤٨١-١٤٩٤.
- Ulevitch, R.J.; Pugin, J. & Tobias. (١٩٩٥). Mechanism of cellular activation by endotoxin. Prog. Surg., ٢٠: ٨-١٧.
- Vaandrager, A.B., E. Van der Wife, M.L. Hom, L.H., Luthjens & H.R, DeJonge. (١٩٩٤). Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits which are non-covalently linked in the intestine. J. Boil. Chem., ٢٦٩:١٦٤٠٩-١٦٤١٥.
- Visser, C.E.; Brouwer-Steenbergen, J.J.; Schadee-Eestermans, I.L.; Meijer, S.; Krediet, R.T.; Beclen, R.H. (١٩٩٦). Ingestion of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* & *E. coli* by human peritoneal mesothelial cells. Infect. Immun., ٦٤:٣٤٢٥-٨.
- Voinescu, C.G. & Khanna, R. (٢٠٠٢). Peritonitis in peritoneal dialysis. Int. J. Artif. Organs, ٢٥: ٢٤٩-٦٠.
- Vold, LK., Johansen, B.; Kruse, H. & Skjerve, E. (١٩٩٨). Occurrence of Shiga-toxinogenic *E. coli* O١٥٧ in Norwegian cattle herds. Epidemiology & Infection, ١٢٠: ٢١-٢٨.
- Wakabayashi, G.; J. A. Gelfand; J. F. Burke; Thompgon & C. A., Dinarello. (١٩٩١). A specific receptor antagonist for interleukin ١ prevents *Escherichia coli*-induced shock in rabbits. The FASEB Journal, ٥:٣٣٨-٣٤٣.
- Walter, J.B.; Talbot, I.C. & Forbes, A. (١٩٩٦). General pathology. ٧<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone, New York.
- Walter, J.B.; Talbot, I.C. & Forbes, A. (١٩٩٦). General pathology. ٧<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone, New York.
- Wang, H.X.; Ooi, V.E.C.; Ng, T.B.; Liu, W.K. & Changgs, T. (١٩٩٨). Lectins from mushrooms. Mycol. Res., ١٠٢: ٨٩٧-٩٠٦.

- War, G.W.; Magor, K.E. & Higgins, D.A. (1990). **Igδ**: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today*, 11: 392-398.
- Watarai, S.; Han, M.; Tana & Kodama, H. (1998). Antibody response in the intestinal tract of mice orally immunized with antigen associated with liposomes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70: 1047-1050.
- Weagant, S.D.; K.C. Jinneman & J.H. Wetherington. (2000). Use of multiplex polymerase chain reaction for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*. FDA. LTB 4227.
- Weir, D.M. (1992). *Immunology*, 7<sup>th</sup> ed., Longman Singapore publishers, Ltd., Singapore.
- Weltzin, R.; Bruno, G.; William, D.; Thomas, Jr. and Thomas, P.M. (2000). Parenteral Adjuvant activities of *Escherichia coli*: Heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric helicobacter pylori infection. *Infect. And Immunity*, 78: 2770-2782.
- Winner, L.S.; Mack, J.; Weltzin, R.; Mekalanos, J.J.; Kraehenbuhi, J.P. & Neutra, M.R. (1991). New model for analysis of mucosal immunity, intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against vibrio cholera infection. *Infection & Immunity*, 59: 977-982.
- Yamamoto, T. & P. Echeverria. (1996). Detection of the entero aggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. *Infect. Immun.*, 64: 1441-1445.
- Yamanaka, H., M. Kameyama, T., Baba, Y., Fujii & K. Okamoto. (1994). Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I, requirement of DsbA for disulfide bond formation. *J. Bacteriol.*, 176: 2906-2913.
- Yoshimura, S.; Ikemura, H.; Watunabe, H; Aimoto, S.; Shimon, Y.; Hara, S.; Takedo, T.; Miwatani, T. & Takeda, Y. (1980). Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*, *FEBS Lett*, 111: 138-142. [Medline].
- Zubler, R.H. (1998). Antigen T dependent and independent. In Delves, R.J. & Roitt (eds). *Encyclopedia of Immunology*.

## الملاحق

### ٣-٢-١٧: محلول الالبومين وتخفيفه القياسية Standard Albumin solution

حضر هذا المحلول بأذابة ٦٠ غم من الالبومين البقري المخفف شركة BDH (الوزن الجزيئي ٦٥٤٠٠) في كمية قليلة من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠.٦ عياري) واكمل الحجم النهائي الى لتر باستعمال نفس المحلول ليكون التركيز النهائي للالبومين ٦٠ غم/لتر. من هذا المحلول تم تحضير التخفيفات القياسية (٨:١, ١٦:١, ٣٢:١, ٦٤:١, ٢٨:١) (١:١, ٢:١, ٤:١) على التوالي، والتي تمثل التراكيز (٦٠, ٣٠, ١٥, ٧.٥, ٣.٧٥, ١.٨٧٥, ٠.٩٣٧٥, ٠.٤٦٨٧٥) ملغم/لتر على التوالي. تم التخفيف باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠.٦ عياري). جرى استعمال هذه المحاليل لغرض تحضير المنحني القياسي Standard curve لمعرفة تركيز الكلوبولين المناعي- كما ومعرفة تركيز البروتين الكلي (Bioshop et al., ١٩٨٥).

حضرت سلسلة تخفيف منها وجرى تقدير الكثافة الضوئية لكل تخفيف في سلسلة التخفيف وباستعمال تحليل الانحدار الخطي البسيط، احتسبت القيمة المقدرة للتركيز وحددت معادلة الخط المستقيم البسيطة وكانت معادلة من الدرجة الاولى للعلاقة بين قيمة الكثافة الضوئية (X) والتركيز (Y).

استخدم محلول البايوريت لتوفر مواده الاولية وعدم الحاجة فيه الى اجهزة قياس معقدة علماً ان القراءة بطول موجي ٥٤٠ نانومتر (جدول ٣-١، شكل ٣-١) بالنسبة الى طريقة بايوريت وهذا يتفق مع باحثين اخرين (Bioshop et al., ١٩٨٥).

استخدمت طريقة لوري لقياس تركيز البروتين الكلي وذلك لحساسيتها العالية ودقتها علماً ان القراءة بطول موجي ٧٤٠ نانومتر (جدول ٣-٢، شكل ٣-٢) بالنسبة الى طريقة لوري.

$$\hat{Y} = bX_i + a$$

$\hat{Y}$  = تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحني القياسي لتقدير كمية الكلوبولين المناعي وتركيز البروتين الكلي.

$X_i$  = الكثافة الضوئية

$a$  = تمثل الفرق بين متوسط لتركيز وبين حاصل ضرب معامل الانحدار (b) تبين متوسط قيم الامتصاص في قراءة المطياف الضوئي.

$b$  = تمثل عامل الانحدار وبحسب المعادلة الاتية:

$$b = \frac{S_{Xy}}{S_{XX}}$$

$S_{XY}$  = مجموع مربعات الانحراف القيم X/Y

$S_{XX}$  = تمثل مجموعة مربعات الانحراف القيم X

وتحسب a من المعادلة التالية:-

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

$\bar{Y}$  = الوسط الحسابي للتركيز

$\bar{X}$  = الوسط الحسابي للكثافة الضوئية

وحساب عامل الارتباط بواسطة المعادلة الاتية:-

$$r = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sqrt{\sum X^2 - [\frac{(\sum X)^2}{n}] \sum Y^2 - [\frac{(\sum Y)^2}{n}]}}$$

جدول (١-٣) البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي لتركيز محلول الالبومين وتخفيفه القياسية.

$X_i$	$Y_i$	$XY$	$X^2$	$Y^2$
٠.٠٠١	٦٠	٠.٠٦	٠.٠٠٠٠٠١	٣٦٠٠
٠.٠٠٢	٣٠	٠.٠٦	٠.٠٠٠٠٠٤	٩٠٠
٠.٠٠٣	١٥	٠.٠٤٥	٠.٠٠٠٠٠٩	٢٢٥
٠.٠٠٦	٧.٥	٠.٠٤٥	٠.٠٠٠٠٣٦	٥٦.٢٥
٠.٠١٢	٣.٧٥	٠.٠٤٥	٠.٠٠٠١٤٤	١٤.٠٦
٠.٠١٩	١.٨٧٥	٠.٣٥٦٢	٠.٠٠٠٣٦	٣.٥١٥
٠.٠٢٧	٠.٩٣٧٥	٠.٢٥٣١	٠.٠٠٠٧٢٩	٠.٨٧٨٩
٠.٠٣٤	٠.٤٦٨٧٥	٠.١٥٩٣	٠.٠٠١١٥٦	٠.٠٠١١
$\sum ٠.١٠٤$	$\sum ١١٩.٥٣$	$\sum ٠.٣٣١$	$\sum ٠.٠٠٢٤$	$\sum ٤٧٩٩.٧٠$

$$b = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sum X^2 - [\frac{(\sum X)^2}{n}] \sum Y^2 - [\frac{(\sum Y)^2}{n}]}$$

$$a = -bX + Y$$

$$\hat{Y} = bX + a$$

$$\hat{Y} = 7E - 6X - 0.0005$$



## الملاحق

## ١- محلول الالبومين وتخفيفه القياسية Standard Albumin solution

حضرت سلسلة تخافيف منها وجرى تقدير الكثافة الضوئية لكل تخفيف في سلسلة التخافيف وباستعمال تحليل الانحدار الخطي البسيط، احتسبت القيمة المقدرة للتركيز و حددت معادلة الخط المستقيم البسيطة وكانت معادلة من الدرجة الاولى للعلاقة بين قيمة الكثافة الضوئية (X) والتركيز (Y).

استخدم محلول البايوريت لتوفر مواده الاولية وعدم الحاجة فيه الى اجهزة قياس معقدة علماً ان القراءة بطول موجي ٥٤٠ نانومتر (جدول ١) بالنسبة الى طريقة بايوريت وهذا يتفق مع باحثين اخرين (Bioshop et al., ١٩٨٥).

استخدمت طريقة لوري لقياس تركيز البروتين الكلي وذلك لحساسيتها العالية ودقتها علماً ان القراءة بطول موجي ٧٤٠ نانومتر (جدول ٢) بالنسبة الى طريقة لوري.

$$\hat{Y} = bX_i + a$$

$\hat{Y}$  = تمثل القيمة المقدرة للتركيز بالاعتماد على دراسة المنحني القياسي لتقدير كمية الكلوبولين المناعي وتركيز البروتين الكلي.

$X_i$  = الكثافة الضوئية

$a$  = تمثل الفرق بين متوسط لتركيز وبين حاصل ضرب معامل الانحدار (b) تبين متوسط قيم الامتصاص في قراءة المطياف الضوئي.

$b$  = تمثل عامل الانحدار وبحسب المعادلة الاتية:

$$b = \frac{S_{Xy}}{S_{XX}}$$

$S_{XY}$  = مجموع مربعات الانحراف القيم X/Y

$S_{XX}$  = تمثل مجموعة مربعات الانحراف القيم X

وتحسب a من المعادلة التالية:-

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

$\bar{Y}$  = الوسط الحسابي للتركيز

$\bar{X}$  = الوسط الحسابي للكثافة الضوئية

وحساب عامل الارتباط بواسطة المعادلة الاتية:-

$$r = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sqrt{[\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}] [\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}]}}$$

ملحق (١) البيانات والمعالم الاحصائية الخاصة بمعادلة المنحني القياسي لتركيز محلول الالبومين وتخفيفه القياسية.

$X_i$	$Y_i$	$XY$	$X^2$	$Y^2$
٠.٠٠١	٦٠	٠.٠٦	٠.٠٠٠٠٠١	٣٦٠٠
٠.٠٠٢	٣٠	٠.٠٦	٠.٠٠٠٠٠٤	٩٠٠
٠.٠٠٣	١٥	٠.٠٤٥	٠.٠٠٠٠٠٩	٢٢٥
٠.٠٠٦	٧.٥	٠.٠٤٥	٠.٠٠٠٠٣٦	٥٦.٢٥
٠.٠١٢	٣.٧٥	٠.٠٤٥	٠.٠٠٠١٤٤	١٤.٠٦
٠.٠١٩	١.٨٧٥	٠.٣٥٦٢	٠.٠٠٠٣٦	٣.٥١٥
٠.٠٢٧	٠.٩٣٧٥	٠.٢٥٣١	٠.٠٠٠٧٢٩	٠.٨٧٨٩
٠.٠٣٤	٠.٤٦٨٧٥	٠.١٥٩٣	٠.٠٠١١٥٦	٠.٠٠١١
$\sum ٠.١٠٤$	$\sum ١١٩.٥٣$	$\sum ٠.٣٣١$	$\sum ٠.٠٠٢٤$	$\sum ٤٧٩٩.٧٠$

$$b = \frac{\sum XY - (\sum X \frac{\sum Y}{n})}{\sum X^2 - [\frac{(\sum X)^2}{n}] \quad \sum Y^2 - [\frac{(\sum Y)^2}{n}]}$$

$$a = -bX + Y$$

$$\hat{Y} = bX + a$$

$$\hat{Y} = 7E - 6X - 0.0005$$

## Chapter Five الفصل الخامس

### ٥- المناقشة Discussion

٥-١: تأثير المساعد المناعي التوبركولين على الاستجابة المناعية في الارانب  
 اظهرت نتائج التمنيع لمستضدات جرثومة *E. coli* الممزوجة مع المساعد المناعي الكامل (التوبركولين) في الارانب ان هنالك تحفيزاً للاستجابة المناعية الخلوية والخلطية يسبب تأثيرات التوبركولين وتحفيزه للفعالية المناعية. اشار Hyde (٢٠٠٠) و Parslow وجماعته (٢٠٠١) ان مشتق البروتين من *M. tuberculosis* ذو قدرة تمنيعية ومستضدية عالية، وربما يكون له دور مثبت او منظم للاستجابة المناعية الخلطية. كذلك بين Stites وجماعته (٢٠٠١) ان التوبركولين يستطيع ان ينبه استجابة الخلايا اللمفية التائية المساعدة (Th<sub>١</sub>) أي سائل Tdth و Ts التي تشارك في المظاهر المناعية الخلوية ولاختبار الجلد لتوليد استجابة قوية في فرط الحساسية المتأخر ضد تطور المستضد الذاتي وكذلك يعمل على تحسين عملية البلعمة و افراز السايوتوكينات بواسطة الخلايا البلعمية احادية النواة وتفعيل مؤقت وتوليد CD للخلايا اللمفاوية. اثبتت التجارب المناعية الذاتية ان المساعد المناعي الكامل لفرونيدي استطاع ان ينبه استجابة اجزاء الجهاز المناعي الذاتي ليكون مهماً ليس فقط بواسطة تنظيم طور الحث الاولي ولكن بواسطة تجهيز الفائص للمؤثرات والخلايا المنظمة في الطور الاخير (الزبيدي، ١٩٨٤؛ Alfons & Patrick, ٢٠٠١).

