وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

دراسة التأثير المايكروبي القاتل للبايوسيانين تجاه العزلات الفموية والجلدية لخميرة المبيضات البيضاء المشخصة جزيئياً

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة
زينب ياسين خضير
بكالوريوس علوم الحياة (2014-2015) /جامعة ديالى

بإشراف

د. زهراء جعفر جميل
أستاذ مساعد

د. عباس محيي مزهر
مدرس

1442هـ

2020م

1.المقدمة Introduction

الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* أحدى أنواع بكتريا سالبة لصبغة جرام، التي تنمو عند درجة حرارة 37 °م ولها القدرعلى النمو عند 42 °م وهذا ما يميزها عن الأنواع الأخرى (Garrity *et al*.,2005; Aravindhan *et al*.,2014) تنتج عوامل ضراوة مثل صبغة الفينازينphenazine (الحمراء) وصبغة البايوسيانين Pyocyanin(الخضراء المزرقة)عادة ما تستعمل كعوامل سيطرة حيوية ضد أنواع الفطريات والطفيليات والبكتريا (EI-fouIy *et al*.,2015).

البايوسيانين (Pyocyanin) مشتق من الفينازين ذات اللون الأخضر المزرق وهي احدى أنواع الصبغات التي تنتجها بكتريا الزائفة الزنجارية تركيبها الكيميائي (Methyle-1hydroxyphenazine) والتي عادة ما تعمل بتدمير الأهلاب الموجود في الجهاز التنفسي للإنسان، كما يظهر الايض الثانوي القابل للذوبان في الماء(البايوسيانين) نشاط مضاد للمكروبات ضد مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة ، كذللك يعمل التأثير الميكروبي كمضاد واسع وقاتل في الطبيعة :Denning*etal*.,1998) OnbasliandAslim,2008: Ozyurek *etal*.,2016). تشير الدراسات المختبرية أن PCN يتداخل مع وظائف خلوية متعددة منها أهميته أثناء العدوى السريرية غير مؤكدة ويرجع ذلك الى صعوبة تحديد مساهمة (PCN) من العديد من عوامل الضراوة التي تنتجها الزائفة الزنجارية اثناء العدوى بالإضافة الى عدد قليل من المسارات الخلوية المتأثرة البايوسيانين (Lau *et al*., 2004). يتميز بانه ايض متعدد الوظائف منها له دور في التنفس الخلوي، تحريض موت الخلايا المبرمج، وتلف الانسجة (Chieda *etal*.,2008). يمكن أن يعمل PCN كعامل مضاد للميكروبات عن طريق تثبيط نمو عدة أنواع من البكتيريا والفطريات، كما يحتوي أيضًا على مضاد ضد عدة أنواع من الفطريات وأنواع المبيضات EI- Shouny *et al*.,2011: Gharieb (.*et al*.,2013)

الفينازين(Phenazines) عبارة عن مركب يتكون من مجموعة كبيرة من مركبات النتروجين التي تحتوي على مركبات حلقية غير متجانسة التي تنتجها مجموعة متنوعة من البكتريا (Pierson *etal*.,2010) كما أظهرت الدراسات السابقة أن مركبات الفينازين لها دور واسع في نشاط مضاد للميكروبات ضد سلالات *Bacillus subtilis* و *Candida albicans*(Makarand *etal*.,2007) .

يحتوي جنس المبيضات *Candida*على حوالي 200 نوع مختلف، ولكن عدداً قليلاً فقط من الأنواع هي مسببات الأمراض الانتهازية البشرية وتسبب الالتهابات عندما يصبح المضيف ضعيفًا بسبب نقص في المناعة. يمكن أن تكون عدوى المبيضات سطحية التي غالبًا ما تؤثر العدوى السطحية على الجلد أو الأغشية المخاطية ويمكن علاجها بنجاح باستخدام الأدوية المضادة للفطريات الموضعية، (Spampinato and Leonardi,2013) الاستخدام الخاطئ للأدوية المضادة للفطريات في علاج الأمراض الفطرية يمكن ان يؤدي إلى تطوير المقاومة المضادة للفطريات، وظهور عزلات فطرية مقاومة للمضادات (Sanglard.,2016) .

