وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

فعالية بعض الاكاسيد المعدنية النانوية على التعبير الجيني لبعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة لفطر *Candida albicans* المعزولـة من قرحة القدم السكري

اطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

وهو جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل

فاتن علي أحمد الجلبي

بكالوريوس علوم حياة / كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية 1998

ماجستير احياء مجهرية / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2012

بإشراف

أ.م.د. رباب مجيد عبد **أ.د.محسن هاشم رسن**

1445 هـ **2023 م**

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure Sciences
Department of biology

The effectiveness of some nano-metal oxides on the gene expression of some genes responsible for the virulence factors of the fungus *Candida albicans* isolated from Diabetic Foot Ulcers

A thesis

submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences

at the University of Diyala as part of the requirements for obtaining

the degree of Doctor of Philosophy in Biology

By

Fatin Ali Ahmed Al-Chalabi

B.Sc . Biology / College of Science / Al-Mustansiriya University / 1998
M.Sc. Microbiology / College of Education for Pure Sciences
University of Diyala / 2012

Supervised by

Professor. Dr

Muhsen Hashim Resin

2023 A.D

Assist. Prof. Dr

Rabab Majed Abd

1445 A.H

1. المقدمة Introduction

مرض السكري Diabetes mellitus (DM) هو مرض مزمن متعدد العوامل يحدث عندما لا يستطيع البنكرياس إنتاج كمية كافية من الأنسولين أو لا يستطيع الجسم استخدام الأنسولين الذي يفرزه بشكل فعال. يعاني المرضى المصابون بمرض السكري من مضاعفات متعددة ومن هذه المضاعفات الاعتلال العصبي ، أمراض الكلى ، السمنة ، ارتفاع ضغط الدم ، أمراض القلب والاوعية الدموية ، زيادة التعرض للأمراض المعدية المختلفة ، إصابات القدم ، ضعف السمع ، مرض الزهايمر ، فقدان الذاكرة ، الالتهابات الفطرية والبكتيرية بسبب النقص في المناعة الخلوية والخلطية (Markakis وآخرون ، 2016 ؛ Kim ، 2019).

يمكن أن يتسبب مستوى الجلوكوز غير المسيطر عليه في الدم إلى إعتلال الأعصاب المحيطية وضعف الدورة الدموية ، خاصة في الأطراف السفلية وهذا يزيد من خطر الإصابة بالتهابات القدم في مرضى السكري (Pickwell وآخرون، 2015)، في نفس الوقت العدوى لا يلاحظها المرضى بسبب نقص قدرة هؤلاء المرضى على الشعور بالجروح والتهيج بأقدامهم (Bakker وآخرون ، 2016). من أكثر المضاعفات شيوعًا وخطورة لهذا المرض هي قرحة القدم السكرية Diabetic Foot Ulcers (DFUs) في مرض السكري غير المتحكم فيه ، العدوى هي في الغالب متعددة الميكروبات بين البكتيريا الهوائية الموجبة لصبغة كرام واللاهوائية والفطرية، وقد يؤدي الاكتشاف المبكر للعدوى الفطرية وبدء العلاج المناسب في وحدات DFU إلى التئام الجروح وتجنب البتر(Kandregula وآخرون، 2022)، بمجرد تلف الغطاء الواقي للجلد يمكن ان تصل عدوى البكتريا والفطريات إلى الأنسجة العميقة ، وعادة ما يحتاج المرضى الذين يعانون من DFUs إلى بتر

الأطراف السفلية (Ramirez-Acuña وآخرون، 2019). وفقًا لما جاء به الباحث Lazzarini واخرون 2015 فإن واحدًا من كل 30 مريضًا في المستشفى في أي وقت يتأثر بعدوى القدم السكرية، تنشأ جميع حالات التهابات القدم السكرية تقريبًا من قرحة القدم السكري ، ويصل معدل انتشارها هذه العدوى بين 25–60٪ (Jia وآخرون، 2017).