٥-٢: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية.

٥-٢-١: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على الاستجابة المناعية الخلطية بدلالة فرط الحساسية الانية.

أتضح من النتائج المستحصلة ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) بين حيوانات التجربة ونموذج السيطرة عند تمنيعها بمستضدات جرثومة الاشريشية القولونية، وتبين من خلال ذلك ان المستضد السوطي كان الاكثر تحفيزاً لفرط الحساسية الانية مقارنة مع المستضدين المقتول والجسمي كما مبين في (شكل ٤-١).

وقد اظهرت دراسات اخرى ان انتاج كميات كبيرة من الاضداد المتخصصة بالمستضد تعتمد على قابلية الجهاز المناعي على تنشيط الخلايا البائية B-cells المنتجة للضد والذي يرتبط مع المستضد، وهذه الخلايا تبدأ بالتضاعف في العدد وبالتالي تتمايز الى خلايا بلازمية او تصبح خلايا بائية ذاكرة. وتبقى هذه الخلايا لفترة زمنية طويلة للتعرف على المستضد عند التعرض له مرة اخرى (Stites et al., ٢٠٠١).

اشار Milsaa وجماعته (١٩٨٨) ان ان مستضدات T١-٢ لا تمتلك خصائص منشطات الخلايا البائية المتعددة النسائل حيث ان تلك المستضدات غالباً ما تكون منتجة لتكرار مستضدات متعددة القطع مثل متعدد السكريد الشحمي LPS لجدار الخلية او تركيب البروتينات متعدد القطع لسوط الجرثومة والذي يفترض تنشيط خصائص الخلايا البائية والتي اشتقت من قدرتها للارتباط عرضياً مع جزيئات BCR مما يولد حثاً قوياً داخل الخلية طويل الامد وهو تفاعل اشارة لاستجابة الاجسام المضادة لمستضدات T١-٢، وهذا مقارب لنتائج دراستنا الحالية.

كما وجد Chain و Playfair (٢٠٠١) عند مقارنة فرط الحساسية لتفاعل الجلد وتفاعل تثبيط هجرة الخلايا في الاستجابة الأولية ان هنالك تثبيطاً للجلد وتحفيزاً لهجرة الخلايا.

### ٢-٢-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد.

اظهرت نتائج الدراسة وجود فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) بين ارناب السيطرة والمعاملة عند تمنيعها بمستضدات جرثومة *E. coil* حيث كان فرط الحساسية المتأخرة للمستضد السوطي هي الاعلى مقارنة مع المستضدات الاخرى (شكل ٤-٢).  
اوضحت الدراسات العديدة ان تفاعل فرط الحساسية المتأخرة يتطلب عادة ٢٤ ساعة لحدوث التغيرات الثانوية اللاحقة للمستضد لدوران الخلايا المساعدة (في الواقع الخلايا الذاكرة) لوجود المستضد ويبدأ انتاج Lymphokines وجذب البلاعم الكبيرة والخلايا التائية السامة وموقع هذه الخلايا تتوسط تفاعلات فرط الحساسية وتنشيط عملية البلعمة داخل النسيج. ويمكن ملاحظة فرط الحساسية المتأخر (DTH) في المضيف، في الاصابات المزمنة واصابات امراض التدرن الرئوي (Kenneth, ٢٠٠٢).

اشار Parslow وجماعته (٢٠٠١) ان الخلايا التائية المساعدة Th١ جزء من الخلايا المفاوية والتي تميز المستضد بالارتباط مع بروتينات الصنف الثاني لمعقد التوافق النسيجي MHCII المقدم من قبل البلاعم الكبيرة وهذا التطور يؤدي الى تحفيز انتاج الانترلوكين-١ (IL-١) المنتج من قبل البلاعم الكبيرة وتحفيز ذاتي بوساطة IL-٢ المنتج من قبل خلايا T المساعدة وهذا يؤدي الى تمايز تلك الخلايا وانتاج مختلف Lymphokines التي تحث الاستجابة الالتهابية الموضوعية.

واشار الباحث Clark (١٩٨٣) الى ان تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة يمكن ان تنتج في خنزير غينيا المحسس عن طريق حقن التوبركولين وقد يؤدي ذلك الى حدوث صدمة Shock بعد مرور ٥-٨ ساعات من حقن المستضد ولكن التفاعل يصل الى قمته بعد مرور ٢٤ ساعة، وهذه النتائج مختلفة لنتيجة الدراسة الحالية حيث يصل التفاعل الى قمته بعد مرور ٤٨ ساعة وذلك بسبب اختلاف حيوان التجربة والمستضد.

### ٣-٢-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على العدد الكلي لخلايا الدم البيض.

اظهرت نتائج الدراسة نقصان في العدد الكلي لخلايا الدم البيض (Leukopenia) ووجود فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) بين حيوانات التجربة ونموذج السيطرة اذ بلغ متوسط العدد الكلي لخلايا الدم البيض ٥.٨٢ و ٦.٦ و  $٧.٤٨ \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup> للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين كان ذلك المتوسط في عينة السيطرة  $٨.٢٨ \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup>. اذ كان المستضد المقتول اكثر تأثيراً في قلة العدد الكلي لخلايا الدم البيض شكل (٤-٣).

واشار Paape وجماعته (٢٠٠٠) الى ان عدد خلايا الدم البيض يتأثر سريعاً بوساطة العمليات الالتهابية بعد اربع ساعات من حقن متعدد السكريات الشحمي (LPS) حيث يلاحظ انخفاض حاد في عدد خلايا الدم البيض وصل الى اكثر من النصف في مستوى الخط الرئيس، وهذا مطابق لما جاء في الدراسة الحالية.

اوضحت الدراسات العديدة ان هجرة العدلات تكون سريعة جداً الى مواقع وجود المستضد بفعل المواد المفرزة الجاذبة لها مما يؤدي الى تقليل عدد الجراثيم المتواجدة في

الساعات الست الاولى من الاصابة بها، ثم يحدث موت العدلات بعد ساعات قليلة من بلعمة الجراثيم نتيجة هضم الجراثيم الغازية، وكذلك تقوم العدلات بإفراز عدد من الساييتوكينات التي تساعد الخلايا الشجيرية في تقديم المستضد (Conlan & North, ١٩٩٢; Gregorg *et al.*, ١٩٩٦).

ويعمل متعدد السكريد الشحمي على تنشيط قابلية الخلية المحفزة مثل العدلات مما يؤدي الى تحرير البروستوكلانبيدين و Leukotrienes واهداف اخرى مثل الفعالية الوعائية وتأثيراتها في الخلايا الالتهابية الاولى (Clman, ١٩٨٩; Albert *et al.*, ١٩٩٨).

#### ٥-٢-٤: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على العد التفريقي لخلايا الدم البيض

اظهرت نتائج التمنيع بمستضدات تلك الجرثومة وجود انخفاض في مستويات العد التفريقي لخلايا الدم البيض العدلات وخلايا وحيدة النواة الدموية والخلايا اللمفية والخلايا الحمضة (جدول ٤-١).

اشار Nataraj وجماعته (١٩٩٨) ان هنالك استنزاف لعدد العدلات في الحي وان مستوى هذه الخلايا يقل رئيساً، حيث تعمل الخلايا التائية السامة (CD<sub>8</sub>) دوراً ضد المستضدات داخل خلوية وهنالك انواع اخرى من الخلايا غالباً ما تخدم كمواد مساعدة لتقديم المستضدات الداخلة خلوية خلال الاصابة الجرثومية، وغالباً ما تكون الخلايا الشجيرية قادرة على تحطيم الجراثيم، كما ان استنزاف العدلات خصوصاً يثبط الخلايا التائية السامة (CD<sub>8</sub> خلايا T) ضد المستضدات داخل خلوية. كما وضح ان الخلايا التائية السامة تستجيب للمستضدات المفترزة من الجراثيم والتي تشغل محيط الخلايا الخارجية وذلك لاجل التنظيم المناعي او الحماية المناعية.

اوضح Schoppet و Huppertzertz (٢٠٠١) ان العدلات تقوم بقتل وهضم الجراثيم مباشرة بواسطة تحفيز الخلايا التائية السامة حيث ان هذه الخلايا المتخصصة تستطيع تحفيز انتاج IFN- $\delta$ ، وهذا يحفز المناعة ضد المستضدات واحاطتها بفجوات. وتبين النتائج كذلك ان هنالك انخفاضاً في متوسط اعداد الخلايا اللمفية بالمقارنة مع نموذج السيطرة، حيث دلت النتائج على وجود فرق معنوي جداً ( $P < ٠.٠١$ ) في الخلايا اللمفية لارانب المعاملة مقارنة مع نموذج السيطرة. حيث كان المستضد المقتول الاكثر تأثيراً في اعداد الخلايا اللمفية (جدول ٤-١).

اشار Rictschel وجماعته (١٩٩٦) ان المستضد الجرثومي حفز تكاثر الخلايا البائية وانتاج الاضداد، وكذلك حفز الخلايا التائية مما أدى الى افراز الساييتوكينات (Cytokines) وتنظيم تثبيط الاستجابة المناعية التدريجي للخلايا التائية، كذلك يظهر متعدد السكريد الشحمي تأثيرات مختلفة لمجموعات الخلايا اللمفية وكذلك يحفز تكاثر خلايا B- وانتاج الاضداد. دلت نتائج التمنيع بالمستضدات المختلفة لجراثيم الاشريشية القولونية انخفاضاً في عدد خلايا وحيدة النواة الدموية بالمقارنة مع نموذج السيطرة (جدول ٤-١).

اشارت الدراسات الواسعة الى ان اغلب التأثيرات الخلوية المهمة للسموم الداخلية تتضمن التفاعلات مع الخلايا وحيدة النواة (Remick, ١٩٩٥; Glauser *et al.*, ١٩٩١). و اشار Remick (١٩٩٥) الى وضوح المستقبلات الغشائية المعروفة CD<sub>٤٤</sub>، حيث ان ارتباط متعدد السكريد الشحمي LPS مع CD<sub>٤٤</sub> يؤدي الى حث خلايا وحيدة النواة لانتاج وافراز عدد كبير من الساييتوكينات ومضادات الالتهاب الاولى والتي تتضمن الانترلوكينات

(IL-1 و IL-6 و IL-8 و IL-10) وتنشيط عامل هجرة الخلايا البلعمية وعامل تنخر الاورام (TNF).

كما اشار Tobias و Ulevitch (1995) ان ارتباط متعدد السكريد الشحمي بجهاز الدوران بوساطة البروتينات السكرية المصلية التي تكون كقوة بارتباطها مع LPS، والتي تكون احد مبادئ المستقبلات الخلوية لجزيئات CD<sub>14</sub>، كذلك ان ارتباط LPS, LBP بالخلايا وحيدة النواة مما يؤدي الى غلق فعالية السموم الداخلية. اظهرت نتائج التمنيع بمستضدات جرثومة الاشريشية القولونية انخفاض في عدد خلايا الدم الحمضة ووجود فروق معنوية عند المقارنة بين حيوانات التجربة ونموذج السيطرة (جدول ٤-١).

اشار Steven و Lowe (1997) ان الخلايا الحمضة تؤدي دوراً مهماً في الدفاع ضد الاصابة الجرثومية وذلك بطرح محتوياتها الحبيبية الى الخارج وليس بطريقة البلعمة.

### ٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في الاستجابة المناعية الخاطية.

#### ١-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في تركيز البروتين الكلي.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية الى وجود فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) بين حيوانات المعاملة ونموذج السيطرة، حيث نلاحظ ان هنالك ارتفاعاً في مستوى تركيز البروتين الكلي في امصال حيوانات التجربة الممنعة بمستضدات تلك الجرثومة وبصورة متقاربة مقارنة مع نموذج السيطرة، وكان المستضد المقتول الاكثر تأثيراً (جدول ٤-٢).

اشار Walter وجماعته (1996) ان المستضدات الجرثومية لها القدرة على التحفيز المناعي، كذلك ان بروتين المصل يمثل جزءاً صغيراً من بروتين الجسم وانه الوحيد الذي يمكن دراسته من البروتينات في جسم الحي.

اثبتت الدراسات التي قام بها الباحثان الباحثان Charkrabarti و Siha (1996) ان مستضدات جرثومة الشيغلا *Shigella sp* حفزت الجهاز المناعي وحصول زيادة في بروتينات المصل للحيوانات الممنعة بتلك المستضدات. وجاءت هذه الدراسة مطابقة للدراسة الحالية على جراثيم الاشريشية القولونية.

