بسم الله الرحمن الرحيم

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **باکتری شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۸۸** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر مرتضی ستاری**، مشاوره **دکتر احمد زواران حسینی و دکتر کامران موسوی حسینی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **غلامرضا گودرزی** دانشجوی رشته **باکتری شناسی پزشکی** مقطع **دکتری تخصصی** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D) در رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی پاسخ ایمنی و اثر محافظت کننده کونژوگه فلاژلین – آلژینات سودوموناس آئروژینوزا در موش BALB/c

نگارش

غلامرضا گودرزی

استاد راهنما

دکتر مرتضی ستاری

استاد مشاور

دکتر احمد زواران حسینی

دکتر کامران موسوی حسینی

پائیز ۱۳۸۸

چکیده

اگزوپلی ساکارید موکوئیدی (آلژینات) یک فاکتور کلیدی در پاتوژنز عفونت های مزمن سودوموناس آئروژینوزا از جمله سیستیک فیبروزیس است. آلژینات بدلیل ماهیت ضد فاگوسیتوزی با پاکسازی سودوموناس آئروژینوزا تداخل می کند. همچنین به عنوان یک ادهزین برای سویه های موکوئیدی عمل می کند. ایمونوژنیسیته آلژینات بدلیل ماهیت « غیر وابسته به سلول T » در انسان متوسط است. این باکتری همچنین دارای یک فلاژل قطبی ست که از واحد های فلاژلین ساخته می شود. فلاژل به عنوان یک ایمونوژن قوی، نقش مهمی در حرکت، کموتاکسی و استقرار سودوموناس آئروژینوزا در فاز حاد عفونت ها دارد. یافته های اخیر به نقش فلاژلین در شناسایی باکتری ها بوسیله میزبان و القاء پاسخ های ایمنی ذاتی بواسطه Toll-like receptor-5 تاکید دارند. در این مطالعه ژن فلاژلین (*fliC*) از سویه M ۸۸۲۱ با PCR تکثیر و در وکتور بیانی pET-28a کلون شد. فلاژلین نوترکیب در *E.coli* BL-21(DE3) pLysS به شکل تجمعات انکلوژن بادی بیان گردید. انکلوژن بادی ها در گوانیدین هیدروکلراید حل و با استفاده از رزین نیکل تخلیص و فولدینگ مجدد پیدا کردند. در یک تلاش برای ارزیابی اینکه آیا کونژوگاسیون آلژینات به یک پروتئین حامل می تواند ایمونوژنیسیته آن را ارتقاء بخشد، پلی مرهای با وزن مولکولی بالای آن به کمک ۱- اتیل -۳- (۳- دی متیل آمینوپروپیل)-کربودی ایمید هیدروکلراید (EDAC) به عنوان پیوند دهنده و آدیپیک اسید دی هیدرازید به عنوان فاصله انداز به فلاژلین نوترکیب متصل شد. در مقایسه با مخلوط آلژینات/ فلاژلین، تزریق کونژوگه به موش های BALB/c سطح IgG علیه آلژینات را ۱/۷ برابر افزایش داد. هر چند ایمونیزاسیون با آلژینات طبیعی در تولید آنتی بادی های اپسونیک ناکارآمد بود اما سرم حاصل از موش های ایمن با کونژوگه، جذب و مرگ اپسونیک سویه موکوئیدی M ۸۸۲۱ را ۲۹/۴ ٪ نسبت به مخلوط آلژینات/ فلاژلین ارتقاء بخشید. موش های ایمن با کونژوگه در چالش داخل صفاقی با دوز کشنده سویه موکوئیدی هترولوگ نسبت به گروه شاهد ۵۷/۱۴ ٪ افزایش بقا داشتند.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، فلاژلین نوترکیب، کونژوگه فلاژلین- آلژینات

