



دراسة العوامل المرضية في بكتيريا السيدوموناس ايريجنوزا

رسالة مقدمة من

هند مصطفى محمد سليم

للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم

في

الميكروبيولوجي

وقد تمت مناقشة الرسالة والموافقة عليها

اللجنة :

١- أ.د/ ثروت السيد الدسوقي رضوان

استاذ الميكروبيولوجي- قسم النبات- كلية العلوم- جامعة الفيوم.

٢- أ.د. نادية حامد عبد السلام البتانوني

أستاذ الميكروبيولوجي- قسم التنمية المتواصلة للبيئة وادارة مشروعاتها

معهد الدراسات والبحوث البيئية - جامعة مدينة السادات.

٣- أ.د / خطيب سعيد اسماعيل

أستاذ الميكروبيولوجي – قسم البيولوجي – كلية العلوم – جامعة جيزان-
السعودية.

دراسة العوامل الممرضة في بكتيريا السيدوموناس ايريجنو

رسالة مقدمة من

هند مصطفى محمد سليم

لجنة الإشراف العلمى

أ.د/ ثروت السيد الدسوقي رضوان) مشرف رئيسى (

استاذ الميكروبيولوجى قسم النبات كلية العلوم جامعة الفيوم.

د/ امانى محمد محمد رياض

مدرس الميكروبيولوجى قسم النبات كلية العلوم جامعة الفيوم.

Dr/ Andreas Diepold

معهد ماكس بلانك للميكروبيولوجيا الأرضية – المانيا.



دراسة العوامل الممرضة في بكتيريا السيدوموناس ايريجنوزا

مقدمة من

هند مصطفى محمد سليم

بكالوريوس العلوم في النبات والكيمياء - ٢٠١١
ماجستير العلوم في الميكروبيولوجي - ٢٠١٥

للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم
في
الميكروبيولوجي
قسم النبات

جامعة الفيوم

٢٠٢٤

الملخص العربي

السيدوموناس ايريجنوزا (*P. aeruginosa*) هي بكتيريا انتهازية سالبة الجرام. وهي احدى الكائنات الممرضة المقاومة للعديد من الأدوية و لها اهمية طبية كبيرة. نظام الإفراز الثالث (T3SS) و هو احدى العوامل الممرضة و الضارية في هذه البكتيريا و يرتبط وجوده بمقاومة عالية للمضادات الحيوية و نسب مرتفعة لمعدلات الوفاة في الانسان. بالإضافة الى ذلك، تتميز السلالات التي تحتوى على هذا النظام نشط بأنها مستديمة و تزيد من شدة المرض في الإنسان و هذا ما يظهر في دورها في تدهور الإصابات في المستشفيات. يطلق نظام الإفراز الثالث على الأقل ثلاثة بروتينات ممرضه في خلية العائل مثل ExoS و ExoT و ExoU و ExoY.. هذه البروتينات تتداخل مع الجهاز المناعي للكائن المصاب عن طريق تعطيل الهيكل الخلوي ، وتمنع البلعمة ، وتسبب ضمور الخلية .

الهدف من هذه الدراسة هو فهم وظيفة ونشاط وتنظيم T3SS . بالإضافة إلى ذلك ، فإن المقارنة بين المسارات التنظيمية لهذا النظام في بكتيريا *P. aeruginosa* و *Y. enterocolitica* ستسمح بتحديد المسارات التنظيمية المميزه لكل نوع أو المشتركة لكل الأنواع والتي تعتبر مهمة جداً في عملية تصميم مثبطات و عقاقير مضادة ل T3SS.

يمكن تلخيص النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة في النقاط التالية:

١- في بكتيريا *P. aeruginosa* ، يشكل نظام T3SS بؤراً اساطعة مميزة موضعية في غشاء الخلية عند تصوريه بالميكروسكوب الفلورسنتي ولكن ليس لها نمط محدد وأظهرت صبغة الإبرة الخاصة بهذا النظام أن الإبر تظهر متطابقه مع البؤر الساطعه الخاصه بالبروتين (PscQ) احدى بروتينات النظام مما يعني أنه يمكن اعتبار البؤر المشاهدة تحت الميكروسكوب تمثل نظام الإفراز الثالث بالكامل.