اكادت الدراسات العديدة ان التحفيز الكامل للجهاز المناعي يحدث بوساطة متطلبات التحفيز لمصول فائقة المناعة (Hyperimmunesera) تجاه المستضدات الجرثومية (Suscelan et al., 1997; Suscelan et al., 1997).

#### ٢-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما.

اظهرت النتائج المستحصلة ان هنالك ارتفاع في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما لجميع حيوانات المعاملة الممنعة بالمقارنة مع نموذج السيطرة، ووجود فرق معنوي جداً بين تلك المستضدات وحيوانات السيطرة، حيث بينت النتائج ان المستضد الجسمي كان الاكثر تحفيزاً لافراز الكلوبولين المناعي-كاما (جدول ٤-٣).

أشار Nushor وجماعته (١٩٨٨) الى ان تمنيع الحيوانات بالمستضدات يؤدي الى تحفيز الاستجابة المناعية المخاطية والجهازية وهذا مطابق لنتيجة تمنيع المستضد الجسمي لحيوانات التجربة الذي استطاع ان يحفز الاستجابة المناعية الخلطية الجهازية والمخاطية. كما اشار Seldenrijk وجماعته (١٩٨٩) ان الخلايا البلعمية الشجيرية تؤدي دوراً مهماً في عملية تهيئة المستضدات الى الخلايا اللمفية عالية التنظيم وبالتالي تحفيز وبدء الاستجابة المناعية وحث توليد الخلايا اللمفاوية وتوليد الاضداد بعد نضج خلايا B و T. وتقع هذه الخلايا الشجيرية في الطبقات العميقة من جدار المعي (اسفل الطبقة المخاطية العضلية ومناطق الخلايا الناشئة للعقيدات اللمفية).

تشارك الخلايا البلعمية غير اللمفية المشتقة من نقي العظم الاحمر والتي توجد بين الانسجة الظهارية مثل خلايا لانكرهانز في بلعمة المايكروبات حيث تعمل على ازالة المستضدات من تلك السطوح الظهارية وتقطيعها الى ببتيدات وتهيئة تلك الببتيدات بوساطة جزيئات الصنف الثاني لمعقد التوافق النسيجي الى الخلايا التائية المساعدة (Th٢) ومن هنا تبدأ الاستجابة المناعية المتخصصة بالمستضد (Andrew et al., ١٩٩٧).

٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على الكلوبولينات المناعية في مصول الارانب.  
١-٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على الكلوبولين المناعي (IgG).  
اظهرت نتائج التجربة ان هنالك زيادة في تركيز الكلوبولين المناعي IgG في امصال الارانب الممنعة بالمقارنة مع نموذج السيطرة. اذ تبين وجود فرق معنوي في تركيز IgG بين امصال ارانب المعاملة وامصال ارانب السيطرة. وكان المستضد الجسمي الاكثر تحفيزاً لافراز IgG (جدول ٤-٤).

اشار Andrew وجماعته (٢٠٠١) ان المستضد الجسمي والذي يرتبط مع متعدد السكريد الشحمي هو محفز لتطور الخلايا البائية مما يحفز توليد الضد IgG والذي يعد ضداً مباشراً للجراثيم المعوية المتعايشة او ضداً لمستضدات حية ناتجة عن الاصابات الجرثومية المرضية المعوية.

بين كل من Fred وJashua (١٩٩٧) انه عند حقن متعدد السكريد الشحمي لجرثومة الاشريشية القولونية النوع المصلي O<sub>١٨</sub> في الجرذ الابيض جرى تحفيز للخلايا البائية لانتاج الضد IgG، وهذا مطابق للدراسة الحالية بتمنيع LPS.

٢-٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على الكلوبولين المناعي IgM.  
دللت نتائج التمنيع ان هنالك فرقاً معنوي جداً ( $P < ٠.٠١$ ) بين حيوانات المعاملة وبين نموذج السيطرة، حيث لوحظ زيادة في الكلوبولين المناعي IgM، وظهر ان المستضد الجسمي كان الاكثر تحفيزاً للمناعة الخلطية في انتاج الضد IgM (جدول ٤-٥).  
اشار Melamed وجماعته (٢٠٠٠) انه عند اصابة الفأر بأحد المستضدات الجرثومية او العوامل المرضية فإنه يحفز توليد الخلايا اللمفية (Lymphopoiesis) والخلايا البائية التي تستطيع انتاج وافراز كميات كبيرة من الضد IgM، وهذا مطابق للدراسة الحالية ولنتيجة تمنيع مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.

تشير الدراسات العديدة ان الضد IgM في الجرذ يؤدي دوراً مهماً ضد متعدد السكريد الشحمي لجرثومة الاشريشية القولونية النوع المصلي O<sub>18</sub> وان هذا الضد ازادت كفاءته من ١٠٠-١٠٠٠ مرة من توسط المتمم لمتعدد السكريد المغطى لكريات الدم الحمر مقارنة مع الضد IgG (Joshua & Fred, ١٩٩٧; Lutz et al., ١٩٩٧; Turlinton et al., ١٩٩٧).

### ٣-٣-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في تركيز الكلوبولين المناعي IgA.

اظهرت نتائج التمنيع بمستضدات الاشريشية القولونية الى وجود فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) حيث لوحظ زيادة في تركيز الكلوبولين المناعي IgA في مصول الارانب الممنعة بالمقارنة مع نموذج السيطرة. وتبين ان المستضد الجسمي كان الاكثر تأثيراً في تحفيز الاستجابة المناعية وافراز الضد IgA (جدول ٤-٦).

اشار Malin وجماعته (١٩٩٦) ان تمنيع الحيوانات بالمستضدات الجرثومية ممزوجاً مع المساعد المناعي سوف تزيد تخصص وكمية افراز الضد IgA، وهذا جاء مطابقاً للدراسة الحالية ونتائجها.

اوضحت الدراسات العديدة ان هنالك زيادة في مستوى الضد IgA عندما يكون تركيز نيفان جرثومة الاشريشية القولونية المحقون في الارانب عالياً مماثلاً لذي فان الشيعلة Shiga toxin حيث يزداد مستوى IgA المخاطي في الامعاء خلال سبعة ايام من التجريع (McQuccu et al., ١٩٩٢; Perdigon et al., ١٩٩٧).

تحمل سلالات EPEC العديد من البروتينات السطحية التي تميز بوساطة الضد الافرازي sIgA فقط وهنالك ثلاثة بروتينات ميزت بقوة وهي مستضدات قوية فعالة قادرة على تحفيز sIgA وحث الاستجابة المناعية وهي ٤KDa والذي يدعى intimin وبروتينات غير معروفة ٧٠ و٨٠ KDa (Francis et al., ١٩٨٩; Berry et al., ١٩٨٥; Feresia & Nyatia, ١٩٩٠).

اشار Andrew وجماعته (٢٠٠١) الى ان المستضد الجسمي ومتعدد السكريد الشحمي للجراثيم المعوية مثل (السالمونيلا) قد حفز الاستجابة المناعية لانتاج الضد IgA والذي يلعب دوراً مباشراً ضد الجراثيم المعوية المتعايشة او المستضدات الجديدة.

### ٤-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في عيار الضد المتخصص بالمستضد واثره في الاستجابة المناعية الخلطية.

اظهرت نتائج التمنيع بمستضدات جراثيم الاشريشية القولونية ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) بين عيارات اعداد الحيوانات الممنعة ونموذج السيطرة. اذ لوحظ ان هنالك ارتفاعاً في عيارات هذه الاضداد في امصال ارانب التجربة الممنعة بمستضدات تلك الجرثومة (جدول ٤-٧)، حيث تم الكشف عن التغيير الحاصل في الاستجابة المناعية الخلطية الاولية والثانوية من خلال الارتفاع والانخفاض الحاصل في عيارات الضد المتخصص بالمستضد الجرثومي بوساطة اجراء اختبار التلازن الدموي المنفعل (Passive haemagglutination test).

اشارت الدراسات العديدة ان المستضدات الجرثومية لها تأثيراً منشط للخلايا التائية المساعدة (Th<sub>٢</sub>) في الاستجابة الاولية الخلطية ولها دور ربما يكون محفزاً لانتاج الخلايا البائية الذاكرة او محفزاً لنشاط هذه الخلايا في الاستجابة الثانوية وزيادة في وظيفتها في انتاج

الضد (Zubler, 1998; Thomas et al., 2000). وهذا مطابق لنتائج الدراسة الحالية وخاصة في تمنيع المستضد المقتول.

كما اشار Roitt وجماعته (2001) ان المستضدات الجرثومية قد تكون ذا تأثير واضح على الخلايا  $Th_2$  و  $Th_0$  من حيث دوره كمنشط لاليات التعرف المستضدي والتقديم المستضدي.

٥-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* على تركيز المكون الثالث  $C_3$  والمكون الرابع  $C_4$  للمتمم.

١-٥-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في تركيز المكون الثالث  $C_3$  للمتمم.

دلّت النتائج المستحصلة ان هنالك فرق معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) في تركيز المكون الثالث للمتمم في مصول الارانب الممنعة بمستضدات جرثومة الاشريشية القولونية بالمقارنة مع نموذج السيطرة، حيث كان المستضد الجسمي الاكثر تحفيزاً لانتاج  $C_3$  (شكل ٤-٥).

اشار Glauser وجماعته (1991) ان متعدد السكريد الشحمي يستطيع تحفيز نظام المتمم من خلال طريقتين منفصلتين، الجراثيم ومكونات جدار الخلية الجرثومية مع تحفيز الاضداد وان مسار المتمم معد لقتل الجراثيم، بينما الجراثيم والسموم الداخلية تنشط مباشرة المسار البديل للمتمم. وهذا مطابق ومتوافق مع نتائج الدراسة الحالية.

اكّدت الدراسات العديدة ان الجراثيم تؤدي دوراً في تنشيط كلا المسارين البديل والتقليدي مما تسهل عملية الاستساعة (Opsonization) للخلايا الجرثومية بوساطة المكون الثالث  $C_3$  للمتمم وبالتالي يؤدي الى تحسين عملية البلعمة (Phagocytosis) بوساطة العدلات وخلايا البلاعم الكبيرة (Visser et al., 1996; Mortensen & Zhang, 2000).

اكّد Sultman وجماعته (2000) ان للمتمم دور مهم في تنظيم الاستجابة المناعية، حيث ان  $C_3$  يعتبر من مكونات المتمم البروتينية ذات الغزارة العالية في جهاز الدوران ويؤدي دوراً حيوياً في تنشيط مسارات المتمم لامتلاكه امكانيات لانشطار جزيئاته.

كما اوضحت الدراسات ان النوع المصلي  $O_6$  لمتعدد السكريد- $O$  المتخصصة لجرثومة *E. coil* يؤدي دوراً اولياً اولياً مهماً في تحفيز مسار اللكتين وهو ما يشابه جراثيم الكلبسيلا *Klebsiella Spp* (Tannano, 2000; Voinescu & Khanna, 2002). ويؤدي نظام المتمم دوراً مساعداً في تطور واستجابة للعوامل الالتهابية بوساطة توليد ببتيدات مهمة في اغلب الالتهابات الاولى مثل  $C_3a$  و  $C_4a$  و  $C_5a$  (Dodds & Law, 1998).

٢-٥-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في تركيز المكون الرابع  $C_4$  للمتمم.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان هنالك فرقاً معنوي جداً ( $P < 0.01$ ) في تركيز المكون الرابع للمتمم في مصول الارانب الممنعة مقارنة مع نموذج السيطرة، حيث كان المستضد الجسمي الاكثر تحفيزاً للمكون الرابع  $C_4$  للمتمم (شكل ٤-٦).

حيث اشار Celik وجماعته (2001) الى تأثيرات اضرار الجراثيم في دفاع الجهاز المناعي في موديل الفأر لالتهاب الخلب معتمداً على نظام المتمم لذلك يجب تفحص الغشاء الصفاقي المحتمل التي تؤثر في تصنيع المتمم في الطبقة الظهارية الوسطى للخلب، بغض النظر عن قوة المحلول المستخدم في تركيب  $C_3$  و  $C_4$ .

كما اشار Shibazaki وجماعته (١٩٩٩) الى ان حث نظام المتمم والصفائح الدموية للصدمة السريعة يحدث بوساطة متعدد السكريد الشحمي لجراثيم الاشريشية القولونية النوع المصلي O<sub>8</sub> و O<sub>9</sub> وكذلك بوساطة اعادة ارتباط LPS تكون اكثر قوة من حث الاستجابة بوساطة متعدد السكريد الشحمي و k-١٢ لنفس الجراثيم. وهذا مطابقاً ومتوافقاً مع نتائج الدراسة الحالية. اكدت الدراسات التي قام بها Paeny وجماعته (١٩٩٦) ان ارتباط المعقدان (MBL-associated Serine و Mannose-binding Lectine (MBL) MBL-MASP (protease) بمتعدد السكريد الشحمي يؤدي الى تنشيط المكون الرابع C<sub>٤</sub> للمتمم. كما ويملك متعدد السكريد الشحمي قدرة لتنشيط نظام المتمم وهذا مطابق لقدرة حث استجابة الصفائح الدموية للصدمة السريعة، والاقتراحات القوية لاستجابة الصفائح الدموية تؤكد استجابة سريعة بصورة عامة لحث وتنشيط نظام المتمم خلال مسار اللكتين (Jann (٢٠٠٢, Jones *et al.*, ٢٠٠١; Broche & Tellado, ١٩٨٤; & Jann, ١٩٨٤).

### ٥-٣-٦: تأثير مستضدات جرثومة *E. coil* في التراكيب النسيجية لطحال الارانب

اوضحت نتائج التمنيع ان هنالك تغيرات نسيجية حاصلة في طحال الارانب الممنعة بمستضدات جرثومة الاشريشية القولونية. اذ ان هنالك وضوحاً وتبايناً في التغيرات النسيجية لطحال حيوانات المعاملة، كذلك هنالك تقارب في تأثيرات المستضد الجسمي والمستضد المقبول واقل منها في تأثيرات المستضد السوطي.