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱. سودوموناس آئروژینوزا ۲

۱-۱-۱. خصوصیات کشت و کلنی ها ۳

۱-۱-۲. عفونت تجربی ۳

۱-۱-۳. برخی از فاکتورهای موثر در بیماریزایی ۴

۱-۱-۴. مروری بر عفونت های ایجاد شده ۷

۱-۲. فلاژل و فلاژلین ۱۰

۱-۲-۱. ساختمان فلاژل ۱۰

۱-۲-۲. طبقه بندی و خصوصیات ساختاری فلاژلین ۱۳

۱-۲-۳. نقش فلاژل در پاتوژنز ۱۵

۱-۲-۴. نقش فلاژلین در تحریک ایمنی ذاتی ۱۶

۱-۲-۵. عملکرد پیش التهابی فلاژلین ۱۸

۱-۲-۶. نقش فلاژلین در ارتقاء ایمنی هومورال ۲۰

۱-۲-۷. نقش فلاژلین به عنوان ادجوانت ۲۰

۱-۳. آلژینات ۲۱

۱-۳-۱. خصوصیات ساختاری ۲۱

۱-۳-۲. بیوشیمی و تنظیم سنتز ۲۲

۱-۳-۳. نقش آلژینات در پاتوژنز سودوموناس آئروژینوزا ۲۴

۱-۳-۴. آلژینات و آنتی بادی های غیراپسونیک ۲۷

۱-۳-۵. مشکلات استفاده از آلژینات به عنوان یک واکسن ۲۸

۱-۳-۶. تقویت پاسخ هورمورال علیه آلژینات ۲۹

۱-۴. پیوند دهنده های با طول صفر ۳۰

۱-۴-۱. کربو دی ایمیدها ۳۰
۱-۵. ضرورت و فرضیات این تحقیق ۳۲

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده ۳۳

۲-۱. مروری بر ایمونیزاسیون در برابر سودوموناس آئروژینوزا ۳۴
۲-۱-۱. پیلی ۳۴
۲-۱-۲. لیپوپلی‌ساکارید و پلی‌ساکارید – O ۳۵
۲-۱-۳. اگزوتوکسین و آنزیم‌ها ۳۷
۲-۱-۴. پروتئین‌های غشاء خارجی (Oprs) ۳۸
۲-۱-۵. سلول‌های کشته شده ۳۹
۲-۲. مروری بر مطالعات انجام شده بر روی فلاژل و فلاژلین ۴۰
۲-۳. مروری بر مطالعات انجام شده بر روی آلژینات ۴۴
۲-۴. مروری بر کونژوگه های آلژینات ۴۵
۲-۵. نتیجه ۴۶

فصل سوم: مواد و روش ها ۴۸

۳-۱. مواد ۴۹
۳-۱-۱. تهیه محیط کشت Mian براث اصلاح شده ۴۹
۳-۱-۲. بافر TE ۴۹
۳-۱-۳. بافرTAE 50 X ۴۹
۳-۱-۴. استوک آکریل آمید ۵۰
۳-۱-۵. بافر ژل پائین ۵۰
۳-۱-۶. بافر ژل بالا ۵۰

۳-۱-۷. بافر الکترود ۵۰
۳-۱-۸. بافر نمونه (5 X) ۵۰
۳-۱-۹. بافر انتقال (وسترن بلات) ۵۰
۳-۱-۱۰. بافر PBS -T ۵۰
۳-۱-۱۱. بافر شستشوی IB ۵۱
۳-۱-۱۲. بافر لیز گوانیدیوم ۵۱
۳-۱-۱۳. محلول D.B.B ۵۱
۳-۱-۱۴. محلول های D.W.B ۵۱
۳-۱-۱۵. محلول N.W.B ۵۱
۳-۱-۱۶. محلول N.E.B ۵۱
۳-۲. روش ها ۵۲
۳-۲-۱. تهیه و تعیین هویت سویه باکتریایی متحرک و تولید کننده آلژینات ۵۲
۳-۲-۲. استخراج و تخلیص فلاژلین طبیعی ۵۲
۳-۲-۲-۱. تخلیص به روش قیچی کردن ۵۲
۳-۲-۲-۲. تخلیص با تجزیه اسیدی ۵۳
۳-۲-۲-۳. پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ۵۳
۳-۲-۳. تولید و تخلیص فلاژلین نوترکیب ۵۵
۳-۲-۳-۱. استخراج DNA ژنومی ۵۵
۳-۲-۳-۲. الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۵۶
۳-۲-۳-۳. مطالعه توالی ژن *fliC* و طراحی پرایمر ۵۶
۳-۲-۳-۴. تکثیر ژن *fliC* با آنزیم *Pfu* DNA Polymerase ۵۸
۳-۲-۳-۵. نقشه و مشخصات وکتور pET-28a ۵۹
۳-۲-۳-۶. استخراج پلاسمید ۶۱