٢- تتكون بكتيريا السيدوموناس من مجتمع غير متجانس مما يعني أنه ليست كل الخلايا تظهر بؤر لـ T3SS . بالإضافة إلى ذلك ، يبدأ عدد الخلايا الإيجابية التي تحتوي على بؤر T3SS عند عدد منخفض جداً في نقطة زمنية سابقة (ساعة واحدة) ثم يزداد تدريجياً حتى يصل إلى الذروة عند ٣ ساعات ، ثم يتناقص تدريجياً مع زيادة عدد الخلايا.

٣- أظهرت بيانات قياس الطيف الكتلي أن البروتينات المكتشفة هي ExoS و ExoT و ExoY والتي ظهرت فقط في ظروف الإفراز و لدراسة نشاط نظام الإفراز الثالث على مستوى الخلية الواحدة و على الخلايا مجتمعة تم استخدام بلازميد مصمم خصيصاً pAD731 و أظهرت النتائج أنه نسبة ٢.٥% من جميع الخلايا تحتوي على نظام إفراز نشط و يقوم بالإفراز.

٤- لا تؤثر المستويات العالية او المنخفضة من C-di-GMP على نشاط T3SS أو تكوينه. من ناحية أخرى ، أشارت النتائج إلى أن نشاط T3SS يزيد من تراكم الخلايا عن طريق زيادة مستوى c-di-GMP المقترض داخل الخلية.

٥- أظهرت النتائج أن التركيز العالي للملح يزيد من معدل نمو سلالات *P. aeruginosa* علاوة على ذلك ، فقد زاد من معدل تكوين ونشاط T3SS .

٦- لم نتمكن من اكتشاف تفاعل بروتين PscQ الخلوي مع البروتينات التنظيمية الخارجية باستخدام الترسيب المناعي المشترك. ولم يتم العثور على معلومات مفيدة باستخدام أدوات المعلوماتية الحيوية عبر الإنترنت.

٧- بعد اضافة علامه مميزه لبروتين FliM للفحص تحت الميكروسكوب الفلوسنتي الذي يمثل جزء من T3SS الموجود في لب السوط الخاص بالبكتيريا و المماثل لنظام الإفراز الثالث في نفس البكتيريا لمعرفة التشابه و الأختلافات بين النظامين ، أظهرت النتائج أنه ظهر كبؤرة ساطعة واضحة تظهر كبقعة قطبية واحدة في كل خلية وتم اكتشافها في جميع الخلايا. أظهرت البيانات أيضاً أن تركيز الملح المختلف ليس له أي تأثير على تكوين T3SS الخاص بالسوط. لذلك ، يتم تنظيم T3SS بشكل مختلف في نفس الأنواع في أنظمة مختلفة.

٨- من البيانات الواردة في هذ العمل وغيرها من النتائج التي تم الحصول عليها في مختبرنا ، وجدت أن تكوين T3SS ونشاطه وتنظيمه في بكتريا *P. aeruginosa* وبكتريا *Y. enterocolitica* مختلفان تماماً على الرغم من أنهما ينتميان إلى نفس عائلة T3SS.

الإستنتاج العام من هذه الدراسة أن نظام الإفراز الثالث هو نظام شديد التعقيد و يتم تنظيمه بشكل معقد على عدة مستويات و ان كل نظام افراز هو نظام مميز حتى لو وجد نفس النظام في اجزاء مختلفة في البكتيريا مثل حالة نظام الحقن الثالث و مثيله في السوط البكتيري أواذا وجد في نوعين مختلفين من البكتريا مثل بكتريا

P. aeruginosa وبكتريا *Y. enterocolitica*. و لهذا يجب تصميم عقاقير مضادة مناسبة لكل نظام على حده للتخفيف من شدة الامراض التي تسببها هذه البكتيريا.