ان وضوحية المركز الانتاشي (Germinal center) هو نتيجة لتأثير مستضدات تلك الجرثومة المؤدي الى تحفيز العقيدات اللمفية الثانوية والتي تحتوي على المراكز الانتاشية مع الخلايا الذاكرة (Memory cells)، وتحتوي المراكز الانتاشية ايضاً على الخلايا الشجرية والبلاعم الكبيرة، حيث ان البلاعم الكبيرة والخلايا البائية تستجيب الى المستضدات غير المعتمدة على التوتة في المنطقة الحافية (Marginal zone) (التي تحيط العقيدات اللمفية الثانوية) وتقوم الخلايا الشجرية بتهيئة المستضدات الى الخلايا البائية في الطحال (Roitt *et al.*, ١٩٩٦).

اشار Balazs وجماعته (١٩٩٩) ان السبب في حصول الاحتقان الدموي ناتج عن تجمع كريات الدم الحمر في الاوعية الدموية نتيجة تحفيز هذا الاحتقان بوساطة مستضدات تلك البكتريا والذي يسبب تحفيز منطقة اللب الاحمر في الطحال مما يؤدي الى توليد الخلايا الدموية النخاعية وهذا مقارب ومطابق لنتائج الدراسة الحالية.

واشار Abdel-Hamid (١٩٩٦) الى حصول تغيرات نسيجية في الارانب الممنعة بذيخان الافلاتوكسين Aflatoxin وحصول احتقان دموي في طحال حيوانات المعاملة نتيجة تأثير هذا الذيفان وهو مشابه لتأثيرات مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية. ان السبب في تغلغل الخلايا الالتهابية داخل الانسجة نتيجة لتطور الخلايا البائية بوساطة قابليتها للدخول المتخصص الى الانسجة اللمفية المحيطة، حيث تهاجر الى الجهاز اللمفي المحيطي، وهذا ناتج عن تأثيرات مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية (Balogh *et al.*, ١٩٩٨).

ويؤدي التحفيز بوساطة مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية الى تحرير Chemokines مثل الانترلوكين-٨ (IL-٨) و (Growth related oncogene) و (Monocyte Chemotractant Protein) التي تستطيع تحفيز تغلغل الخلايا الالتهابية (Kim *et al.*, ٢٠٠٥).

## Discussion

وتحت المستضدات عالية التراكيز مثل T1-2 و T1-1 تنشيط العديد من الخلايا البائية المتخصصة وغير المتخصصة، العديد من منشطات متعدد النسائل للخلايا البائية تحفز بقوة خلايا البلاعم الكبيرة لانتاج الساييتوكينات مثل IL-1 و TNF- $\alpha$  الذي يرفد الاستجابة المناعية وهذا مرتبط مع مستضدات مكونات جدار الخلية الجرثومية وخاصة الجراثيم سالبة صبغة غرام المرتبط معها متعدد السكريد الشحمي وبالتالي يؤدي الى تحفيز الخلايا الحويصلية وتكاثر الخلايا البائية و انتاج الاضداد (Stites et al., 2001).

## Chapter Four الفصل الرابع The Results النتائج

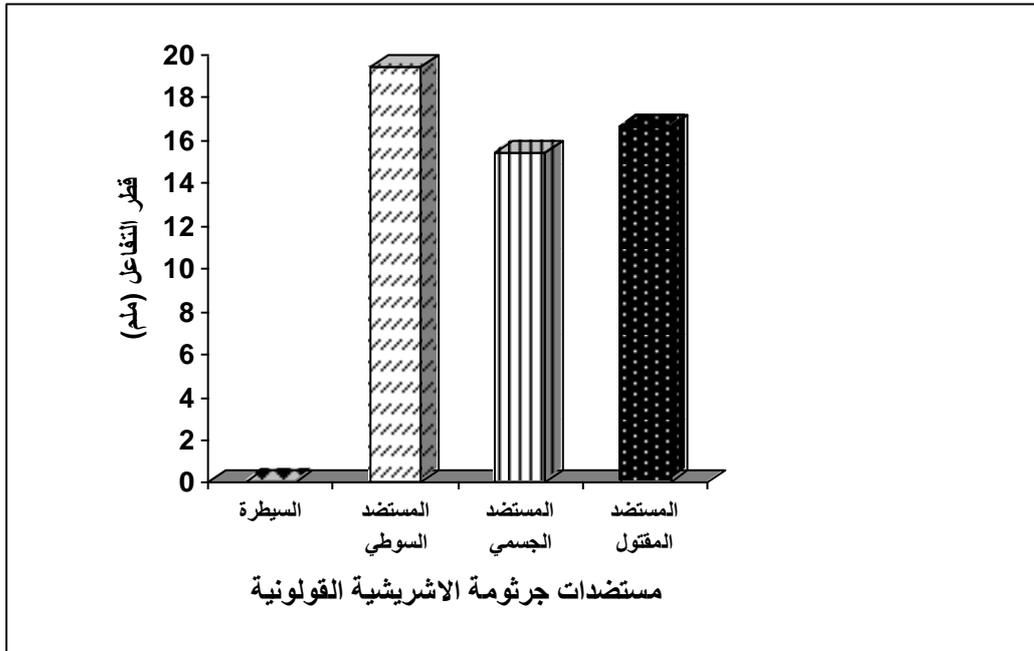
### ٤-١: التشخيص الكيموحيوي والمصلي لجرثومة *E. coli*

اثبتت نتائج الاختبارات الكيموحيوية والمصلية عائلية هذه الجرثومة الى اصناف جراثيم الاشريشية القولونية *E. coli* Enteropathogen type ١ حيث كانت سالبة لفحص الاوكسديز، اليوريز، تحلل الجيلاتين، استهلاك السترات، السكروز، انوستيرول، الفوكس بروسكور، انتاج غاز  $H_2S$ ، وموجبة لفحص الكاتاليز وانتاج حامض وغاز من الكلوكوز، ارابينوز، لاكتوز، تخمر المانيتول، احمر المثيل وانتاج حلقة الاندول.

### ٤-٢: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية والخلوية.

٤-٢-١: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلوية والمتخصصة بدلالة فرط الحساسية الانية والمختبر في الجلد.

بعد انتهاء فترة التمنيع بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية لجرثومة الاشريشية القولونية تمت دراسة فرط الحساسية الانية بعد ٢٤ ساعة من حقن ٠.١ مل من المستضدات الانفة الذكر كلا على حدة في الادمة. اذ بلغ متوسط اقطار التفاعل (ملم) للمستضدات المقتولة والجسمية السوطية ١٦.٦ و ٥.٤ و ١٩.٤ ملم على التوالي. في حين لم تلاحظ علامات فرط الحساسية الانية في حيوانات السيطرة. وكما هو موضح في الشكل (٤-١، أ، ب، ج).



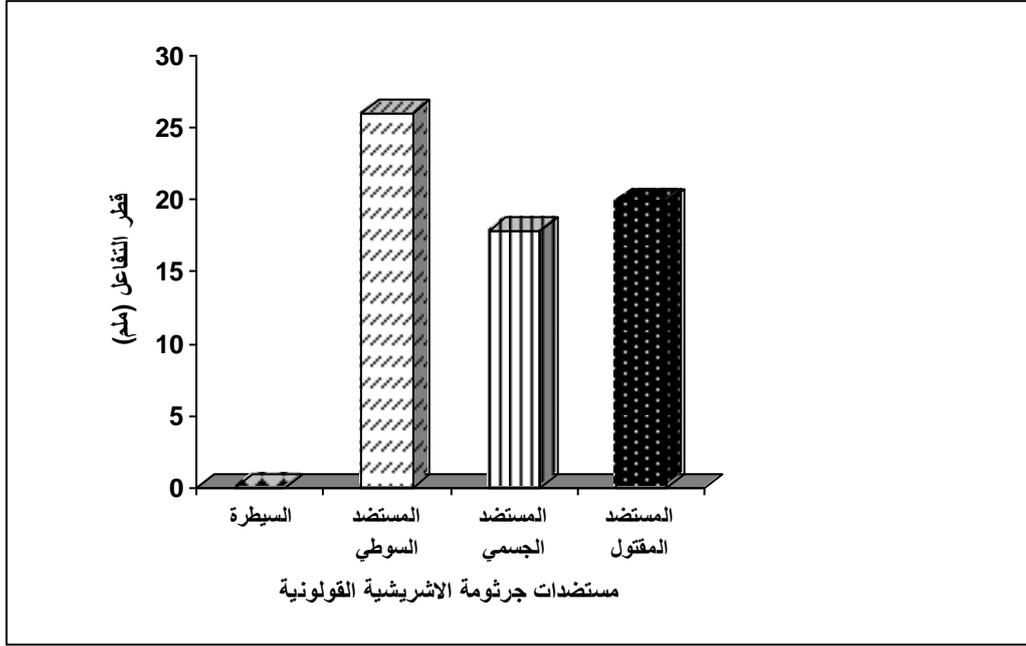
شكل (٤-١) مستويات الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بمستضدات جرثومة *E. coli* والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (ملم) بعد ٢٤ ساعة من حقن المستضدات.

#### ٤-٢-١-١: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في الاستجابة المناعية الخلوية بدلالة فرط الحساسية الانية

جرى احتساب معدل قطر التفاعل (ملم) لتأثير كل انواع مستضدات جرثومة *E. coli* كل على حده. كما تم احتساب الخطأ المعياري. بعد ذلك قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكل من المستضد المقتول-السيطرة، المستضد الجسمي-السيطرة، المستضد السوطي-السيطرة. حيث دلت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $H.S P < 0.01$ ) في قياس الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بين كل انواع المستضدات المدروسة وذلك لعدم وجود مقارنة مع نموذج السيطرة والسبب يعود لعدم وجود استجابة مناعية ضدية لحيوانات السيطرة.

#### ٤-٢-٢: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد

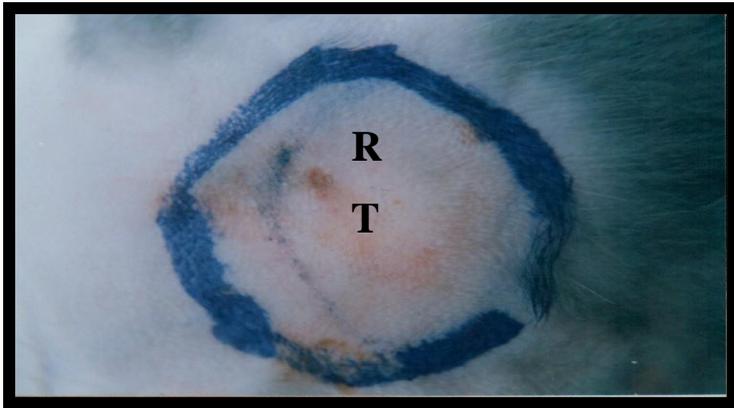
جرى دراسة تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في حيوانات التجربة بدلالة فرط الحساسية المتأخر بدلالة قطر التفاعل (ملم) والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد وذلك بعد مرور ٢٤ ساعة من دراسة تأثير المستضدات *E. coli* في فرط الحساسية الانية، اذ بلغ متوسط اقطار التفاعل للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٢٦ و ١٩.٨ و ٧.٨ ملم على التوالي، في حين لم تلاحظ علامات فرط الحساسية المتأخرة في ارناب السيطرة وكما هو موضح في الشكل (٤-٢) والشكل (٤-١-أ، ب، ج) والشكل (٤-١-ب) والشكل (٤-١-ج).



شكل (٤-٢) مستويات الاستجابة المناعية الخلوية بدلالة فرط الحساسية المتأخر والمتوسط بالخلايا والمختبر في الجلد بدلالة قطر التفاعل (مم) بعد ٤٨ ساعة من حقن مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الارانب.

#### ٤-٢-١: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E.coli* في الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بدلالة فرط الحساسية المتأخر

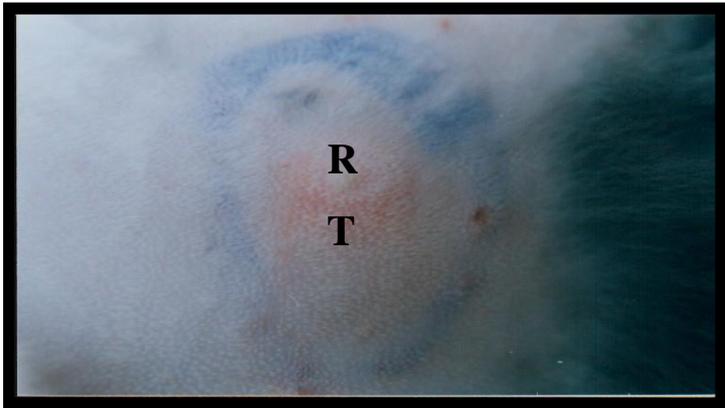
جرى احتساب معدل قطر التفاعل (مم) في الجلد بدلالة فرط الحساسية المتأخر وتم احتساب الخطأ المعياري كل على حده. بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكل انواع المستضدات مع نموذج السيطرة. اذ دلت نتائج التمنييع باستخدام انواع مختلفة من مستضدات هذه الجرثومة ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في قياس الاستجابة المناعية الخلوية المتخصصة بين تلك المستضدات وذلك لعدم وجود مقارنة مع نموذج السيطرة والسبب يعود لعدم وجود استجابة مناعية خلوية لحيوانات السيطرة.