تعد الالتهابات الفطرية من الأمراض المهمة ذات التأثير الكبير على حياة الإنسان، لأنها ناتجة عن الكائنات الدقيقة (الفطريات) التي تتشابه في التمثيل الغذائي والنشاط الخلوي للخلايا المضيفة (بشرية أو حيوانية)، مما يجعل التشخيص والعلاج صعبًا ، وكذلك صعوبة تحديد أسباب الإصابة بالفطريات من قبل المختصين (Carmona و Limper، 2017). تعيش بعض الفطريات بشكل طبيعي على الأغشية الظهارية لمعظم البشر الأصحاء ، ولكنها يمكن أن تبدأ في تشكيل نظام يهدد الحياة في أولئك الذين يعانون من نقص المناعة ، إذ تسبب التهابات الأظافر وسعفة القدم Tinea Pedis وعدوى قرحة القدم السكري (Gariani وآخرون، 2014؛ Cole وآخرون، 2017).

تعد فطريات *Candida sp* أعلى نسبة بين الفطريات المعزولة من قرحة القدم السكري، ويفسر ذلك في كون المبيضات من الأحياء الطبيعية للجسم ولكن مع إصابة الأنسجة بسبب الصدمة الداخلية أو الخارجية فإنها تدخل الجرح ، إذ تختلف البيئة عن سطح الجلد في العديد من الظروف مثل التغذية ودرجة الحرارة ودرجة الحموضة، وهذا يمكن أن يغير من التمثيل الغذائي للمبيضات وتتحول من التكافلية إلى الانتهازية وتصبح أكثر ضراوة (Stevens وآخرون ، 2014). غالبًا ما يتم تشخيص أنواع المبيضات *Candida sp* في المرضى الذين يعانون من التهابات الغشاء المخاطي والجلد والأظافر والأمراض الجهازية (Minooeianhaghighi وآخرون، 2020). ومن أشهر أنواع الـ *Candida* هو النوع *Candida albicans*

المبيضات البيضاء *Candida albicans* هي خمائر تعيش داخل الإنسان بصورة طبيعية، وتتواجد في الجهاز التنفسي العلوي ، والفم ، والأمعاء ، والمهبل ، كما أنها تصبح خميرة ممرضة عندما تغزو الغشاء المخاطي (عدوى انتهازية) في الأفراد الذين يعانون من نقص المناعة ، وتكون قادرة على التسبب في التهابات تتراوح من الالتهابات السطحية للجلد إلى الالتهابات الجهازية التي تهدد الحياة (Tariq و Abbas ، 2022). تعـدّ أنواع المبيضات *Candida sp* أهم مسببات الأمراض البشرية الانتهازية التي تمثل 70- 90 ٪ ، وإنّ الامراضية التي تسببها هذه المبيضات في الإنسان تعتمد على مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة مثل عوامل الالتصاق، وتكوين الأنبوب الجرثومي، وتكوين الخيوط الفطرية، وإفراز إنزيمات مثل Phospholipase ، proteinas ، والأغشية الحيوية المقاومة للأدوية، أما *Candida albicans* فهي قادرة على إنتاج وإفراز الإنزيمات hydrolytic enzymes ، وخاصة aspartic proteases (Saps)، يعد إنتاج هذه الإنزيمات هو تكيف تطوري للممرضات للاستفادة من العناصر الغذائية والبقاء على قيد الحياة في المضيف (Jalal وآخرون، 2018).

تلعب بروتينات Secreted aspartyl proteinase (Sap) الناتجة من التعبير الجيني لجينات *SAP* المكونة من 10 جينات (Sap1-10) دور رئيساً في ضراوة *Candida albicans* أثناء العدوى الفطرية، إذ تشارك في عملية العدوى عن طريق تحطيم العديد من بروتينات الخلية المضيفة، مثل الغلوبولين المناعي immunoglobulins ، وبروتينات النظام التكميلي proteins of the complement system، مما يسمح للفطر بالهروب من الخط الأول من دفاع المضيف ، وتلف الأنسجة ، وما ينتج عنه غزو الكائنات الحية المجهرية الاخرى (Monika و Zbigniew، 2017) .