۳-۲-۳-۷. تخلیص ژن *fliC* تکثیر شده از محصول PCR ۶۱
۳-۲-۳-۸. هضم آنزیمی محصول PCR و pET-28a ۶۲
۳-۲-۳-۹. الحاق *fliC* و pET-28a هضم شده ۶۳
۳-۲-۳-۱۰. تهیه سلول مستعد از باکتری Top10F´ ۶۳
۳-۲-۳-۱۱. ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی ۶۴
۳-۲-۳-۱۲. غربالگری کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب (pET-28a/*fliC*) ۶۵
۳-۲-۳-۱۳. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن *fliC* ۶۵
۳-۲-۳-۱۴. ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب در میزبان بیانی ۶۵
۳-۲-۳-۱۵. القاء بیان ژن *fliC* ۶۶
۳-۲-۳-۱۶. ارزیابی بیان فلاژلین نوترکیب ۶۶
۳-۲-۳-۱۷. استخراج انکلوژن بادی‌ها (IB) ۶۶
۳-۲-۳-۱۸. محلول‌سازی ، تخلیص و فولدینگ مجدد فلاژلین های نوترکیب ۶۸
۳-۲-۳-۱۹. سنجش پروتئین به روش برادفورد ۶۸
۳-۲-۳-۲۰. تهیه آنتی سرم‌های پلی کلونال علیه فلاژلین طبیعی و نوترکیب ۶۹
۳-۲-۳-۲۱. آزمایش وسترن بلات ۷۰
۳-۲-۳-۲۲. آزمون مهار حرکت ۷۱
۳-۲-۴. آلژینات ۷۱
۳-۲-۴-۱. تولید و تخلیص آلژینات ۷۱
۳-۲-۴-۲. جداسازی پلی ساکارید های با وزن مولکولی بالا ۷۲
۳-۲-۴-۳. سنجش غلظت آلژینات ۷۳
۳-۲-۴-۴. سنجش غلظت DNA ۷۴
۳-۲-۴-۵. سنجش غلظت پروتئین ۷۴
۳-۲-۵. کونژوگاسیون آلژینات تخلیص شده با فلاژلین نوترکیب ۷۴

۳-۲-۵-۱. مکانیسم کونژوگاسیون ۷۵
۳-۲-۵-۲. تهیه کونژوگه فلاژلین – آلژینات ۷۵
۳-۲-۵-۳. مشتق سازی فلاژلین نوترکیب (مرحله اول) ۷۶
۳-۲-۵-۴. مشتق سازی آلژینات و عمل کونژوگاسیون (مرحله دوم) ۷۶
۳-۲-۵-۵. جداسازی مولکول‌های کونژوگه آلژینات ۷۶
۳-۲-۵-۶. تغلیظ فراکسیون‌ها به روش اولترا فیلتراسیون ۷۶
۳-۲-۵-۷. آنالیز شیمیایی کونژوگه ۷۷
۳-۲-۵-۸. آزمون تب‌زایی ۷۷
۳-۲-۵-۹. آزمون سمیت در موش ۷۷
۳-۲-۶. ایمونیزاسیون فعال ۷۸
۳-۲-۷. آزمایش الایزا ۷۸
۳-۲-۷-۱. سنجش سطح IgG سرمی ۷۹
۳-۲-۸. آزمون اپسونوفاگوسیتوز با ماکروفاژهای موش ۸۰
۳-۲-۹. چالش حیوانات ایمن با سویه ی موکوئیدی ۸۱
۳-۲-۱۰. آنالیز آماری داده ها ۸۱