عدوى المبيضات Candida infection تعد من أكثر الامراض الفطرية التي تحدث بشكل شائع في الانسان، والتي تصيب الغشاء المخاطي والجلد والأظافر والأعضاء الداخلية للجسم،(Hasan *et al*.,2015) تُعد خميرة المبيضات البيضاء *Candida albicans*هي اكثر أنواع خميرة المبيضات أمراضية التي يتم عزله من جسم الإنسان وقادره على ان تسبب العدوى الفطرية الانتهازية(Vilela *et al*., 2015) . وكذلك لها القدرة على غزو الأنسجة المضيفة وبالتي تؤدي إلى العدوى ومن بين هذه عوامل الضراوة هي قدرة *C.albicans* على التغيير الشكليDimorphism، والتعبير عن عوامل الالتصاق، والقدرة على تكوين الأغشية الحيوية (Galocha *et al*., 2019) بروتين جدار الخيط الفطري Hyphal Wall protein1 (*HWP1*)على الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية البشرية (Abastabaer *et al*.,2016). تعبير بروتين

Alpha-Int1 في المبيضات البيضاء مرتبط بشدة بالتغيرات المظهرية وزيادة التصاق الفطر بالخلايا الظهارية والبطانية (Shahin-Jafari *et al.*,2015).

أهداف الدراسة:

هدفت الدراسة الحالية الى التحري الجزئي القاتل ضد أحد أنواع جنس المبيضات Candida والأكثر عزلا من داء المبيضات (Candidosis) ولتحقيق هدف الدراسة تم اجراء الخطوات الاتية:

1. عزل بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* من مصادر سريرية وبيئية مختلفة ثم استخلاص البايوسيانين هذه البكتريا من مصادر مختلفة وقياس تركيز البايوسيانين باستخدام جهاز UV-Spectrophotometer ودراسة خصائصه الكيميائية باستخدام جهازي FTIR و GC-Mass

2.عزل وتشخيص أنواع خميرة المبيضات *Candida species* من مرضى داء المبيضات الجلدي Cutaneous Candidiasis وداء المبيضات الفموي Oral candidiasis

3. دراسة حساسية ومقاومة عزلات أكثر نوع من خميرة المبيضات أصابه للمرضى تجاه مضادات الامفوترسين بي (Amphotericin B)ومضاد الكيتوكونازول(Ketoconazole)

4. دراسة التأثير الضد ميكروبي للبايوسيانين ضد عزلات الخميرة المقاومة للمضادات قيد الدراسة باستخدام طريقة Well Diffusion methed

5.التحري الجزيئي عن جينات الضراوة لنوع الخميرة قيد الدراسة باستخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (PCR) والتحري عن وجود الطفرات باستخدامGene Sequencing

الخلاصة:

تعد صبغة البايوسيانين التي تنتجها بكتريا الزائفة الزنجارية احدى نواتج الايض الثانوي التي لها اثرمهم في فعالية البكتريا والتنافس في البيئة. أجريت الدراسة بهدف تقيم الاستجابة المايكروبيةالقاتلة للبايوسيانين تجاه عزلات خميرة المبيضات. شملت الدراسة الحالية من مجموع (190) عينة سريرية من الجروح والتهابات الحروق والتهابات المسالك البولية والدم والاذن الوسطى من المرضى بمستشفى بعقوبة التعليمي والعيادة الاستشارية / محافظة ديالى، خلال المدة من بداية شهر تشرين الاول (2019) لغاية نهاية شباط (2020) تم زرعها على السيدوموناس الصلب(Pseudomonas agar) وتم تشخيصها بالاختبارات الكيموحيوية وتم التأكيد في التشخيص باستخدام عدة التشخيص Analytical profile Index. تشخيص 42 عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وكذلك جمعت (30) عينة من بيئة التربة من أعماق مختلفة.

تم استخلاص صبغة البايوسيانين من العزلات السريرية والعزلات البيئية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وتم قياس تركيز الصبغة المستخلصة من مصادر مختلفة وكان اعلى تركيز لها من مصدر الدم بلغت 7,2 ملغم/ مول وبطول موجي 520 نانوميتر. تم تحليل مركب البايوسيانين باستخدام جهاز Fourier transform infrared spectroscopy للكشف عن المجاميع الوظيفية في التركيب الكيميائي والاواصرومن الأواصر التي أظهرت فعالية عند 3739.7 سم −1 الى وجود الاصرة (O-H) وعند القيمة 2333.8 سم −1الى وجود اصرة اروماتية (C-H) وعند القيمة 1660.7 سم −1الى وجود اصرة C=N وعند القيمة 1265.5الى وجود اصرة(C-O) وكذلك تحليلها باستخدام جهاز Gas Chromatography للكشف عن المركبات الفعالة ففي مصدر الحروق والأذن الوسطى مثل الفينازين ,Pyrrolo[1،2-a] ،hexahydro-3-(2-methylpropyl أما في مصدر الادرار مثل الفينازين Octadecene−1 وفي مصدر الدم الفينازين و Octadecene -1 وغيرها أما في مصدر