جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التأثير الخلطي للريسفيراترول وبعض مضادات الكوينولونات على بعض الجينات لعزلات الزائفة الزنجارية المعزولة من أخماج الجهاز التنفسي السفلي

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم– جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

سماء سلمان ستار العبيدي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة ديالى (٢٠٢١)

إشراف

أ.د. كريم ابراهيم مبارك

١٤٤٦هـ

٢٠٢٤ م

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Diyala

College of Science

Department of Biology

The Combination effect of Resveratrol and some quinolone antibiotics on some *Pseudomonas aeruginosa* genes isolated from Lower Respiratory tracts Infections

A Thesis

Submitted to the College of Science, University of Diyala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree of Science in Biology

By

Samaa Salman Sattar Al-Obaidi

B.Sc. Biology/ University of Diyala (2021)

Supervised by

Prof. Dr. Kareem Ibrahim Mubarak

2024 A.D. **1446 A.H**

Chapter One: Introduction

1.Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacillus that spreads across various environments, including water and soil. Human activities, such as sewage disposal, and contamination with hydrocarbons and pesticides, have affected the occurrence of this bacterium (Crone *et al*., 2020). *P. aeruginosa* possesses several virulence factors, including quorum-sensing systems, secreted enzymes, toxins, and the ability to form biofilms, which increase its potential to cause severe infections (Reynolds and Kollef, 2021). As an opportunistic pathogen, *P. aeruginosa* is responsible for various infections in healthcare settings, including ventilator-associated pneumonia (VAP), ICU-related diseases, bloodstream infections, surgical and wound infections, urinary tract infections, otitis media, and keratitis (Tuon *et al*., 2022).

This bacterium can cause significant tissue damage in immunocompromised patients by evading immune defenses through adherence, colonization, and biofilm formation. Additionally, it possesses various virulence mechanisms. *P. aeruginosa* is associated with high mortality rates among patients with cystic fibrosis, neonatal infections, cancer, and severe burns (Lambert *et al*., 2011; Turkina and Vikström, 2019).

Bacteria form communities known as biofilms, which are encased in an exopolysaccharide matrix (EPS) produced and secreted by the bacteria themselves, allowing them to adhere to surfaces (Yin *et al*., 2022). Efflux pumps significantly contribute to the formation of bacterial biofilms. Numerous studies have demonstrated that efflux pump expression is up-regulated in biofilms, providing higher resistance to antibiotics. Bacterial biofilms act as barriers, protecting bacteria from biotic pressures,

immune responses, and the effects of antibiotics, making infections difficult to eliminate (Tuon *et al*., 2022).

When *P. aeruginosa* cells are present in a biofilm, they exhibit increased antibiotic resistance. Efflux pumps in *P. aeruginosa* are found to be more efficient in biofilm-associated cells compared to planktonic cells (Zhang and Mah, 2008). Many studies indicate that cells lacking active efflux pumps may struggle to form biofilms (Kvist *et al*., 2008). Efflux pumps have evolved as a mechanism for bacteria to interact with environmental factors (Sanz-García *et al*., 2022). Their widespread existence in nature (Langevin and Dunlop, 2018) allows bacteria to persist in their ecological niches. Efflux pumps play a significant role in antimicrobial resistance (AMR) due to their beneficial physiological functions for bacteria (Piddock, 2006). Antimicrobial resistance (AMR) is one of the most serious problems in medicine, particularly with Gram-negative bacteria (GNB), which are categorized by their degree of resistance as multidrug-resistant (MDR), pandrug-resistant (PDR), and extensively drug-resistant (XDR) (Impey *et al*., 2020). *P. aeruginosa* has a high degree of intrinsic resistance to most antibiotics, achieved by decreasing outer membrane porosity, creating efflux pump proteins that expel antibiotics from the cell, and producing enzymes such as β-lactamases that inactivate antibiotics (Breidenstein *et al*., 2011).

Plant secondary metabolites (SMoPs) have been shown to have a high inhibitory effect on efflux systems in bacterial cells, enhancing antibiotic tolerance. Medicinal plants with active antibacterial compounds, such as catechol, piperine, quercetin, resveratrol, and others, can serve as effective inhibitors of bacterial efflux systems (Garvey *et al*., 2011; Kumar and Pooja Patial, 2016).

The aims of the study

The current study aims to investigate the effect of Resveratrol as efflux pumps inhibitors on bacterial antibiotic resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from lower respiratory tracts in Baquba city, Iraq. The investigation will follow these steps:

1. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from lower respiratory tract infections.
2. Detection of antibiotic susceptibility and some virulence factors in the isolates.
3. Phenotypic and molecular detection of efflux pumps and biofilm formation in the isolates.
4. Examination of the effect of Resveratrol on antibiotic resistance and biofilm formation.
5. Study the effect of Resveratrol as efflux pumps inhibitors and their combination with antibiotics on some gene expression of efflux pumps and bioflm formation genes.