فصل چهارم: نتایج و یافته ها ۸۲

۴-۱. تعیین هویت سویه مورد آزمایش ۸۳
۴-۲. تخلیص فلاژلین طبیعی ۸۳
۴-۳. کلونینگ و بیان ژن *fliC* ۸۵
۴-۳-۱. بررسی کیفی و کمی DNA ژنومی ۸۵
۴-۳-۲. تکثیر ژن *fliC* ۸۶
۴-۳-۳. کلون سازی ژن *fliC* ۸۶

۴-۳-۴. اثبات حضور ژن *fliC* در وکتور نوترکیب pET-28a/*fliC* ۸۷
۴-۳-۴-۱. تایید به روش PCR ۸۷
۴-۳-۴-۲. تایید نهایی به روش هضم آنزیمی ۸۸
۴-۳-۵. تعیین توالی و همطرازی ژن *fliC* ۸۹
۴-۳-۶. بیان فلاژلین نوترکیب در *E.coli* ۹۳
۴-۳-۷. تخلیص فلاژلین نوترکیب ۹۴
۴-۳-۸. آزمایش وسترن بلات ۹۵
۴-۳-۹. ارزیابی آزمون مهار حرکت ۹۵
۴-۴. آلژینات ۹۷
۴-۴-۱. تولید و تخلیص ۹۷
۴-۴-۲. جداسازی پلی ساکارید های با وزن مولکولی بالا ۹۷
۴-۵. کونژوگاسیون آلژینات با فلاژلین نوترکیب ۹۹
۴-۵-۱. جداسازی مولکول های کونژوگه ۹۹
۴-۵-۲. آزمون تب زایی و سمیت کونژوگه ۹۹
۴-۶. سنجش عیار IgG در سرم موش های ایمن ۱۰۱
۴-۶-۱. پاسخ آنتی بادی (IgG) علیه آلژینات ۱۰۱
۴-۶-۲. پاسخ آنتی بادی(IgG) علیه فلاژلین ۱۰۳
۴-۷. ارزیابی فعالیت اپسونیک سرم های ایمن ۱۰۴
۴-۸. حفاظت حیوانات ایمن در برابر دوز کشنده سویه هترولوگ ۱۰۵

فصل پنجم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها ۱۰۶

۵-۱. مبحث تخلیص فلاژلین طبیعی ۱۰۸
۵-۱-۱. استخراج و تخلیص فلاژلین طبیعی به روش قیچی کردن ۱۰۹

۵-۲. مبحث کلونینگ و بیان ژن ۱۱۱
۵-۲-۱. طراحی پرایمر ۱۱۱
۵-۲-۲. تکثیر ژن *fliC* ۱۱۲
۵-۲-۳. ارزیابی نتایج همطرازی ۱۱۴
۵-۲-۴.کلونینگ و بیان فلاژلین نوترکیب در *E.coli* ۱۱۴
۵-۲-۵. تخلیص و فولدینگ مجدد فلاژلین نوترکیب ۱۱۷
۵-۲-۶. ارزیابی خواص بیولوژیک فلاژلین نوترکیب ۱۱۹
۵-۳. تخلیص آلژینات ۱۲۰
۵-۴. کونژوگاسیون فلاژلین – آلژینات ۱۲۱
۵-۵. ارزیابی پاسخ IgG علیه آلژینات در گروه های ایمن ۱۲۳
۵-۶. ارزیابی مرگ اپسونیک درگروه های ایمن ۱۲۵
۵-۷. حفاظت حیوانات ایمن در چالشی مرگ آور ۱۲۷
۵-۸. نتیجه گیری مهم ۱۲۸
۵-۹. پیشنهادات ۱۲۹

