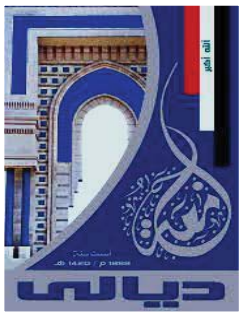
جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة



تأثير ناقلات الدهون النانوية المحملة بمستخلص اوراق وثمار النيم على التعبيرالجيني لبعض جينات مضخة الدفق للزائفة الزنجارية المعزوله من مصادر سريرية مختلفة

أطروحة

مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

سهام احمد يوسف القيسي

بكالوريوس علوم حياة_كلية العلوم للبنات_جامعة بغداد 2003-2004

ماجستير علوم الحياة_كلية التربية للعلوم الصرفة_جامعة ديالى 2018- 2019-

بأشراف

أ.م.د.أبتسام بداي حسان **ا.د.منى تركي الموسوي**

1445هـ 2023م

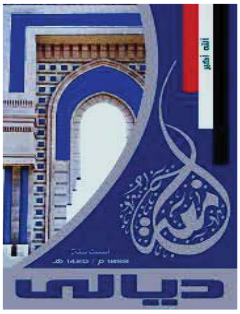
The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

Diyala University

College of Education for Pure Sciences

Department of Biology



Effect of lipid nanocarriers loaded with extract of *Azadirachta indica* leaves and fruits on the gene expression of some efflux pump genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical sources.

A thesis

Submitted to the Council College of Education for Pure Sciences /Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctorate of Philosophy in Biology .

By

Seham Ahmed Yousef

B.Sc. of Biology- College of Science for Women - University of Baghdad 2003-2004

M.Sc. of Biology-College of Education for Pure Sciences- University of Diyala 2018-2019

Supervised by

Assist. Prof.

Dr. Ibtesam Badday Hassan

Prof.

Dr.MunaTurki AL-Musawi

1445 AH

2023 AD

Introduction:

The World Health Organization (WHO) in 2017, recognized the inclusion of multidrug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) as one of the pathogens in the ESKAPE group and confirmed the critical requirement for creative approaches in confronting the severe infections related with these particular microorganisms (Idris and Nadzir, 2023).

According to data from CDC, (2019) for the last decade, the identified of MDR *P. aeruginosa* infection were reached 32,600 cases and 2700 deaths associated with an expense of 767$ million in healthcare costs annually. *P. aeruginosa*, a Gram-negative (G-ve) pathogen, opportunistic and nosocomial infections (NIs) worldwide, that infects patients with burn wounds, cystic fibrosis, immunodeficiency, cancer, chronic obstructive pulmonary disorder and severe infection requiring ventilation, such as COVID-19 (Qin *et al.*,2022). Lansbury *et al.*,(2020) identified *P. aeruginosa* as the second of most common bacterial co-infection that isolated from patients with COVID-19. This causes an increase in the complication of clinical management of disease.

One of the highest challenges in treating their infections is that associated with biofilms. The complex structure of *P. aeruginosa* biofilm contributes an additional factor to their pathogenicity leading to failure of therapy and to escape from the immune system, in addition generating chronic infections that are difficult to eradicate (Tuon *et al.*, 2022). Also one of the factors associated with biofilm drug resistance is presence of various types of efflux pumps (EPs) in the bacteria. EPs play a role in biofilm formation by effecting Physical-chemical interactions, gene regulation, mobility, quorum sensing, toxic compound extrusion