B



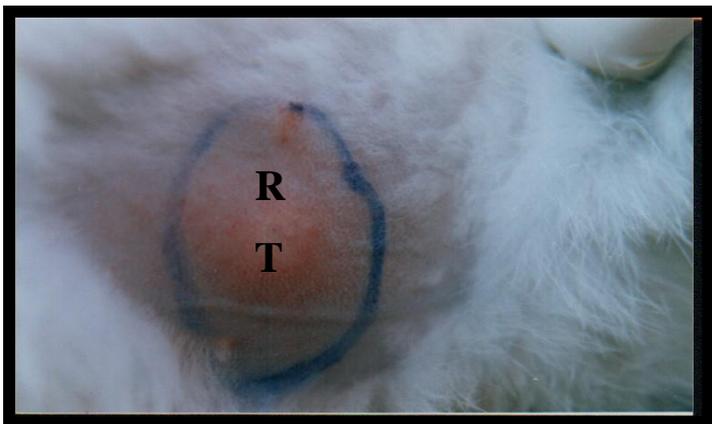
A



B



A



R  
T

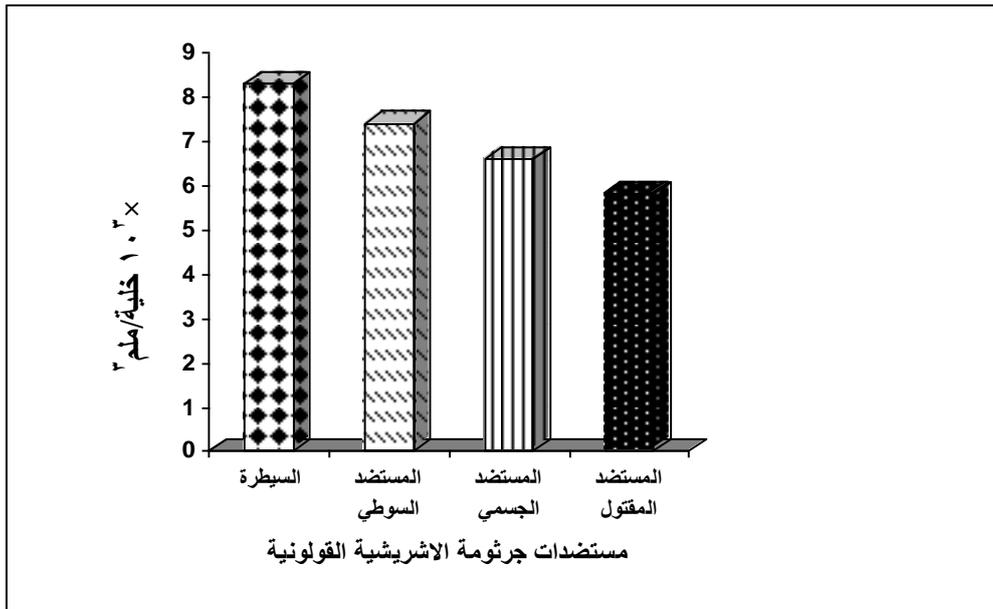


A

(ج) المستضد السوطي

شكل (٤-١): تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية بدلالة فرط الحساسية الأنية والمتأخر للارانب الممنعة بالمستضدات السوطية جرثومة *E. coli*  
 A- بدلالة فرط الحساسية الأنية B- بدلالة فرط الحساسية المتأخر  
 R- الاحمرار T- تتخن

٤-٢-٣: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في العدد الكلي لخلايا الدم البيض  
 جرى اخذ عينات دم من ارانب التجربة وتم عمل مسحات من الدم على السلايد لغرض عد خلايا الدم البيض الكلي ودراسة تأثير كل مستضد في العدد الكلي لتلك الخلايا ومقارنته مع مجموعة السيطرة. اذ بلغ متوسط العدد الكلي لخلايا الدم البيض ٥.٨٢ و ٦.٦ و ٧.٤٨ و  $10^3 \times$  خلية/ملم<sup>٣</sup> للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين كان ذلك المتوسط في عينة السيطرة هو  $8.28 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>٣</sup>، وكما في الشكل (٤-٣).



شكل (٤-٣) مستويات العدد الكلي لخلايا الدم البيض في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

٤-٢-٢-٢: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في العدد الكلي لخلايا الدم البيض

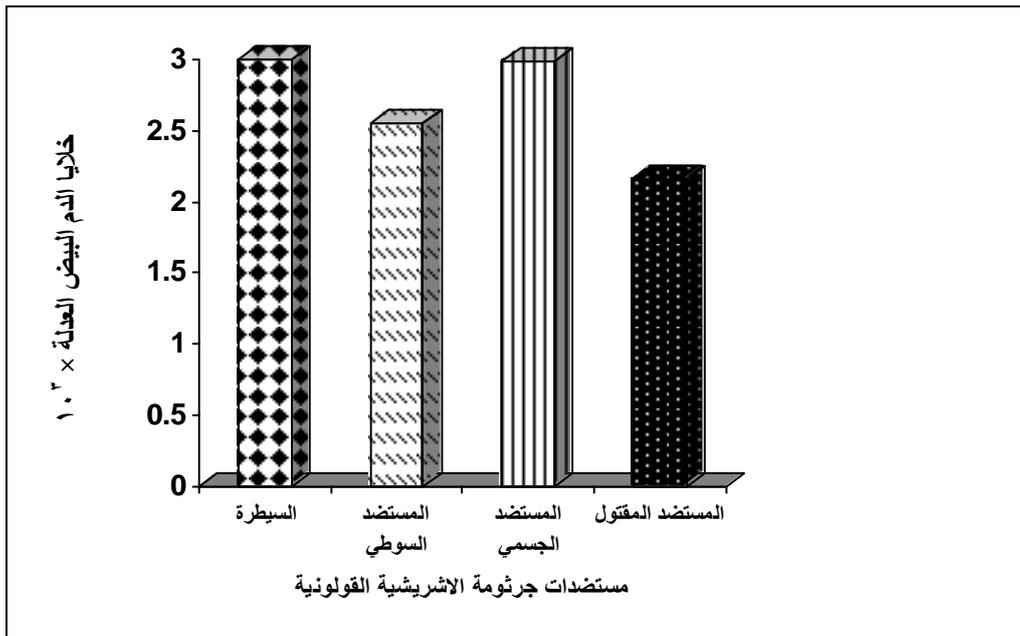
جرى احتساب معدلات العدد الكلي لخلايا الدم البيض لحيوانات كل على حده، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لكل انواع تلك المستضدات وقورنت مع نموذج السيطرة. حيث اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في حساب العدد الكلي لخلايا الدم البيض المستحصلة من حيوانات التجربة بالمقارنة مع نموذج السيطرة.

٤-٢-٤: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في العد التفريقي لخلايا الدم البيض.

يبين جدول (١-٤) وجود تباين في العد التفريقي لخلايا الدم البيض (العدد المطلق) بين حيوانات المعاملة وحيوانات السيطرة. اذ بلغ متوسط عدد خلايا الدم البيض العدلة ٢.٥٥ و ٢.٩٩ و  $١٠^٣ \times ٢.٠٤$  خلية/ملم<sup>٣</sup> للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين كان ذلك المتوسط في نموذج السيطرة  $١٠^٣ \times ٣.١١$  خلية/ملم<sup>٣</sup>، وكما هو موضح في شكل (١-٤-٤).

ويبين الشكل (٢-٤-٤) والجدول (١-٤) ان متوسط اعداد خلايا الدم البيض اللمفية للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية كان ١.٦٥ و ١.٢٥ و ١.١٤  $\times ١٠^٣$  خلية/ملم<sup>٣</sup> على التوالي، بينما كان ذلك المتوسط في نموذج السيطرة ٢.٦١. ان متوسط عدد الخلايا وحيدة النواة الدموية قد بلغ ٠.٠١٥ و ٠.٠٠٤ و ٠.٠٠٢  $\times ١٠^٣$  خلية/ملم<sup>٣</sup> للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي. بينما كان المتوسط في حيوانات السيطرة  $٠.٣٥ \times ١٠^٣$  خلية/ملم<sup>٣</sup> (شكل ٣-٤-٤).

اما متوسط عدد خلايا الدم البيض الحمضة قد بلغ ٠.٠٠٣ و ٠.٠١٣ و ٠.٠٠٦  $\times ١٠^٣$  خلية/ملم<sup>٣</sup> للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين بلغ ذلك المتوسط لحيوانات السيطرة  $٠.٠٩٨ \times ١٠^٣$  خلية/ملم<sup>٣</sup> (شكل ٤-٤-٤).

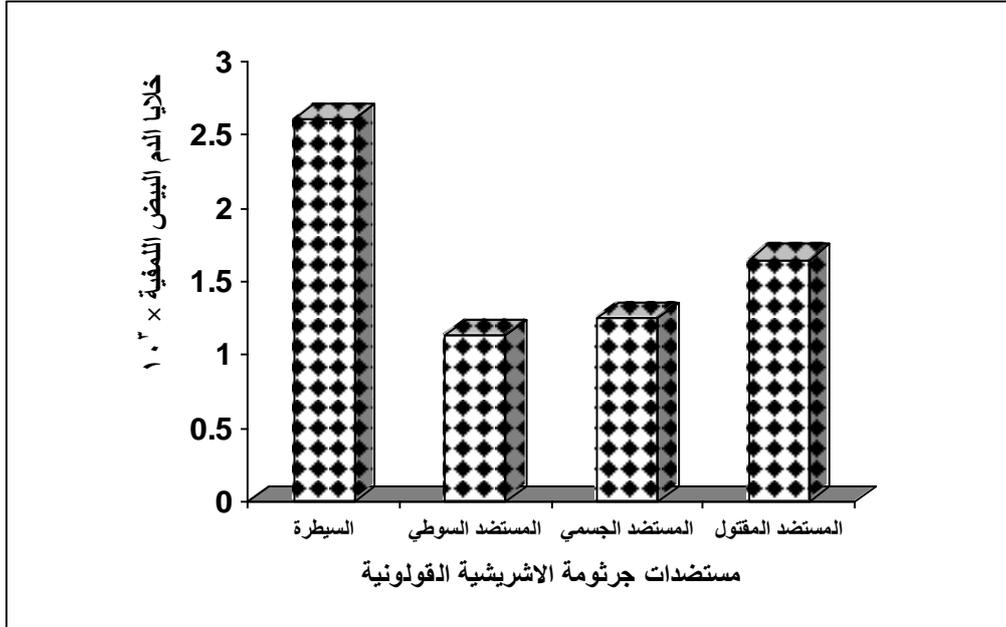


شكل (٤-٤-١) مستويات خلايا الدم البيض العدلة (Neutrophils) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

#### ٤-٢-٢-٢: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض العدلة وتأثيرها في الاستجابة المناعية الخلوية.

جرى احتساب معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيض العدلة لحيوانات التجربة كل على حده، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات وقورنت مع نموذج السيطرة. حيث دلت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) لتمنيح المستضد المقتول مقارنة

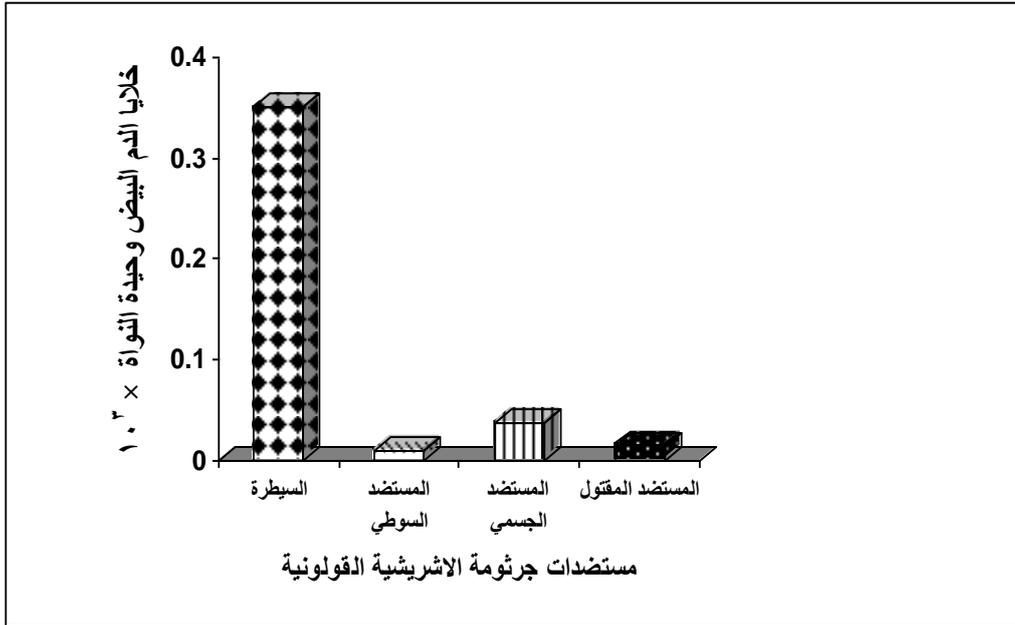
مع المستضد الجسمي والمستضد السوطي، كما نلاحظ ان هنالك فرقاً غير معنوي لنتائج التمنيع لكل انواع مستضدات جرثومة *E. coli* مقارنة مع نموذج السيطرة.