فهرست منابع ۱۳۰

چکیده انگلیسی ۱۴۰

فهرست جداول

جدول ۳-۱. روش هضم آنزیمی وکتور pET-28a (A) و محصول PCR ژن *fliC* (B)..... ۶۲

جدول ۳-۲. شرایط الحاق *fliC* در وکتور pET-28a هضم شده..... ۶۳

جدول۳-۳. دستورالعمل سنجش پروتئین به روش برادفورد ۶۹

جدول۳-۴. دستورالعمل سنجش اورونیک اسید ها به روش متا هیدروکسی دی فنیل..... ۷۴

جدول ۴-۱. آنالیز شیمیایی کونژوگه فلاژلین – آلژینات تغلیظ شده با اولترا فیلتراسیون..... ۱۰۰

جدول۴-۲. میانگین و انحراف استاندارد جذب نوری (۴۵۰ nm) سرم حیوانات ایمن..... ۱۰۱

جدول ۴-۳. مقایسه ی درصد بقای موش های BALB/c در گروه های ایمن پس از مواجه با دوز مرگ آور سودوموناس آئروژینوزای موکوئیدی (سویه ی هترولوگ)..... ۱۰۵

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. ساختار فلاژل: موتور، قلاب و فیلامنت ۱۱

شکل ۱-۲. ساختار و سازماندهی فلاژلین درفیلامنت فلاژل ۱۲

شکل ۱-۳. نقش فلاژلین در تحریک سیستم ایمنی ذاتی ۱۸

شکل ۱-۴. ساختار و واحد های تشکیل دهنده آلژینات سودوموناس آئروژینوزا ۲۲

شکل ۱-۵. مسیر بیوسنتز آلژینات در سودوموناس آئروژینوزا ۲۳

شکل ۱-۶. فعال سازی گروه کربوکسیل و تشکیل پیوند آمیدی توسط EDAC ۳۱

شکل ۳-۱. نقشه و نواحی برش آنزیمی در وکتور pET-28a ۶۰

شکل ۴-۱. فرم موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزای M ۸۸۲۱ بر روی محیط مکانکی آگار ۸۳

شکل ۴-۲. نتیجه SDS-PAGE از محصول استخراج و تخلیص فلاژلین طبیعی به روش اسیدی ۸۴

شکل ۴-۳. نتیجه SDS-PAGE از محصول استخراج و تخلیص فلاژلین طبیعی به روش چیدن ۸۵

شکل۴-۴. استخراج DNA ژنومی از سویه ی M ۸۸۲۱ به روش فنل- کلروفرم ۸۶

شکل ۴-۵. محصول PCR ژن *fliC* سویه M ۸۸۲۱ در دماهای مختلف (A). موقعیت ژن *fliC* (bp ۱۱۸۵) بازیافتی از ژل آگارز (B). ۸۷

شکل ۴-۶. تائید حضور ژن *fliC* در وکتور های استخراجی از کلون های نوترکیب Top10F´ به روش PCR (A) و هضم آنزیمی(B) ۸۸

شکل ۴-۷. ارزیابی بیان فلاژلین نوترکیب در میزبان بیانی E.coli, BL-21 بر روی SDS-PAGE ۹۴

شکل ۴-۸. نتایج استخراج انکلوژن بادی ها و تخلیص فلاژلین نوترکیب بر روی SDS-PAGE ۹۵

شکل۴-۹. ایمونوبلاتینگ فلاژلین نوترکیب با آنتی فلاژلین طبیعی ۹۶

شکل ۴-۱۰.مهار حرکت سویه M ۸۸۲۱ توسط آنتی فلاژلین طبیعی و نوترکیب بر روی Soft آگار ..۹۶

