



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم
قسم علوم الحياة

تأثير المستخلص الكحولي لقشور الرمان *Punica granatum* على
التعبير الجيني للمورث ALS_1 في خميرة *Candida albicans*
المكونة للغشاء الحيوي والمعزولة من منطقة الفم

رسالة تقدمت بها الطالبة

أيسر عاشور خلف

بكالوريوس علوم الحياة / جامعة كربلاء 2011
إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء وهي
جزء
من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة - علم الحيوان

بإشراف

أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بعنوان (تأثير المستخلص الكحولي لقشور الرمان *Punica granatum* على التعبير الجيني للمورث ALS₁ في خميرة *Candida albicans* المكونة للغشاء الحيوي والمعزولة من منطقة الفم) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

الجامعة والكلية :

التاريخ : / / 2017

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد إن إعداد هذه الرسالة الموسومة بعنوان (تأثير المستخلص الكحولي لقشور الرمان *Punica granatum* على التعبير الجيني للمورث ALS_1 في خميرة *Candida albicans* المكونة للغشاء الحيوي والمعزولة من منطقة الفم) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الحيوان .

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2017

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من لدن الاستاذ المشرف , أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاسم : أ.م.د.ياسمين خضير خلف

المرتبة استاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2017

إلى خير مولود .. و احسن موجود ..

الى النبي محمد صلى الله عليه وآل بينته الاطهار

الى من سهر الليالي .. و نسي الغوالي ... و حمل همي غير مبالي ..

الى من تمنيت وجوده و مشاركته فرحتي ...

قدوتي والذي رحمه الله

الى من اثقلت الجفون سهرا ... و حملت الفؤاد هما .. و جاهدت الايام صبيرا .. و شغلت البال
فكرا .. و رفعت الايادي دعاء ..

والدتي الغالية

الى الروح التي سكنت روحي .. الى قلعتي الحصينة و سندي في الحياة

زوجي الحبيب

الى ... و رود المحبة .. و ينابيع الوفاء ..

ابنائي و اخوتي و اخواتي

اهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا

إلى خير مولود ..
و احسن موجود ..

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين و الصلاة و السلام على اشرف الانبياء و المرسلين محمد و آل بيته الطيبين الطاهرين .

الحمد لله العلي القدير الذي اسبغ نعمه ظاهرة و باطنة و شرح بنوره الصدور و اقر بنوره العيون , اسجد لله العظيم شكرا و حمدا على ما غمرتني به من سداد و توفيق و مامنني به من صبر و ثبات حتى تم انجاز هذه الرسالة .

يطيب لي أن اتقدم بجزيل الشكر و التقدير و الامتنان الى الاستاذ المساعد الدكتور هيام عبد الرضا العواد لاشرفها المباشر على العمل و كتابة البحث فضلا عن النصائح القيمة و الجهد و الدعم السخي الذي اثمر باخراج هذا العمل الى حيز الوجود .

كما اتوجه بخالص التقدير و الاحترام الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة و رئاسة قسم علوم الحياة لاتاحة الفرصة لي لاكمال دراستي .