إنّ تطور مقاومة السلالات الميكروبية ضد المضادات الحيوية أحد التحديات المهمة في علاج الأمراض، ويعد الاختيار المحدود للعوامل المضادة للفطريات أيضًا أحد أكثر المشكلات التي يمكن تحديها بشأن الأمراض الفطرية ، إذ ظهرت تحديات خطيرة لمقاومة الأدوية في عدوى المبيضات البيض، لذلك كان التوجه لايجاد عوامل مضادة جديدة للفطريات المقاومة لعلاج المرضى المصابين بهذه الأنواع بشكل فعال (Hajar وآخرون، 2022).

تعد الجسيمات النانوية من بين العوامل الجديدة المستخدمة كمضادات للميكروبات ، اذ تتميز الجسيمات النانوية بمساحة سطحية نسبة إلى الحجم تجعلها قادرة على اختراق الأنسجة والخلايا بشكل أفضل (Niederberger و Pinna، 2009) . بعض الجسيمات النانوية لأكسيد المعادن بما في ذلك ZnO وCuO والـ Ag لها تأثيرات مضادة للفطريات (Karimiyan وآخرون، 2015).

السمية الجينية للمواد النانوية هي مصدر قلق خاص، إذ أن تغيير المادة الوراثية قد يؤدي إلى موت الخلايا وخلل الأنسجة وتطور السرطان والآثار السلبية على الإنجاب و ضعف الخصوبة. الجلد هو أكبر عضو في الجسم ويمكن أن يخدم طريق بوابة مهم لدخول NPs في جسم الإنسان (Sharma وآخرون، 2010). لذلك هدفت الدراسة إلى دراسة فعالية بعض الجسيمات النانوية في تثبيط بعض جينات الضراوة لـ *Candida albicans* والمعزولة من قرحة القدم السكري ، ولتحقيق الهدف المذكور في أعلاه تم تنفيذ الخطوات الاتية :

1. عزل وتشخيص خميرة الـ *Candida albicans* من قرحة القدم السكري .
2. الكشف عن وجود جينات الضراوة *SAP 9 , SAP 7* في عزلات الـ *Candida albicans* باستخدام تقنية الـ PCR .
3. فحص حساسية العزلات ضد أنواع مختلفة من المضادات الفطرية .
4. دراسة التعبير الجيني لجينات الضراوة قبل وبعد المعاملة بأوكسيد الزنك النانوي ZnONPs، لمعرفة التأثير التثبيطي على تلك الجينات .
5. دراسة التعبير الجيني لجينات الضراوة قبل وبعد المعاملة بأوكسيد النحاس النانوي CuONPs لمعرفة التأثير التثبيطي على تلك الجينات .
6. دراسة التعبير الجيني لجينات الضراوة قبل وبعد المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs لمعرفة التأثير التثبيطي على تلك الجينات.
7. قياس السمية الخلوية للأكاسيد النانوية باختبارها على الخط السرطاني A375 والخلايا الطبيعية HdFn.

Summary

203 samples (swab) were collected from diabetic patients suffering from diabetic foot ulcers (DFUs) from patients receiving treatment at Yarmouk Teaching Hospital and private outpatient clinics, under the supervision of a specialist physician, for both sexes. 105 (51.7%) were male, 98 (48.3%) were female. The age group (46-65) years had the highest incidence of diabetic foot ulcers (65%). Patients with diabetes of 3-10 years had an incidence rate of 63 (55.75%). All samples were subjected to fungal culture, and the initial isolation results showed that 113 samples (56%) were positive for fungal isolation and 90 (44%) were negative for fungal examination. Positive fungal growth of clinical samples was 59 (52.21%) in females, while it was 54 (47.78%) in males. With regard to age, the age group 46 - 65 was the highest percentage among other age groups at 72 (63.71%). As for the number Years of living with diabetes, the results showed that the time period 3-10 was the highest by 63 (55.75%) compared to the other time periods.