شکل ۴-۱۱. آلژینات تخلیص شده از سودوموناس آئروژینوزای M ۸۸۲۱ ..... ۹۷

شکل ۴-۱۲. منحنی جذب نوری فراکسیون های آلژینات، حاصل از ستون سفاکریل S-۳۰۰.....۹۸
شکل ۴-۱۳. منحنی جذب فراکسیون های کونژوگه، (۲۰۶ و ۲۸۰ نانومتر) حاصل از ستون سفاکریل S-۳۰۰.....۱۰۰
شکل ۴-۱۴. مقایسه ی سطح IgG علیه آلژینات در گروه های ایمن در روزهای ۱۴، ۲۸ و۳۵.....۱۰۲
شکل ۴-۱۵. مقایسه ی سطح IgG علیه فلاژلین در گروه های ایمن در روزهای ۱۴، ۲۸ و۳۵.....۱۰۴
شکل ۴-۱۶. مقایسه فعالیت اپسونیک سرم های ایمن در گروه های مختلف.....۱۰۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱. سودوموناس آئروژینوزا[1]

ارگانیسمی را که ما امروز سودوموناس آئروژینوزا می شناسیم قبلاً *باسیلوس پیوسیانوس* می نامیدند که بعداً به نام *سودوموناس پیوسینا* معروف شد. برخی از محققین سودوموناس آئروژینوزا را فراوانترین فرم حیاتی موجود بر روی کره زمین می دانستند. منابع اصلی این باکتری در آب های سطحی و فاضلاب هاست. سودوموناس آئروژینوزا میزبان گیاهی اجباری ندارد اما می تواند درچند گونه ی گیاهی باعث بیماری گردد. انسان حامل طبیعی سودوموناس آئروژینوزا نیست و در حالت سلامت میزان جدا سازی آن از مدفوع انسان ۱۸-۱٪ است. در بیماران بستری و افرادی که آنتی بیوتیک مصرف می کنند جداسازی این باکتری به طرز چشمگیری افزایش می یابد [۱].

سودموناس آئروژینوزا یکی از مهمترین باکتری های فرصت طلب برای انسان است [۲]. به عنوان یک ساپروفیت، می تواند در مواردی که سدهای فیزیکی بدن آسیب دیده باشند مثل جراحی، تروما و سوختگی و یا سیستم ایمنی به دلایلی تضعیف شده باشد مانند سرطان، نوتروپنی و ایدز عفونت های مرگ آوری ایجاد کند. بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس(CF)، بستری در بخش های مراقبت ویژه، دریافت کنندگان پیوند و غیره مخصوصاً به عفونت های ناشی از این باکتری حساسند[۷-۳].

[1] *Pseudomonas aeruginosa*

۱-۱-۱. خصوصیات کشت و کلنی ها

سودوموناس آئروژینوزا به خوبی بر روی بسیاری از محیط های باکتریولوژیک معمول رشد می کند. باکتری کلنی های گرد، مات با قوام خامه ای ایجاد می کند که کلنی های تیپ یک نامیده می شوند. برخی کلنی ها کوچکتر بوده، برآمده و شبیه کلنی های کلی فرم ها هستند و به کلنی های تیپ ۲ معروفند. کلنی های تیپ ۳ به شکل خشن و ممکن است دارای چین و چروک باشند. هر سه شکل کلنی ممکن است در یک کشت باکتریایی دیده شوند. کلنی های موکوئیدی قوام مرطوب یا لاستیکی دارند. بسیاری ازایزوله های موکوئیدی پیوسیانین ترشح نمی کنند و غیر متحرکند. هیچ اختلاف قابل توجهی در آنتی ژن های مقاوم به حرارت، فاژ، باکتریوسین یا حساسیت آنتی بیوتیکی در بین انواع کلنی ها ظاهر شده در یک کشت دیده نشده است. بر خلاف باکتری های روده ای، کلنی های خشن، LPS صاف را بیان می کند . بسیاری از کشت ها بجز بر روی محیط های ویژه پیوسیانین تولید نمی کند و برخی ازآنها هرگز این رنگدانه را تولید نمی کنند. بسیاری از کشت های باکتری (نه همه آنها) در اثر تولید O-آمینو استوفنون از تریپتوفان بوی میوه را از خود منتشر می کنند . کشتهای مایع اغلب لایه ی ضخیم و لزجی دارند که به سطح داخلی لوله می چسبد و یک لایه هم در سطح آن تشکیل می دهند . سودوموناس آئروژینوزا به ترکیبات آمونیوم مثل *ستیل تری متیل آمونیوم بروماید* *یا ستری ماید* مقاوم است و از این خاصیت برای جدا سازی و فورمولاسیون محیط های کشت در نمونه های آلوده استفاده می شود[۱].