and extracellular polymeric substances (Hajiagha and Kafil, 2023). EPs are proteinaceous transporter machinery system that localized within bacterial cell membrane. Until now, Six families of EPs have been described, five of them by Sun *et al.*, (2014) and the sixth by Hassan *et al.*, (2018). Active efflux systems may be responsible for resistance to several chemically antibiotics and bactericides , with frightening numbers of occurrences in the environmental and clinical isolates (Sanz-García *et al.*,2021). The presence of EP genes in the bacteria can be considered the first step in the conviction of resistance to antibiotics (Schmalstieg *et al.*, 2012). In its core genome , there are several antibiotic resistance genes , such as blaampC and the encoding multidrug EPs (Mex) genes, which are part of resistance nodulation-cell division (RND) superfamily, including MexAB-OprM , MexCD-OprJ , MexEF-OprN and MexXY (Valot *et al.*, 2015). The four Mex genes in *P. aeruginosa* are involved in the throwing of toxic molecules and participate to reduced susceptibility of antibiotic (Colclough *et al.*,2020). Morever, overexpression of these Mex genes in *P. aeruginosa* is directly related with resistance to mostly anti-pseudomonal drugs (Bialvaei *et al.*,2021), and can potentially reduce the activity of new classes of drugs development against *P. aeruginosa* and other G-ve pathogens (Jones *et al.*,2019; Krause *et al.*,2019). Through last decade, a broad spectrum of plant extracts and herbal drugs have been used as alternative therapy. *Azadirachta indica* A. Juss *(A. indica*), known as Neem, belongs to meliaceae family and is widely distributed in Asia and other tropical parts of the world (Sombatsiri *et al.*, 1995). In Iraq, Neem trees cultivation are widespread in the public streets. Currently enrolled, the extensive antimicrobial effectiveness of Neem are being exploration through research in many fields of bacteriology, virology, mycology, parasitology, dentistry and food safety (Wylie and Merrell ,2022).

Moreover, have bio-active compounds with their applications (Sarah *et al*., 2019). Lipid nanoparticles (LNs) have been used in pharmaceutical field due to their value in green chemistry. LNs can be employed as carriers for both hydrophilic and lipophilic drugs. Nanostructured lipid carriers (NLCs) are attractive delivery systems because of their facilitating of manufacture, easy scale-up of formulation constituents, biodegradability, biocompatibility, longer stability profile, drug targeting, controlled drug release profile and nontoxicity (Xu ,*et al*., 2022). Chitosan (CS), poly {β-(1-4) -linked-2- amino-2- deoxy-dglucose}, is a natural cationic polysaccharide that obtained by chitin deacetylation, it has been extensively used for its application in pharmaceutical field because of its favorable characteristics, as non-toxicity , biodegradability and biocompatibility , as well as its biomembrane permeability and mucoadhesiveness (Elmizadeh *et al*., 2013; Mun *et al*., 2014). In Iraq, MDR *P. aeruginosa* infection is common and investigates their RND-type EPs genes through many of studies, such as by Absawe and Tuwaij (2022); Alsaadi, (2022); Yaseen and Ahmed, (2023).

Aims of study:

1. Prepare and characterize Neem extract (NeE) that have bioactive chemical composition loaded on Chitosan-nanostructured lipid carriers (CS-NLCs) as green synthesis nanoparticles to enhance their antimicrobial properties and activity.

2. Evaluation of its effective actirity on inhibiting gene expression of some efflux pump genes in MDR *P. aeruginosa* isolated frome different clinical sources.

الخلاصة

جمعت (220) عينة سريرية من مرضى يعانون من أمراض سريرية مختلفة ممن راجعوا مستشفى بعقوبة العام ومختبر الصحة العامة ومستشفى البتول للأطفال في محافظة ديالى خلال الفترة من تشرين الثاني 2022 إلى آذار 2023. جمعت العينات السريرية من الجروح والحروق والادرار والقدم السكري والخراج والبلغم وأذن المرضى.

هدفت الدراسة الحالية إلى تحضير وتوصيف مستخلص النيم (NeE) الذي يمتلك تركيبة كيميائية فعالة حيويا محمل على ناقلات دهون ذات بنية نانوية للكيتوسان (CS-NLCs) كجسيمات نانوية تخليقية خضراء لتعزيز خصائصه المضادة للميكروبات وفعاليتها. أيضا تقييم فعاليته في المختبر كمثبطات محتملة لمضخات التدفق (EPIs) ومضاد للاغشية الحيوية ضد الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للأدوية المتعددة والمعزولة من مصادر سريرية.

أعطت 50 عينة نتائج إيجابية كعزلات *P. aeruginosa* مفترضة (22.7٪) عند زراعتها باستخدام أكار الدم ، و أكار MacConkey ، و أكار Pseudomonas ، و أكار Cetrimide ، ثم حددت عن طريق الفحص العياني والمجهري مع الاختبارات الكيميائية الحيوية والتأكيد بواسطة جهاز Vitek -2.

أجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics susceptibility test(AST) باستخدام طريقة الانتشار القرصي كيربي باور ضد 10 أقراص مضادات حيوية (Ceftazidime ، Cefotaxim ، Amikacin ، Pipracilin، Levofloxacin ، Gentamicin ، Oflaxacin، Imipenem ، Meropenem and Ciprofloxacin). أظهرت النتائج أن عزلات *MDR* و *XDR* و *P. aeruginosa PDR* وصلت إلى 25 (50٪) و 7 (14٪) و 3 (6٪) على التوالي ، علاوة على ذلك ، اظهرت مقاومة عالية ضد المضادات الحيوية Beta lactam(Ceftazidime وCefotaxim وصلت إلى 48 (96٪) و 43 (86٪) على التوالي ، وPenicillin { Pipracilin 40(80٪) كمقاومة وحساسية متوسطة} ، Aminoglycosides {Amikacin 34 (68٪)} Fluoroquinolones { Levofloxacin 28 (56٪)}. بينما سجل MDS 15 (30٪) حساسية Imipenem , Ciprofloxacin وصلت إلى 36 (72٪) لكل منهما ، بينما Oflaxacin 35 (70٪).

اظهر اختبار إنتاج الأغشية الحيوية بطريقة صفيحة المعيار الدقيق أن جميع عزلات *P. aeruginosa* 3 (100٪) كانت منتجة قوية للأغشية الحيوية وأن عزلات *P. aeruginosa* XDR كانت 2 (28.6٪) قوية و 5 (71.4٪) متوسطة.

اظهرت نتائج الكشف عن جينات مضخات التدفق (EPs) بواسطة تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل الأحادي والمتعدد أن جميع عزلات *P. aeruginosa* PDR وXDR تحتوي على ما لا يقل عن اثنان إلى أربعة جينات EPs . اكتشف MexC و MexY في كل منهم 10 (100٪) ، يليه جين Mex-B في نصفهم 5 (50٪) ، ثم MexX 2 (20٪) و OprM 1 (10٪) بينما لم يكتشف MexA في جميع هذه العزلات.

تم إجراء الفحص النوعي والكمي للمواد الكيميائية النباتية في مستخلصات كحول أوراق النيم (NeE) لتقييم وجود مكونات فعالة حيويا ، كشفت النتائج الخاصة ب Terpenoids والليمونين والفينولات والفلافونويد وغيرها. فضلا عن تحضير زيت ثمار النيم لاستخدامه في عملية التركيب النانوي

طورت جسيمات الكيتوسان النانوية (CSNPs) وناقلات الدهون ذات البنية النانوية (NLCs) لتحضير NeE-CSNLCs ووصفت بمقياس الطيف الضوئي للامتصاص المرئي للأشعة فوق البنفسجية ، ومطياف فوريير لتحويلات الأشعة تحت الحمراء (FTIR) ، تحليل المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) ، الأشعة السينية المشتتة للطاقة (EDX) وحيود الأشعة السينية (XRD). كانت النتائج بين قيم NeE و CS و NeE-CSNLCs مختلفة وأثبتت نجاح تحضير NeE-CSNLCs بامتلاكه مظهر كروي بقطر يتراوح (73.05-44.58) نانومتر وشكل متجانس نسبيا.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لـ NeE و NeE-CSNLCs باستخدام تحليل الحد الأدنى من التركيز المثبط (MIC) وتحت MIC بواسطة طريقة لوحة المعايرة الدقيقة في وجود صبغة resazurin ضد اربعة عزلات XDR و PDR *P.aeruginosa* منتجة بقوة ومتوسطة للأغشية الحيوية. اذ كان MIC لكل من NeE و NeE-CSNLCs (250 إلى 125) ميكروغرام / مل و (18.75 إلى 9.3) ميكروغرام / مل ، على التوالي. وظهر فرقا كبيرا مهم احصائيا ($P \leq 0.01$) بينهما.

اجري تقييم NeE-CSNLCs المحضر كمثبط قوي لجينات مضخات التدفق EPIs ضد عزلتين (ألاولى *P. aeruginosa* PDR منتجة قوية للغشاء الحيوي والثانية *P.* XDR *aeruginosa* منتجة متوسطة للغشاء الحيوي) التي كل منهما تحتوي على اربعة جينات EPs ، من خلال تقييم مستوى التعبير الجيني بواسطة تقنية qRT PCR. أظهرت النتائج كفاءة NeE-CSNLCsعلى أنها EPIs عالية لكل من MexC و OprM ، كما أن لها فرقا كبيرا مهم احصائيا ($P \leq 0.01$) مقارنة مع NeE و CS لوحدهما .