After conducting phenotypic and microscopic examinations and confirming the diagnosis using VITEK 2 COMPACT, the results showed that among the 113 isolates that gave a positive result for fungal growth, 15 clinically pathogenic isolates (13.27%) gave a positive result for *C. albicans* yeast, and 66 isolates (58.40%) gave a positive result for *C. albicans* yeast. were different types of Candida sp. While 32 isolates (28.32%) were negative for yeast growth. The results showed that *C. albicans* levels were 60% higher in females compared to 40% in males. *C. albicans* was present in the highest percentage in the 46-65 age group (53.33%). In this study, the time period for diabetes was 3-10 years and the highest rate of *C. albicans* infection was (60%).

All *C.albicans* isolates (15 isolates) underwent detection of genes (*SAP* 7 and *SAP* 9) by polymerase chain reaction (PCR). After electrophoresis of the PCR product, the results showed that all 15 isolates studied contained *SAP* 7 and *SAP* 9, with clear and visible bands, at a length of (440bp for the *SAP 7* gene) and (556 bp for the *SAP* 9 gene).

The results of testing the sensitivity of the 15 *C. albicans* isolates containing *SAP*7 and *SAP*9 genes to four antifungals, which included Fluconazol, Ketoconazol, Amphotrecin B, and Clotrimazol, showed that all clinical *C. albicans* isolates showed sensitivity to the antifungals. The results showed that the two antifungals, Ketoconazol and Amphotrecin B, were most effective in inhibiting 93% of *C. albicans* isolates, while the antifungal Fluconazol only inhibited 6.7% of the isolates.

The MIC of the nanomaterials (CuONPs, ZnONPs, AgNPs) was determined after inoculation of *C. albicans* isolates. The results of the study showed that the average MIC value of the nanomaterials used ranged between (250 - 62.5) micrograms/ml, while the Sub MIC value was 125 - (31.25). The MIC for nanosized zinc oxide was 250 µg/ml for all selected isolates. The MIC for nanosized copper oxide for *C. albicans* isolates was 250 µg/ml for isolate CAA1 and for the remaining three isolates was 125 µg/ml. While the MIC for AgNPs against *C. albicans* isolates was 250 µg/ml for isolate CAA1, 62.5 µg/ml for isolate CAA2, and 125 µg/ml for isolates CAA5 and CAA11.

Gene expression of *SAP*7 and *SAP*9 genes in *C. albicans* isolates was measured by real time PCR before and after treatment with the nanomaterial and at the SubMIC concentrations for each isolate and each nanomaterial. The results of our study showed an increase in the gene expression of the *SAP7* gene for the four isolates (CAA1, CAA2, CAA5, CAA11) after treatment with

c

ZnONPs compared to Control, as isolate CAA1 was superior in gene expression to the rest of the isolates, as the value of Fold Change2□-ΔCt was (16.67945), while Gene expression results for the *SAP9* gene showed that all isolates had a decrease in gene expression after being treated with nanozinc oxide compared to the control.

The results of the study showed that the *SAP7* gene showed a decrease in gene expression in the three isolates (CAA2, CAA5, CAA11) after treating the isolates with CuONPs. While isolate CAA1 showed a noticeable increase in gene expression. As for the results of gene expression for the *SAP* 9 gene, the four selected isolates showed a decrease in gene expression values after treatment with CuONPs.

The gene expression results for the genes under study after treatment with AgNPs showed that there was an increase in the gene expression values of *SAP*7 for the two isolates CAA1 and CAA11 and a decrease in the gene expression values for the two isolates CAA2 and CAA5, while the gene expression results for *SAP* 9 after treatment with AgNPs showed that there was an increase in gene expression values for isolates CAA1 and CAA11 and a decrease in gene expression values for isolates CAA2 and CAA5.

The results of the MTT cytotoxicity test for the obtained ZnONPs nanoparticles showed activity against the cancerous line A375 compared to normal □dFn cells. The IC50 value towards A375 was 33.41 µg/m□ while the IC50 towards normal □dFn cells was 4□1.1 µg/m□. CuONPs showed activity against A375, as the IC50 value was 139.5 µg/m□. On the other hand, the IC50 towards normal □dFn cells was 304.2 µg/m□. AgNPs showed activity against cancerous line A375 compared to normal □dFn cells as the IC50 value was 15.5 µg/ml towards A350, on the other hand the IC50 towards normal □dFn cells was 300.5 µg/ml.