۱-۱-۲. عفونت تجربی

سودوموناس آئروژینوزا عموماً برای انسان بیماریزا است. دامنه LD50 آن از $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۷/۵}$ باکتری برای مرگ زایی در موش از طریق داخل رگی متغیر است. بیشتر سویه ها سودوموناس آئروژینوزا با تزریق ۱۰۰۰-۱۰ باکتری در ناحیه پوست سوخته برای موش مرگ زا هستند . وجود تعدادی برابر یا بیش از $۱۰^{۵}$ باکتری دربافت پوست سوخته، قبل از اینکه ارگانیسم از خون و بافت های داخلی جدا شود نیاز است . بنابراین بنظر می رسد که مدل موش سوخته مشابه سپتی سمی سوختگی در انسان

باشد. نشان داده شده که تلقیح قطعات آگار جامد حاوی $۱۰^{۴}$ باکتری به داخل نای موش می تواند به عفونت ریوی حاد منجر شود و تعداد باکتری به دست آمده از ریه تا $۱۰^{۶}$ باکتری در هر گرم افزایش می یابد. از این مدل به طور وسیعی در مطالعات میانکنش بین فاکتورهای ویرولانس باکتری و مکانیسم های دفاعی میزبان و ارزیابی کارآیی واکسن ها استفاده می شود. کاهش نوتروفیل ها، به شدت حساسیت حیوانات آزمایشگاهی را به عفونت با سودوموناس آئروژینوزا افزایش می دهد و این حالت را با تجویز *سیکلوفسفامید* می توان ایجاد کرد [۱].

۱-۱-۳. برخی از فاکتورهای موثر در بیماریزایی

الف) سموم خارج سلولی: سودوموناس آئروژینوزا انواع سمومی را که در شرایط in vitro و in vivo قابل توصیف هستند را تولید می کند و این توکسین ها براساس محل عفونت از اهمیت متفاوتی برخوردارند .اگزوتوکسین A (ETA)، قطعه ADP - ریبوز را از NAD جدا و به فاکتور طویل کننده ۲ منتقل می کند؛ این واکنش به غیر فعال شدن EF-2 منجرشده و باعث خاتمه سنتز پروتئین و مرگ سلول می گردد [۹،۸،۱]. ETA توسط ۹۰ درصد از ایزوله های بالینی در شرایط فقر آهن تولید می شود. پروتئین خالص در حیوانات باعث افت شدید فشار خون، شوک، نکروز کبدی، لوکوپنی، تخریب کلاژن و مرگ سلول های اپی تلیال می گردد. اگزوتوکسین S (ETS) هم یک ADP – ریبوزیل ترانسفراز است اما EF-2 را غیر فعال نمی کند. این سم رشته های پروتئینی و پروتئین های باند شونده به GTP را ADP -ریبوزیله می کند. ایزوله های بالینی در شرایط in vitro ۴۰٪ و در بدن انسان ۹۰٪ این سم را تولید می کنند. این سم باعث تغییرات بارزی در ساختار ریوی و فیبروبلاست های تک لایه ای برونش در طول ۲ ساعت می گردد [۱]. به عنوان یک میتوژن، باعث القاء شدید رونویسی از سایتوکاین های پیش التهابی و کموکاین ها می شود [۱۰] و در آزمایشات مختلف اثرات مخرب آن بر روی ریه به اثبات رسیده است [۱۱]. یک سیتوتوکسین اسیدی هم شرح داده شده که به غشاء پلاسمایی بسیاری از سلول های پستانداران حمله می کند و باعث افزایش نفوذپذیری آنها می گردد[۱].