الخلاصة

الخـــلاصـــة

تم جمع مئتي عينة قشع من المرضى المراجعين لمستشفى بعقوبة التعليمي ومركز الامراض الصدرية من المرضى الذين يعانون من خمج المسالك التنفسية السفلى للفترة من ٢٠٢٤\١\١ الى ٢٠٢٤\٣\٣١ ، وسجلت بعض المعلومات مثل عمر وجنس المريض. أجريت الدراسة لمعرفة مدى انتشار بكتيريا *P.aeruginosa* بين المرضى ، الكشف عن بعض عوامل الضراوة ، حساسية العزلات لمضادات الحياة ، تاثيرالريسفيراترول احد المركبات المستخدمة كمثبط لمضخات الدفق على مستوى تكوين الاغشية الحيوية وعلى التركيز المثبط الادنى (MIC لمضادي السيبروفلوكساسين والنورفلوكساسين)، ومقارنة تأثير الريسفيراترول وكل من المضادين و مزيج كل منهما مع المثبط على التعبير لاثنين من جينات الاغشية الحيوية (*pslD&pelA*) ومضخات الدفق (*mexA&oprJ*) للعزلات المقاومة للادوية المتعددة MDR.

شخصت (١٢٪) ٢٤عزلة من ال *P. aeruginosa* من مجموع العينة (٢٠٠) و اوضحت نتائج الكشف المظهري لبعض عوامل الضراوة ان العزلات انتجت الانزيم الخاص بتحلل الدم على وسط اكار الدم Blood agar وصبغة البايوسيانين و تكوين الاغشية الحيوية بنسب ١٠٠٪ ،٩٥.٨٣٪ ،١٠٠٪على التوالي .

اوضح اختبار الحساسية للمضادات الحياة لـ ٢٤ عزلة ضد ١٢ نوعًا مختلفًا من المضادات الحياة بوساطة طريقة انتشار الاقراص القياسي. ان اعلى نسبة لمقاومة لمضادات الحياة كانت للمضاد Cefepime ٢٤(١٠٠٪)، بينما كانت اقل نسبة مقاومة كانت للمضاد Norfloxacin ٣ (١٣٪) . وكان توزيع نسب مقاومة العزلات على مجاميع المقاومة (PDR) و (MDR) و (XDR) : ٣(١٢.٥٪) ، ١٨(٧٥٪) ، ٣(١٢.٥٪) ، التوالي.

كان للريسفيراترول تأثير عال في خفض مستويات تكوين الاغشية الحيوية اذ تغيرت اعداد العزلات قبل المعاملة من قوي ١٦ (٦٦.٦٪) ومتوسط ٨ (٣٣.٣٪) و ضعيف٠ (٠٪) إلى قوي٠ (٠٪) ومتوسط ١٧ (٧٠.٨٪) وضعيف٧ (٢٩.١٪) على التوالي .كما اظهرت نتائج التأثير ايضا الى انخفاض التركيز المثبط الادنى (MIC) للمضادين السيبروفلوكساسين و النوروفلوكساسين من ٨-١٢٨ مايكرو غرام /مل للمضاد الاول و ٢-٥١٢ مايكرو غرام /مل للمضاد الثاني قبل المعاملة الى ٢-١٦ مايكرو غرام /مل و ٠.٢٥ -٦٤ مايكرو غرام /مل على التوالي بعد المعاملة.

تم اجراء اختبار تفاعل سلسلة البوليمرات (PCR) للكشف عن جينات وجود *pslD , pelA* المشفرة لتكوين الاغشية الحيوية و جينات *oprJ , mexA* المشفرة لتكوين مضخات الدفق لخمسة عشر عزلة وتبين من النتائج ان جميع العزلات (١٠٠٪) تحمل الجينات *pelA, pslD, mexA & oprJ* .

تمت دراسة التعبير الجيني لهذه الجينات الاربعة باستخدام تقنية qRT-PCR في ثلاث عزلات من *P. aeruginosa* المقاومة للأدوية المتعددة (MDR) بعد معاملتها بال السيبروفلوكساسين و النوروفلوكساسين و الريسفيراترول (كمثبطات لمضخات الدفق) و مزيجه combination مع كل من المضادين .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان هنالك تغيرات قليلة في تعبير الجين *pelA* اذ بلغ معدل ال folding بعد المعاملة بالسيبروفلوكساسين ١.٠٨ بينما سجلت انخفاض في التعبير اذ بلغ معدل ال folding بعد المعاملة بالريسفيراترول ، والنوروفلوكساسين ومزيج المثبط مع كل من المضادين ٠.٦٧ و٠.٧٩ و٠.٤٥ و٠.٧٥ على التوالي . بينما اوضحت النتائج انخفاض في تعبير الجين الثاني للأغشية الحيوية *pslD* بعد معاملته مع السيبروفلوكساسين ومزيج مثبط مضخات الدفق مع السيبروفلوكساسين والنوروفلوكساسين حيث كان معدل ال folding يساوي ٠.٩٨ و ٠.٦١ و ٠.٨٤ على التوالي . و كانت هناك زيادة طفيفة بعد المعاملة بالريسفيراترل والنوروفلوكساسين اذ اصبحت ١.٠٤ و ١.٠٢ على التوالي.

كان معدل ال folding للجين *mexA* ١.٠٢ و١.١٧ بعد المعاملة بالسيبروفلوكساسين والنوروفلوكساسين على التوالي ، بينما كان هنالك انخفاض للتعبير الجيني اذ اصبح بعد معاملة العزلات بالريسفيراترول والمزيج مع كل من المضادين ٠.٨٨ و٠.٩٠ و ٠.٩٩ على التوالي . كان لتاثيرمعاملة العزلات الثلاثة المقاومة بالمضادين بالسيبروفلوكساسين والنوروفلوكساسين والمثبط ومزيج كل مضاد معه ارتفاع طفيف للجين *oprJ* اذ بلغ معدل ال folding بعد المعاملة ١.٣٥ و١.٢١ و١.٥٩ و١.١٦ و١.١٣ على التوالي.