شكل (٤-٤-٢) مستويات خلايا الدم البيضاء اللمفية (Lymphocytes) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

#### ٤-٢-٢-٢: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيضاء اللمفية وتأثيرها في الاستجابة المناعية الخلوية.

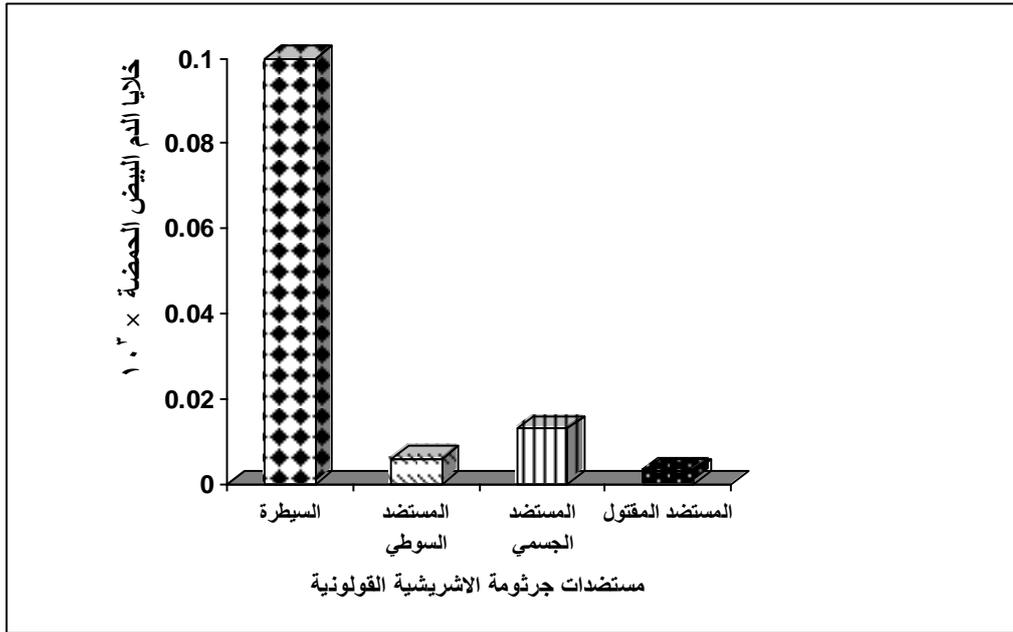
جرى احتساب معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيضاء اللمفية لحيوانات التجربة ولكل حالة على حده، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات وتمت مقارنتها مع نموذج السيطرة. حيث اظهرت نتائج التمنيع بتلك المستضدات ان هنالك فرقاً معنوياً جداً  $P < 0.01$  في العد التفريقي لخلايا الدم البيضاء اللمفية لتمنيع المستضد المقتول مقارنة مع المستضد السوطي ونموذج السيطرة، ولم يلاحظ أي فرق معنوي لنتائج تمنييع المستضد المقتول مقارنة مع المستضد الجسمي. كما دلت النتائج على فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) لتمنييع المستضد الجسمي مقارنة مع المستضد السوطي وكذلك الحال بالمقارنة مع نموذج السيطرة.



شكل (٤-٤-٣) مستويات خلايا الدم البيض وحيدة النواة (Monocytes) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*

#### ٤-٣-٣: التقويم الاحصائي لخلايا الدم البيض وحيدة النواة Monocytes وتأثيرها في الاستجابة المناعية الخلوية.

بعد انتهاء فترة التمنيع بالمستضدات واخذ عينات دم من حيوانات التجربة تم حساب معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيض وحيدة النواة Monocytes في الحيوانات الممنعة، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لكل انواع مستضدات هذه الجرثومة ومقارنتها مع نموذج السيطرة. حيث دلت نتائج التمنيع بهذه المستضدات ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في العد التفريقي لخلايا الدم البيض وحيدة النواة في الحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي ونموذج السيطرة. وكذلك هو الحال للحيوانات الممنعة بالمستضدات الجسمية والسوطية بالمقارنة مع نموذج السيطرة. في حين لم يلاحظ أي فرق معنوي بين الحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد السوطي وكذلك هو الحال بالنسبة للارانب الممنعة بالمستضد الجسمي بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد السوطي.



شكل (٤-٤-٤) مستويات خلايا الدم البيضاء الحمضة (Eosinophils) في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

#### ٤-٤-٢-٤: التقويم الاحصائي للعد التفريقي لخلايا الدم البيضاء الحمضة وتأثيرها في الاستجابة المناعية الخلوية.

بعد انتهاء فترة التمنيع واخذ عينات دم من حيوانات التجربة تم حساب معدلات العد التفريقي لخلايا الدم البيضاء الحمضة في الحيوانات الممنعة، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لتلك المستضدات ومقارنتها مع نموذج السيطرة. وتبين من نتائج التمنيع ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في العد التفريقي لخلايا الدم البيضاء الحمضة في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية بالمقارنة مع نموذج السيطرة. كما اظهرت النتائج وجود فرق غير معنوي في الحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول بالمقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي.

#### ٤-٣-٤: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في الاستجابة المناعية الخلوية.

#### ٤-٣-١: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز البروتين الكلي وأثره في الاستجابة المناعية الخلوية.

تم قياس تركيز البروتين الكلي (غم/لتر) لكل الارانب الممنعة وكذلك ارانب السيطرة. حيث بلغ متوسط تركيز البروتين الكلي ٨٧.٣ و ٨٣.٩ و ٨٠.٦٩ (غم/لتر) للارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي، في حين كان متوسط التركيز في نموذج السيطرة ٦٥.٥ غم/لتر (جدول ٤-٢).

جدول (٤-٢) تراكيز البروتين الكلي (غم/لتر) في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

نوع المستضد	العدد Number	معدل تركيز البروتين (غم/ لتر) $\pm$ الخطأ المعياري
السيطرة	١٠	٢.٢٩ $\pm$ ٦٥.٥١
المستضد السوطي	١٠	١.٤٧ $\pm$ ٨٠.٦
المستضد الجسمي	١٠	١.٢١ $\pm$ ٨٣.٩
المستضد المقتول	١٠	٠.٤٨ $\pm$ ٨٧.٣

٤-٣-٢: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز البروتين الكلي وتأثيره في الاستجابة المناعية الخلوية.

اظهرت نتائج التمنيع ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في تركيز البروتين الكلي غم/لتر بين كل الحيوانات الممنعة بالمقارنة مع حيوانات السيطرة، كما يلاحظ ان هنالك فرقاً غير معنوي في تركيز البروتين الكلي للارانب الممنعة بالمستضد المقتول مقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي. وكذلك الحال بالنسبة لتلك الممنعة بالمستضد الجسمي بالمقارنة مع الممنعة بالمستضد السوطي.

٤-٣-٢: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما وأثره في الاستجابة المناعية الخلوية

جرى الحصول على الامصال من الحيوانات الممنعة وقيس تركيز الكلوبولين المناعي-كاما غم/لتر لكل من امصال حيوانات التجربة الممنعة وحيوانات السيطرة، اذ بلغ متوسط تركيز الكلوبولين المناعي-كاما للارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٤١.٧ و٤٦.٢ و٣٨.١ غم/لتر على التوالي، في حين كان ذلك المتوسط في ارانب السيطرة ٣٢.٤١ غم/لتر وكما هو موضح في الجدول (٤-٣).

جدول (٣-٤) تركيز الكلوببولين المناعي-كاما (غم/لتر) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

معدل تركيز الكلوببولين المناعي-كاما (غم/لتر) $\pm$ الخطأ المعياري	العدد Number	نوع المستضد
$0.09 \pm 32.41$	١٠	السيطرة
$0.95 \pm 38.1$	١٠	المستضد السوطي
$0.85 \pm 46.8$	١٠	المستضد الجسمي
$1.92 \pm 41.7$	١٠	المستضد المقتول

هنالك فرقاً معنوياً جداً بمستوى احتمالية ( $P < 0.01$ ).

٣-٤-٢: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوببولين المناعي-كاما.

اذ اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً غير معنوي في تركيز الكلوببولين المناعي-كاما غم/لتر لنتائج التمنيح بالمستضد المقتول مقارنة مع نتيجة التمنيح بالمستضد الجسمي. كما تبين ان هنالك فرقاً معنوياً ( $P > 0.05$ ) لنتائج التمنيح بالمستضد السوطي مقارنة مع نموذج السيطرة. كما لوحظ ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) لنتائج التمنيح بالمستضد الجسمي مقارنة مع التمنيح بالمستضد السوطي وكذلك الحال عند مقارنته مع نموذج السيطرة.

٣-٣-٤: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوبولين المناعي IgG. تم تقدير مستوى الكلوبولين المناعي IgG في امصال حيوانات التجربة الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli* وكذلك حيوانات السيطرة بواسطة طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد. اذ بلغ متوسط تركيز الكلوبولين المناعي IgG في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ١٦١٥.٩ و ٢٢٠٣ و ١٤٢٢ mg/dL على التوالي، بينما بلغ المتوسط في نموذج السيطرة ٨٤٧ ملغم/دسي لتر (جدول ٤-٤).

جدول (٤-٤) تركيز الكلوبولين المناعي IgG (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

نوع المستضد	العدد Number	معدل تركيز الكلوبولين المناعي IgG (ملغم/دسي لتر) ± الخطأ المعياري
السيطرة	١٠	٠.٢٢ ± ٨٤٧
المستضد السوطي	١٠	٧٧.٥ ± ١٤٢٢.٠
المستضد الجسيمي	١٠	٧٩.٧ ± ٢٢٠٣.٠
المستضد المقتول	١٠	١٥٢.٧ ± ١٦١٥.٩

هنالك فرقاً معنوياً جداً عند مستوى احتمالية (P < ٠.٠١).

١-٣-٣-٤: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوبولين المناعي IgG.

اظهرت نتائج التمنيع ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في تركيز الكلوبولين المناعي IgG ملغم/دسي لتر في الارانب الممنعة بالمستضد المقتول مقارنة مع تلك الممنعة بالمستضد الجسمي ونموذج السيطرة. وكذلك الحال بالنسبة لنتائج التمنيع بالمستضد الجسمي بالمقارنة مع التمنيع بالمستضد السوطي ونموذج السيطرة. لم يلاحظ أي فرق معنوي عند التمنيع بالمستضد المقتول مقارنة مع التمنيع بالمستضد السوطي.

٤-٣-٤: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوبولين المناعي IgM. بلغ متوسط التركيز في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ١٧٤.٤ و ٣٢٦.٩ و ٢٤٩.٨ ملغم/دسي لتر على التوالي، بينما بلغ المتوسط في نموذج السيطرة ١١٤.٦ ملغم/دسي لتر (جدول ٤-٥).

جدول (٤-٤) تركيز الكلوبولين المناعي IgM (ملغم/دسي لتر) المتخصص في الارانب الممنعة بأنواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.

نوع المستضد	العدد Number	معدل تركيز الكلوبولين المناعي IgM (ملغم/دسي لتر) $\pm$ الخطأ المعياري
السيطرة	١٠	١٠.١ $\pm$ ١١٤.٦

المستضد السوطي	١٠	١٢.٥±٢٤٩.٨
المستضد الجسمي	١٠	١٦±٣٢٦.٩
المستضد المقتول	١٠	١٠.٣±١٧٤.٤

٤-٣-٤-٢: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوبولين المناعي IgM.

جرى احتساب معدلات تركيز الكلوبولين المناعي IgM في امصال حيوانات التجربة كل على حده وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري وقورن مع نموذج السيطرة. اذ اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في تركيز الكلوبولين المناعي IgM ملغم/دسي لتر بين الارانب الممنعة بالمستضدات المختلفة لجرثومة الاشريشية القولونية بالمقارنة مع حيوانات السيطرة.

٤-٣-٥: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوبولين المناعي IgA.

تم قياس تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في تركيز الكلوبولين المناعي IgA لجميع امصال حيوانات التجربة والسيطرة. اذ بلغ متوسط تركيز الكلوبولين المناعي IgA للمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٢٢٢.٧ و ٥٧٧.٥ و ٤٢٣.٤ ملغم/دسي لتر على التوالي، في حين بلغ المتوسط في نموذج السيطرة ٢٠٧.٨ ملغم/دسي لتر (جدول ٤-٦).

جدول (٤ - ٦) تركيز الكلوبولين المناعي IgA (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية.

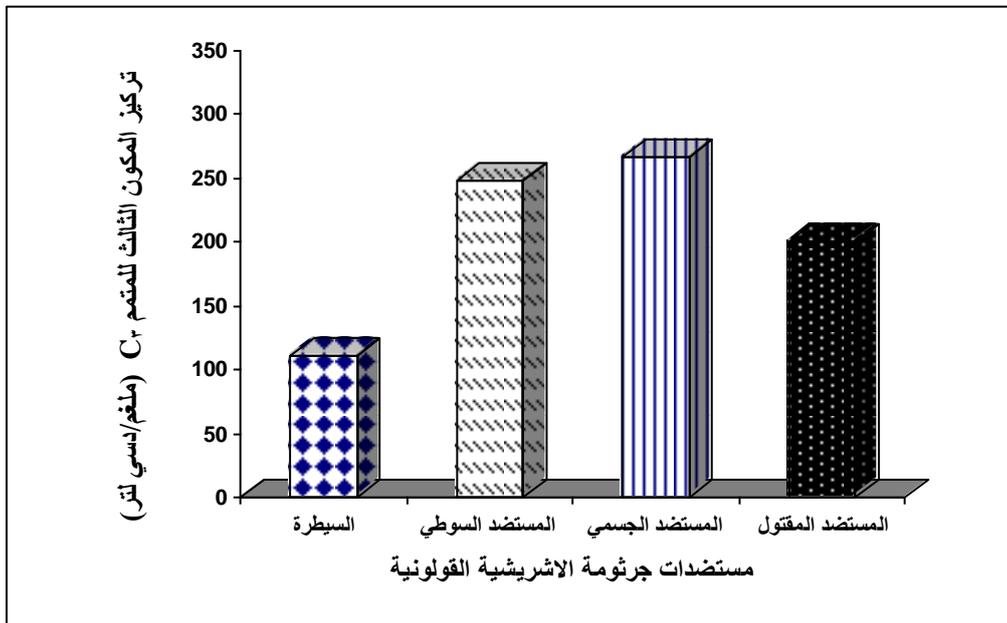
نوع المستضد	العدد Number	معدل تركيز الكلوبولين المناعي IgA (ملغم/دسي لتر) ± الخطأ المعياري
-------------	-----------------	--

السيطرة	١٠	١٧.٤±٢٠٧.٨
المستضد السوطي	١٠	١٦.٢±٤٢٣.٤
المستضد الجسمي	١٠	١٩.٤±٥٧٧.٥
المستضد المقتول	١٠	٢٤.٤±٢٩٢.٧

٣-٥-٣-٤: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز الكلوبولين المناعي IgA.