ب) پروتئاز ها : بسیاری از سویه ها، آنزیم های پروتئولیتیکی تولید می کنند که سوبستراهای متنوعی چون کازئین، الاستین، کلاژن و غیره را تجزیه می کنند. سودوموناس آئروژینوزا حداقل ۳ پروتئاز متمایز را تولید می کند که شامل: یک پروتئاز عمومی، یک پروتئاز قلیایی و یک الاستاز است. پروتئاز قلیایی و الاستاز توسط شلاترها مهار می شوند. به طور کلی پروتئاز قلیایی دامنه وسیعتری از سوبستراها را نسبت به الاستاز تجزیه می کند؛ اما هردو پروتئین، ساختار ماتریکس خارج سلولی مثل کلاژن، لامینین و الاستین را تجزیه می کنند. آنها همچنین بر روی پروتئین های سیستم ایمنی مثل کمپلمان، پروتئین های سیستم انعقادی و سایتوکاین ها فعالیت دارند. به نظر می رسدکه از پروتئاز ها، الاستاز باعث ضایعات عروقی همراه با هموراژی می گردد. کراتیت به علت فعالیت پروتئاز هاست اما موتانت های فاقد پروتئاز هم ضایعاتی روی قرنیه ایجاد می کنند. شواهد نشان می دهد که پروتئاز ها در پاتوژنز بیماری های تنفسی و سپتی سمی های سوختگی نقش مهمی را ایفا می کنند [۱].

ج) پیوسیانین: پیوسیانین(PCN) به عنوان مهار کننده آنزیم های میتوکندریال در بافت عمل می کند و باعث اختلال در عملکرد سلول های مژکدار تنفسی می گردد؛ که این موضوع برای توانایی ارگانیسم در جلوگیری از پاکسازی از مخاط تنفسی مهم تلقی می شود؛ این عمل می تواند باعث کاهش cAMP و ATP در سلولهای مژکدار گردد. از دیگر فعالیت های پیوسیانین، تولید واسطه های واکنش گر نیتروژن، افزایش آزادسازی الاستاز نوتروفیلی، مهار تنفس سلولی، اختلال در هموستاز کلسیم و القاء آپوپتوز در نوتروفیل هاست [۱، ۱۴-۱۲].

د) همولیزین ها: سودوموناس آئروژینوزا دو همولیزین مشخص تولید می کند: یکی آنزیم حساس به حرارت یا *فسفولیپاز* C (PLC) که خود به دو شکل همولیتیک و غیر همولیتیک دیده می شود و دیگری *رامنولیپید* مقاوم به حرارت. فرم غیرهمولیتیک PLC فعالیت پاتولوژیک ثابت شده ای ندارد؛ اما PLC همولیتیک، فسفاتیدیل کولین (لستین) موجود در گلبول های قرمز و سورفاکتانت ریوی انسان را تجزیه و باعث افزایش نفوذ پذیری عروق، آسیب بافتی و مهار انفجار تنفسی نوتروفیل ها می گردد [۱۸،۱-۱۵]. تولید بهینه PLC با درجه هوادهی کشت ارتباط مستقیم دارد و این آنزیم در ریه بیماران CF و بیماران کلونیزه شده مزمن تولید می گردد. دی اسیل گلیسرول ناشی از اثر این آنزیم،