وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـــــامـــعـــة ديـــالـــى
كـلـيـة الـتربـية للعلوم الصرفة
قسم عـــلـــوم الـحـيـاة

تأثير الشيتوزان النانوي على بكتريا *Streptococcus mutans* المعزولة من حالات تسوس الاسنان

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

هبه ستـــار عـــواد

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى (2019)

أشراف

أ.م.د عدوية فاضل عباس الزبيدي

1444هـ

2022 م

1. المقدمة Introduction

يعد تسوس الأسنان من أكثر أمراض الفم انتشارًا في جميع أنحاء العالم ، وهو يصيب نسبة كبيرة منهم . هناك بعض الأساليب للتحكم والوقاية والعلاج من هذه الحالة المرضية فأن العامل الاساسي المسبب في عملية التسوس هو انتاج الحامض والرقم الهيدروجيني (pH) المتأثر بوجود البكتريا وتناول الكثير من السكريات . في البلدان النامية يحدث تسوس الأسنان والتهابات اللثة خلال تفاعل معقد بين المؤثرات البيئية والكائنات الحية المجهرية المتواجدة في الفم الا ان أعداد قليلة منها تسبب عملية التسوس أذا تتداخل البكتريا مع بعضها لمحاولة تكوين نفسها في البيئة ومنها المكورات العقدية الطافرة (Oral *Streptococcus mutans*)

تعد المكورات العقدية الطافرة *S .mutans* التي تنتمي الى عائلة *Streptocoaceae* تصنف من اكثر المسببات المرضية المعزولة من حالات سريرية بسبب وصولها الى مجرى الدم وهي الموجبة لصبغة جرام(Gram Positive) وسالبة اختبار الكاتليز تكون كروية او بيضوية توجد بشكل ازواج او سلسلة يمكن رؤية بشكل واضح تحت المجهر كما انها غير متحركة وغير مكونة للسبورات و بأقطار (0.2-5.0ملم) (Banas واخرون 2018). ازدادت المقاومة الدوائية المتعددة لبكتريا *S.mutns* وذلك لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي لها أثر في امراضيتها بسبب قدرتها العالية على تحمل الحوامض والاملاح وانتاج حامض الالكتيك من الوجبات الغذائية الغنية بالكربوهيدرات , كما ان لها القدرة على بناء السكريات المتعددة خارج الخلية مثل الكليوكان وبإفرازها انزيمات وهذه الانزيمات تقوم بتنظيم بناء انواع من السكريات قابلة للذوبان بالماء واخرى غير قابلة للذوبان في الماء، تتحد لتكون معقد(Glucan) ويمتاز بخاصية الالتصاق على السطوح هذا يفسر قدرة البكتريا العالية على تكوين الاغشية الحيوية و

يزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية وهو عبارة عن تجمعات بكتيرية معقدة تتكون من طبقات متكونه بشكل مصفوف بمجرد تكوين الاغشية الحيوية يكون صعب تدميرها لأنها ميزه انتقائية تعزز النمو و تسهل بقائها على قيد الحياة وترتبط بالعديد من الامراض المزمنة لكن يمكن ان تتأثر بطبيعة السطوح لأن اول خطوة هو استيطان السطوح ويعتمد التحكم بها باستخدام المواد الكيميائية النشطة التي تقتل اسوداد السن أو تزيله لكن غالبًا ما يكون الحل الوحيد هو الإزالة الفيزيائية للغشاء الحيوي (Köse واخرون 2017) .

وتعرف المضادات الحيوية هي النواتج التي تنتجيها بعض الاحياء المجهرية , لها القدرة على تثبيط نمو أحياء المجهرية الاخرى و بتراكيز معينة دون التأثير على خلايا الجسم وتستخدم لتقليل الاصابات الناتجة عن انواع البكتريا المرضية و بشكل عام و *S.mutans* بشكل خاص تجاه العديد من المضادات الحيوية عند استخدامها كعلاج (Deschamps, واخرون,2020). .

تعرف بكتريا *S.mutans* بمقاومتها الدوائية المتعددة (Multidrug Resistant) باذ تتميز بقدرتها على مقاومة لمضاد (Cephalexin و Amoxicillin) (Yadav وأخرون، 2015) و لإيجاد حلول رخيصة الثمن وغير مكلفة لمثل المركبات النانوية وهي جسيمات نشطة بيولوجيًا لها وظائف مختلفة ,غير سامة وصديقة للبيئة وعامل مضاد للميكروبات حيث لها تأثير تثبيطي او القاتل للبكتريا المرضية ,اجريت العديد من الدارسات السابقة وخصوصا في السنوات الأخيرة لتوصيل العوامل العلاجية وتشخيص الأمراض بسبب خصائصها الفيزيائية والكيميائية الفريدة (Afrasiabi واخرون، 2021 ; Cui وأخرون، 2019).