دللت نتائج التمنيع بهذه المستضدات ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في تركيز الكلوبولين المناعي IgA ملغم/دسي لتر بين امصال ارناب التجربة بالمقارنة مع حيوانات السيطرة.

٦-٣-٤: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز المكون الثالث للمتمم (C<sub>٣</sub>). بلغ متوسط التركيز في الارانب المنعقة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسطحية ٢٠٠.٩ و ٢٦٦.٥ و ٢٤٨.٥ ملغم/دسي لتر على التوالي، بينما بلغ المتوسط في نموذج السيطرة ١١٠.٩ ملغم/دسي لتر (الشكل ٥-٤).



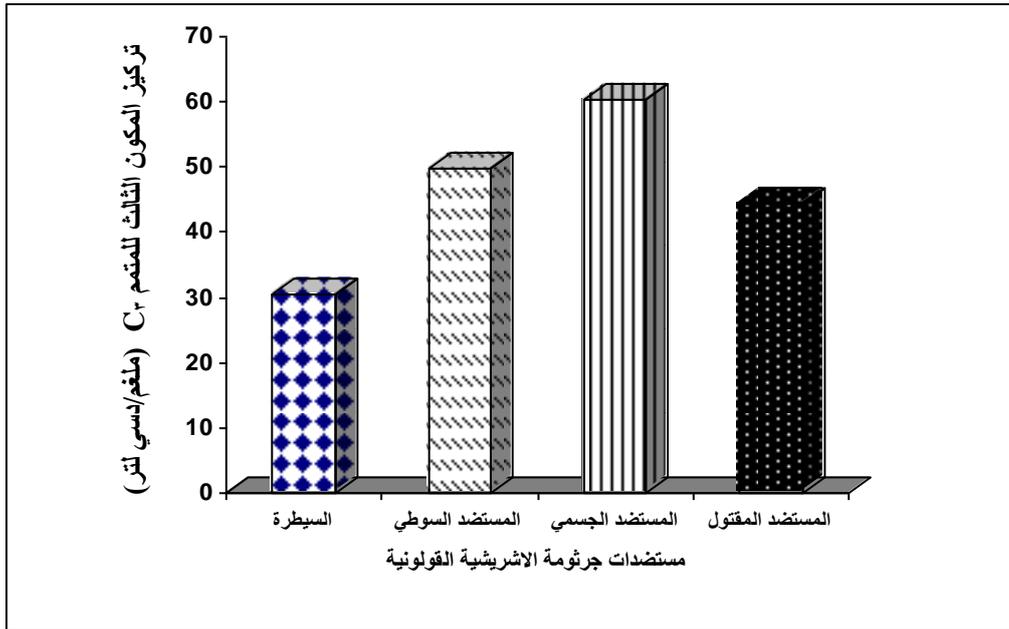
شكل (٤-٥) مستويات تراكيز المكون الثالث للمتمم C<sub>٣</sub> (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

٤-٣-٦-٢: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز المكون الثالث للمتمم C<sub>٣</sub>.

اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) في قيمة المكون الثالث للمتمم بين الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية بالمقارنة مع نموذج السيطرة.

٤-٣-٧: تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في تركيز المكون الرابع للمتمم C<sub>٤</sub>. بلغ متوسط التركيز في الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ٤٤.٤ و ٦٠.٤ و ٤٩.٩ ملغم/دسي لتر على التوالي، في حين كان المتوسط في نموذج السيطرة ٣٠.٥ mg/dL. وكما هو موضح في الشكل (٤-٦).

شكل (٤-٦) مستويات تراكيز المكون الرابع للمتمم C<sub>٤</sub> (ملغم/دسي لتر) المتخصص في مصول الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.



٤-٣-٧-٥: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في مستوى تركيز المكون الرابع للمتمم C<sub>٤</sub>.

اظهرت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) لتقدير المكون الرابع للمتمم (ملغم/دسي لتر) بين الارانب الممنعة بالمستضدات المختلفة لتلك الجرثومة مقارنة مع نموذج السيطرة.

#### ٤-٣-٨: تأثير مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في عيار الضد وأثره في الاستجابة المناعية الخلطية

حدد مدى عيار الضد المتخصص لكل مستضد من مستضدات تلك البكتريا، فكان متوسط العيارات في امصال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية ١٧٢٢ و ٥١٢ و ٤١٦ على التوالي، بينما بلغ متوسط عيار الضد لنموذج السيطرة ٠ وقورنت عيارات الضد مع تراكيز الكلوبوليين المناعي-كاما المتخصصة بمستضدات هذه وكما هو موضح في جدول (٧-٤).

جدول (٧-٤) عيار الكلوبولينات المناعية وتركيز الكلوبولين المناعي-كاما (ملغم/دسي لتر) المتخصص في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

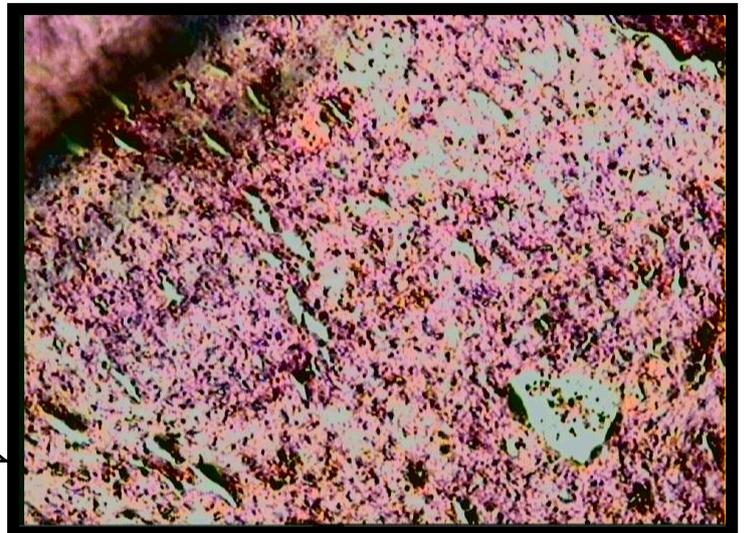
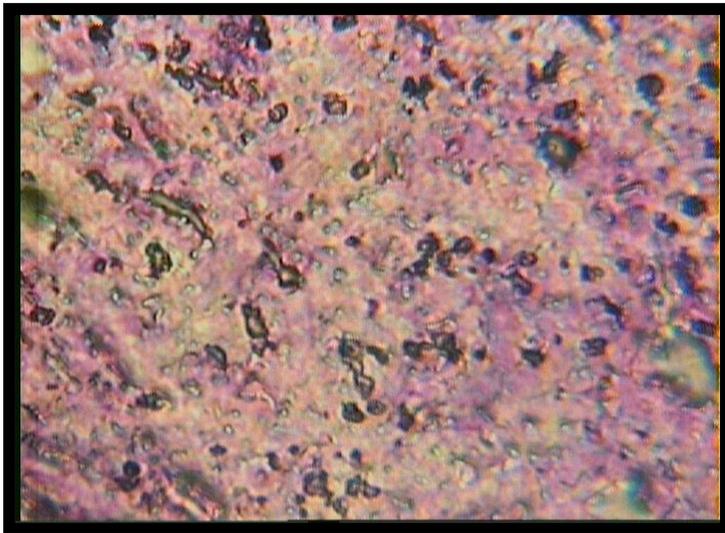
المتوسط $\pm$ الخطأ المعياري		العدد Number	نوع المستضد
العيار	التركيز mg/dL		
٠	٠.٥٩ $\pm$ ٣٢.٤١	١٠	السيطرة
٩٦ $\pm$ ٤١٦	٠.٥٩ $\pm$ ٣٨.١	١٠	المستضد السوطي
٧٨.٣ $\pm$ ٥١٢	٠.٨٥ $\pm$ ٤٦.٢	١٠	المستضد الجسيمي
٣١٣.٢ $\pm$ ١٧٢٢	٢.٠٥ $\pm$ ٤١.٧	١٠	المستضد المقتول

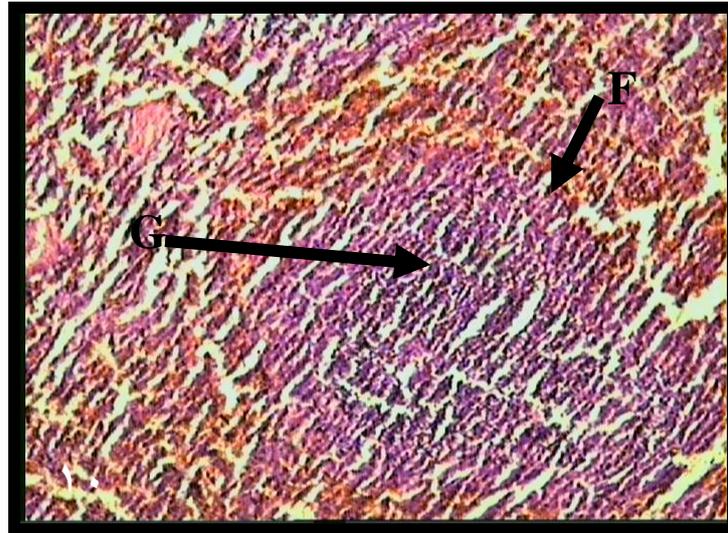
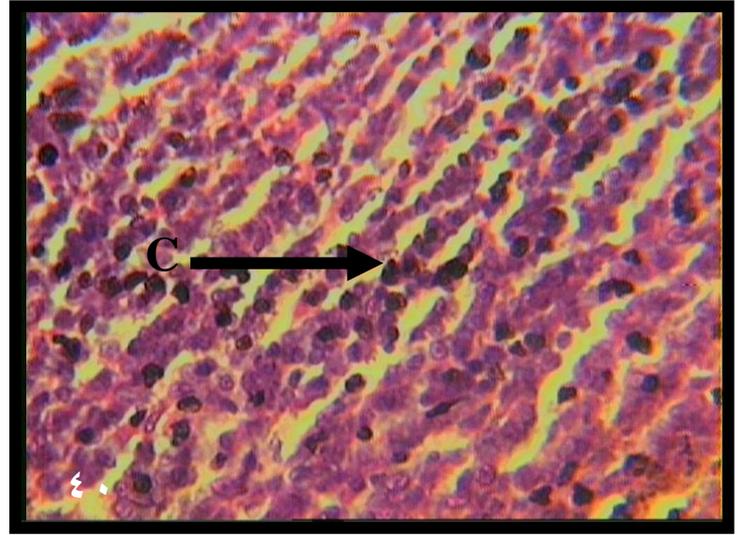
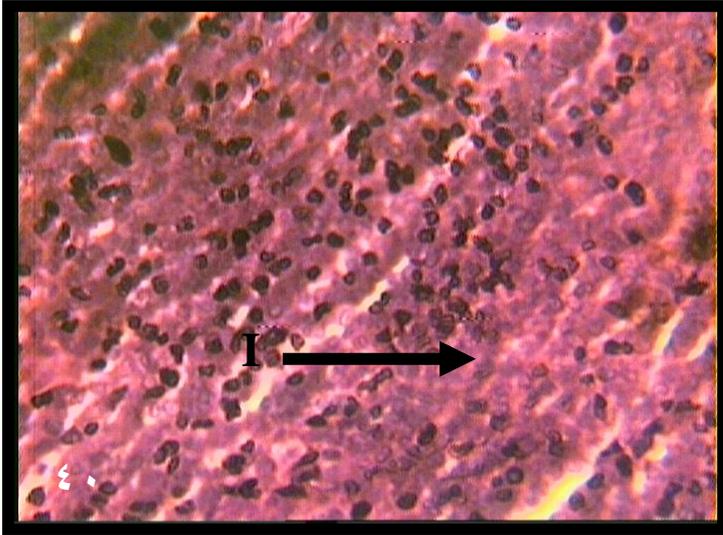
#### ٤-٣-٨-١: التقويم الاحصائي لتأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في عيار الضد وتأثيره في الاستجابة المناعية الخلطية.

جرى احتساب معدل عيارات الضد المتخصص بمستضدات جرثومة *E. coli* ، وكذلك تم احتساب الخطأ المعياري لكل حالة على حده، بعدها قورنت هذه المعدلات والخطأ المعياري لكل انواع المستضدات للمستضد المقتول- سيطرة، والمستضد الجسيمي- سيطرة والمستضد السوطي- سيطرة. حيث اوضحت نتائج التمنيح ان هنالك فرقاً معنوياً جداً ( $P < 0.01$ ) بين تركيز الكلوبولين المناعي- كاما في الارانب الممنعة بالمستضد المقتول وعيارية التفاعل والشيء ذاته ينطبق على الارانب الممنعة بالمستضدات الجسمية والسوطية عند مقارنتها مع نماذج السيطرة.

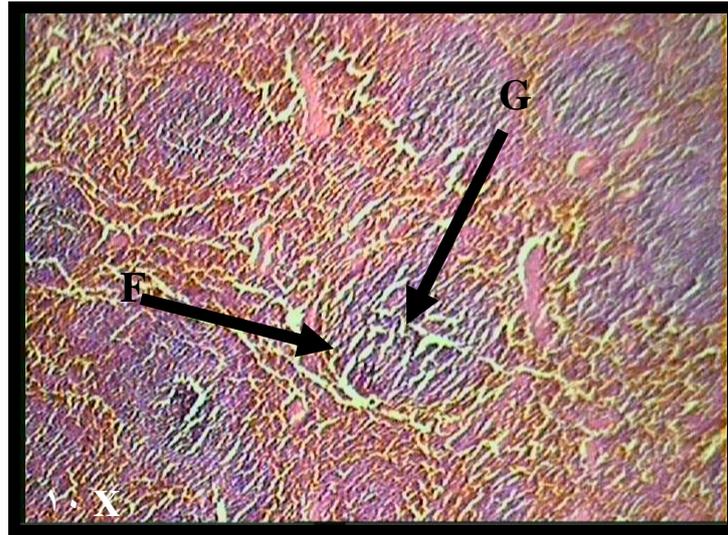
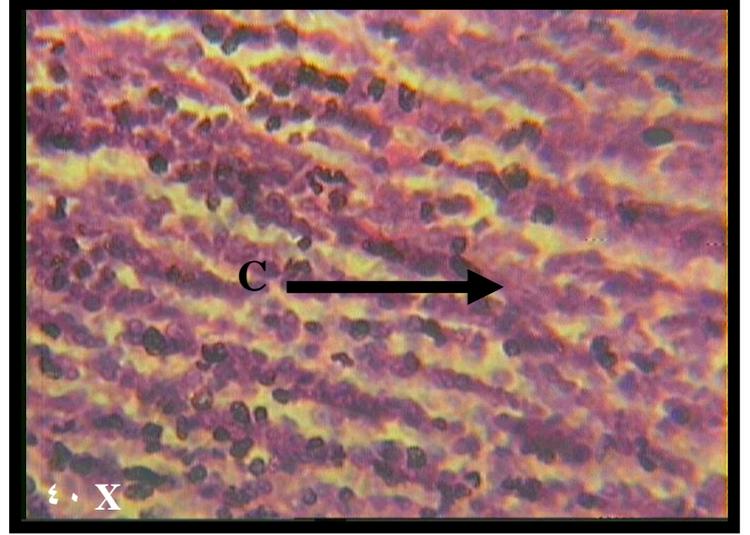
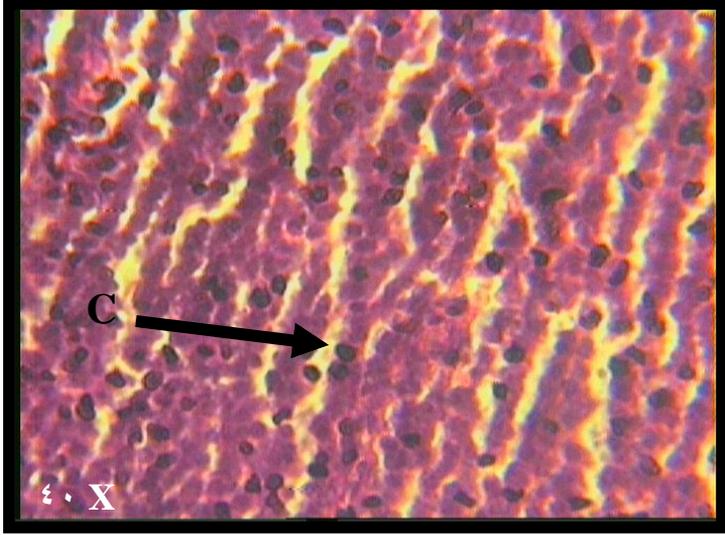
#### ٤-٤: التغييرات النسجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات جرثومة *E. coli*.

اظهرت نتائج تمنيع الارانب بأنواع مختلفة من مستضدات تلك الجرثومة ان هنالك تغييرات نسجية متباينة في طحال الارانب، حيث وجد تباين في الاحتقان الدموي وتكتأثير الخلايا الحويصلية وتغلغل الخلايا الالتهابية ووضوح المركز الانتاشي. اذ كان الاحتقان الدموي في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية شديداً، شديداً وضعيفاً على التوالي. كما نلاحظ ايضاً ان هنالك اختلافاً في تكتأثير الخلايا الحويصلية اذ كان متوسطاً، ضعيفاً ومتوسطاً في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي. كما دلت النتائج على ان تغلغل الخلايا الالتهابية كان ضعيفاً، متوسطاً ومتوسطاً في طحال الارانب المحقونة بالمستضدات المقتولة والجسمية والسوطية على التوالي. في حين كان هنالك وضوح شديد في المركز الانتاشي لكل حيوانات المعاملة (جدول ٤-٨).

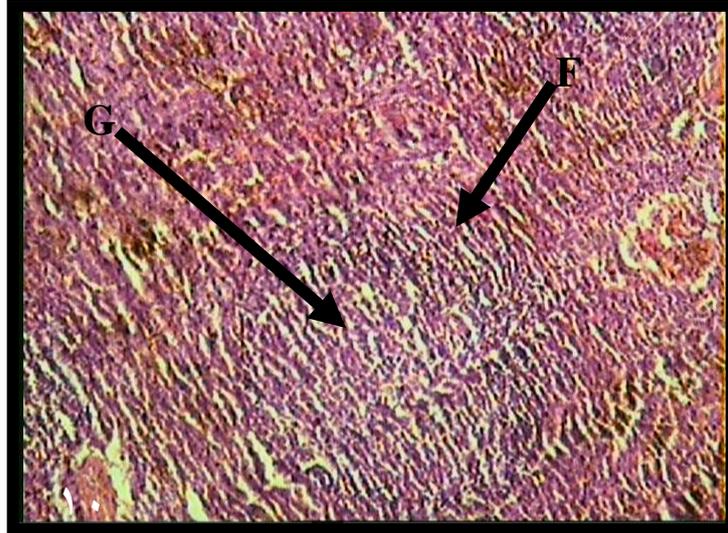
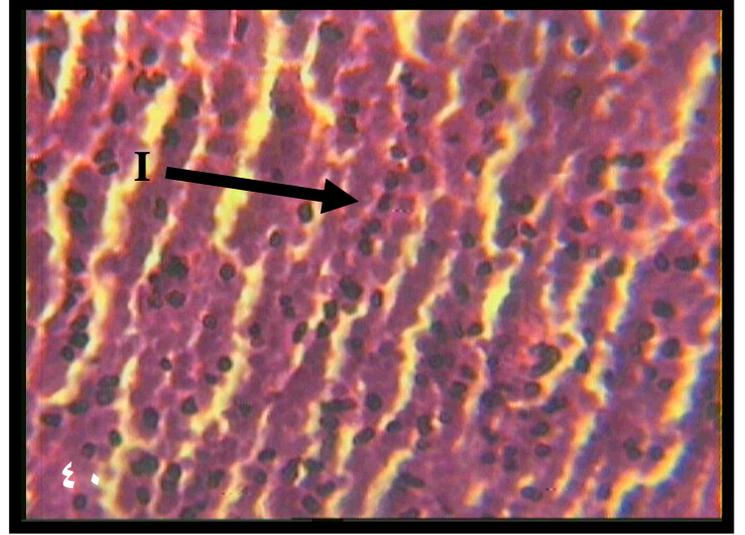
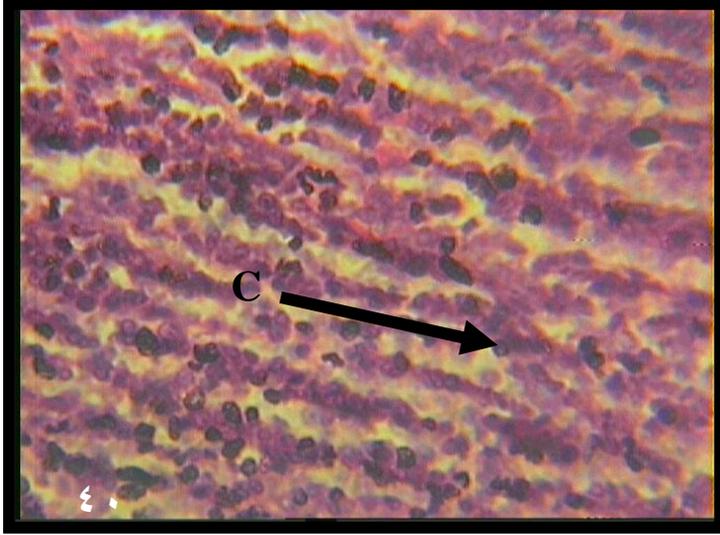




شكل (٨-٤): التغيرات النسجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات المقتولة Killed Antigen مختلفة لجرثومة الاشريشية القولونية: G المركز الانتاشي  
F الخلايا الحويصلية C الاحتقان الدموي I الخلايا الالتهابية



شكل (٩-٤): التغيرات النسجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات الجسمية  
 مختلفة لجرثومة الاشريشية القولونية: G المركز الانتاشي  
 F الخلايا الحويصلية C الاحتقان الدموي I الخلايا الالتهابية



شكل (١٠-٤): التغيرات النسجية الحاصلة في طحال الارانب الممنعة بالمستضدات السوطية  
Flagellar Antigen مختلفة لجرثومة الاشريشية القولونية: G المركز الانتاشي  
F الخلايا الحويصلية C الاحتقان الدموي I الخلايا الالتهابية

جدول (٤-١) معدلات العد التفرقي لخلايا الدم البيض في الارانب الممنعة بانواع مختلفة من مستضدات *E. coli*.

نوع المستضد	العدلات	الخلايا اللمفية	خلايا وحيدة النواة	الخلايا الحمضة
	المتوسط $\pm$ الخطأ المعياري			
السيطرة	٠.١٨ $\pm$ ٣.١١	٠.١٤ $\pm$ ٢.٦١	٠.٠١٣ $\pm$ ٠.٣٥	٠.٠٠٠٣ $\pm$ ٠.٠٩٨
المستضد السوطي	٠.١٢ $\pm$ ٢.٠٤	٠.٠٧ $\pm$ ١.١٤	٠.٠٠١ $\pm$ ٠.٠٢	٠.٠٠٠٢ $\pm$ ٠.٠٠٦
المستضد الجسمي	٠.١٤ $\pm$ ٢.٩٩	٠.٠٨ $\pm$ ١.٢٥	٠.٠٠٢ $\pm$ ٠.٠٤	٠.٠٠٠٢ $\pm$ ٠.٠١٣
المستضد المقتول	٠.١٣ $\pm$ ٢.٥٥	٠.٩٢ $\pm$ ١.٦٥	٠.٠٠١ $\pm$ ٠.٠٢	٠.٠٠٠٢ $\pm$ ٠.٠٠٣

جدول (٤-٨): التغيرات النسبية المختلفة لطحال الارانب الممنعة بأنواع مختلفة من مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية *E. coli*.

المستضد السوطي			المستضد الجسمي			المستضد المقتول			صفة التغير النسيجي
شديد	متوسط	ضعيف	شديد	متوسط	ضعيف	شديد	متوسط	ضعيف	
		++	+++			++			الاحتقان الدموي
	++				+		++		تكاثر الخلايا الحويصلية
	++			+++				++	تغلغل الخلايا الالتهابية
++			+++			++			وضوح المركز الانتاشي

+ مستوى التغير

**Recommendations****الاستنتاجات**

- من خلال النتائج المستحصلة من تمنيع مستضدات جرثومة الاشريشية القولونية في الارانب المحلية تبين ان مستضدات تلك الجرثومة تحفز الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية للجهاز المناعي للارانب ووجود فروق بمستوى معنوي جداً بين تأثير مستضدات جرثومة *E. coli* في مصول الارانب المعاملة ونموذج السيطرة، وكانت هذه الفروق متمثلة ب:-
١. بدلالة فرط الحساسية الانية والمتأخر كان المستضد السوطي الاكثر تأثيراً من بين تلك المستضدات مقارنة مع نموذج السيطرة.
  ٢. زيادة تراكيز الكلوبولينات المناعية IgM و IgG و IgA وبمستوى عالي المعنوية بين تلك المستضدات ونموذج السيطرة وكان المستضد الجسمي الاكثر تأثيراً بين تلك المستضدات ونموذج السيطرة، وكذلك الحال في تركيز المكون الثالث C<sub>٣</sub> والرابع C<sub>٤</sub> للمتمم ونفس الشيء في تركيز الكلوبولين المناعي-كاما.
  ٣. وجود فرق معنوي جداً في تركيز البروتين الكلي لمصول حيوانات المعاملة بمستضدات جرثومة *E.coli* ونموذج السيطرة وكان المستضد المقتول هو الاكثر تأثيراً.
  ٤. حدوث انخفاض واضح في العدد الكلي لخلايا الدم البيض Leukopenia وفي العد التفرقي لخلايا الدم البيض وبمستوى معنوي عالي جداً ( $P < 0.01$ ) بين حيوانات المعاملة ونموذج السيطرة وبصورة متباينة بين المستضدات المقتولة والسوطية ثم الجسمية.
  ٥. حدوث تغيرات نسجية واضحة ومتباينة ومتقاربة في طحال الارانب الممنعة بتلك المستضدات وكان المستضد الجسمي الاكثر تأثيراً في الاحتقان الدموي وتكاثر الخلايا الحويصلية وتغلغل الخلايا الالتهابية ووضوح المركز الانتاشي.

**التوصيات**

١. اجراء دراسات مماثلة على انواع اخرى من بكتريا سالبة صبغة جرام ومعرفة المستضدات الاكثر تأثيراً.
٢. العمل مستقبلاً على تحضير لقاحات Vaccines للمستضدات العائدة لبكتريا سالبة جرام واستعمالها في تحفيز الجهاز المناعي.
٣. اعتماد طريقتي التمنيع وفصل المصول المضادة المستخدمة في هذا البحث في التجارب المناعية القادمة وذلك لثبوت كفاءتها.