2.1 الهدف من الدراسة Aim of study

تهدف الدراسة الحالية الى:

1- عزل بكتريا العقدية *S.mutan* من عينات سريرية من حالات تسوس الاسنان والتهاب اللثة .

2- التعرف على العزلات بالطرق المختبرية التقليدية وباستخدام نظام VITEK 2 .

3- الكشف عن حساسية المضادات الحيوية لعزلات *S.mutans* المقاومة للأدوية المتعددة (MDR).استخدام طريقة (Kirby-Bauer disk) .

4- تحديد اكثر العزلات البكتيرية *S.mutans* مقاومة للمضادات الحيوية .

5- دراسة تأثير جزيئات الشيتوزان النانوية على عزلات *S.mutans* الاكثر مقاومة للمضادات الحيوية .

6- دراسة قدرة عزلات *S.mutans* المقاومة للأدوية المتعددة على إنتاج أغشية حيوية .

7- تأثير جزيئات الشيتوزان النانوية على تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة .

الخلاصة Abstract

تم التحري عن المكورات العقدية *Streptococcus mutans* والتي تعتبر من مسببات الرئيسية لتسوس الأسنان ، في (50) عينة معزولة من المرضى المصابين بالتهابات اللثة وتسوس الاسنان من كلاً الجنسين ومن مختلف الفئات العمرية في المركز التخصصي الاول لطب الاسنان في بعقوبة/محافظة ديالى خلال الفترة من كانون الاول 2021 الى شباط 2022. شخصت العزلات اعتمادا على الصفات المظهرية و الكيموحيوية و باستخدام جهاز الفايتك (VITEK- 2 COMPACT). شملت هذه العزلات35 (70%) عينة من الذكور و15 (30%) عينة من الإناث ، ظهر النمو البكتيري في40 (80%) عينة من عينات تسوس الأسنان. حيث تضمن النمو انواعا مختلفة من , *Streptococcus. Spp* ، أما المكورات العقدية الطافرة *S.mutans* فقد ظهرت فقط في 10 عزلات (20%).

اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (Antibiotic susceptibility testing) لعزلات *S.mutans* المشخصة مختبريا باستعمال (7) مضادا حيويا باستخدام كيربي باور, على (3) عزلات اظهرت اعلى مقاومة للمضاد الحيوي Amoxicillin وحساسة لمضاد Doxycycline وهما اكثر المضادات شيوعا في علاج حالات التهاب اللثة وتسوس الاسنان.

واستخدم (3) عزلات لغرض تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) Minimum Inhibitory Concentra للشيتوزان النانوي الحر(CHNPs) Chitosan Nano Material المضاد للبكتريا مع حامض الخليك (Acetic Acid) وحامض الأسكوربيك (Ascorbic Acid) وبتراكيز مختلفة فأظهرت فعاليته من خلال زيادة اقطار مناطق التثبيط البكتيري للعزلات المدروسة .

بينت الدراسة الحالية ان قيمة (MIC) للشيتوزان النانوية مع حامض الخليك بلغت بتركيز (250 و500 و125) مايكرو غرام/مل للعزلات ومع حامض الأسكوربيك عند تركيز (250) مايكرو غرام/مل وبنسبة القتل البكتيري (90) .

اجري الكشف عن قدرة العقيدات الطافرة على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) باستعمال طريقة اطباق المعايرة الدقيقة(Micro-titter Plate(MTP على طول موجي (630) نانومتر باستخدام قارئ ELISA لتحديد التركيز المثبط الادنى للأغشية الحيوية التي تشكلت عن طريق الالتصاق بأسطح اطباق المعايرة , اظهرت (3) عزلات قبل اضافة الشيتوزان النانوي كانت مكونة للأغشية الحيوية وبنسبة 100% عند ذوبان جزيئات الشيتوزان النانوية في محلول الأسكوربيك بتركيز (20%) ومحلول حامض الخليك بتركيز (10%) لمعرفة فعاليتها في تثبيط الاغشية الحيوية Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) المكونة من قبل البكتريا *S.mutans* بتراكيز متضاعفة ومتسلسلة. ان قيمة التركيز المثبط الادنى للأغشية الحيوية MBIC هو عند(50) .

اظهرت جزيئات الشيتوزان المذابة مع محلول الأسكوربيك فعاليتها وكانت قيمة التركيز المثبط الادنى للأغشية الحيوية (MBIC) (31.3) مايكرو غرام/مل في حين ان جزيئات الشيتوزان النانوية المذابة في محلول حامض الأسكوربيك فعالة كبيرة ضد عزلتين من البكتريا عند تركيز(31.3) مايكرو غرام/مل لكن العزلة لثالثة كانت مقاومة بتركيز(62.5) مايكرو غرام/مل، أما نتائج فعالية جزيئات الشيتوزان النانوية المذابة مع محلول الأسيتك كانت عالية ضد العزلات الثلاثة المستخدمة عند تركيز(31.3) مايكرو غرام/مل.