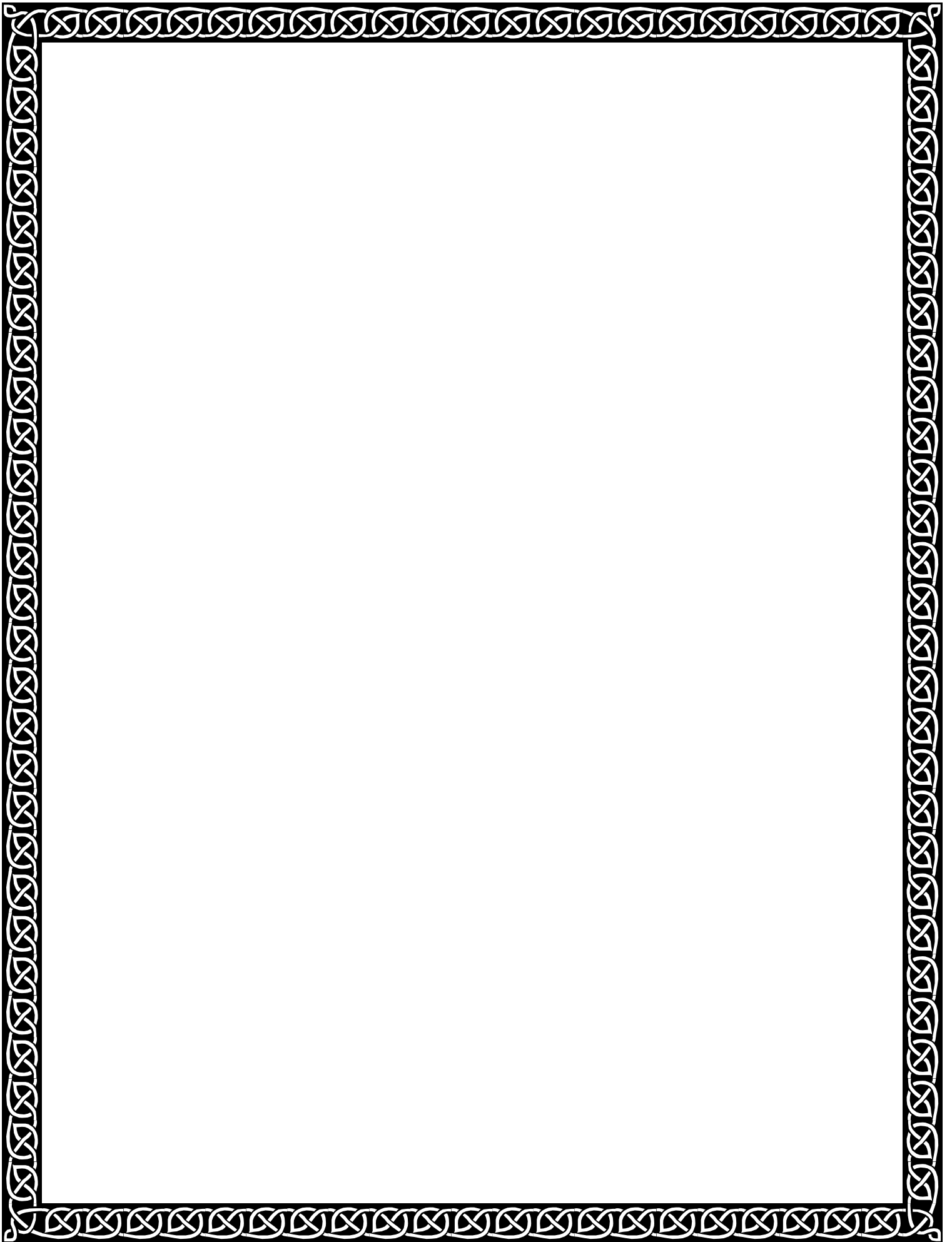
و من دواعي الوفاء أن اوجه شكري و تقديري الى عمادة كلية الطب البيطري و اخص بالذكر استاذ المساعد الدكتور وفاق البازي لتعاونهم البناء . واتقدم بالشكر و التقدير الى الدكتور حيدر علي محمد جزاهم الله على ذلك خير الجزاء و السيد محمد جليل لما قدموه لي من مساعدة . جعل الله ثمرة ذلك في موازين حسناتهم.

واتقدم بجزيل شكري و امتناني و تقديري للدكتور علاء عبد الحسين الدعي / كلية العلوم التطبيقية / جامعة كربلاء لتقديمه النصيحة و العون لانجاز ما يتطلبه البحث .

و لا يفوتني ان اتقدم بخالص امتناني الى مختبر الاحياء المجهرية في مستشفى المسيب العام ادارة و منتسبين لحسن المعاملة و الاخلاق .

و اتقدم بالشكر و التقدير الى عمادة كلية العلوم / و رئاسة قسم علم الكيمياء . و اتقدم بالشكر و التقدير الى زميلاتي العزيزات و لكل من قدم لي المساعدة او النصيحة او اهداني جواب اطفئ به حيرة سؤالي و ساهم في اتمام بحثي .

الشكر والتقدير



الخلاصة

تم تسليط الضوء في الدراسة الحالية على معرفة التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (EPGP) *Ethanolic Punica Granatum Peels* ضد خميرة *Candida albicans* ، وكذلك تقييم فعالية هذا المستخلص على قابلية تكوين الغشاء الحيوي biofilm لخميرة *C.albiacns* من خلال معرفة مستوى التعبير الجيني للجين (als_1) Agglutinin Like – Sequences باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي إذ تم جمع 62 عينة من خميرة الكانديدا وتم تشخيصها بواسطة الاختبارات التشخيصية والبايوكيميائية وتم عزل 31 (50%) تعود للنوع *C.albiacns* و 12 (19.35 %) تعود للنوع *C.dublinsiensis* و 11 (17.74%) تعود للنوع *C.tropicaliss* و 8 (12.90) تعود للنوع *C.krusei* ، ثم تم الكشف عن قدرة خميرة *C.albiacns* التي هي قيد الدراسة على قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة آكار احمر الكونغو Congo (red Agar (CRA)، واختبرت التراكيز 150 ، 100 ، 50 ، 25 ، (12.5 ملغم/ مل من المستخلص الكحولي لقشور الرمان (EPGP) على خميرة *C.ablicans* بطريقة الانتشار بالحفر وطريقة Microdilution Method ومن خلال استخدام تقنية qRT- PCR تم قياس مستوى التعبير الجيني للجين (ALS_1) لمعرفة التأثير التثبيطي للمستخلص للغشاء الحيوي ، وبينت النتائج أن 16 (51.6 %) من خميرة *C.albiacns* قادرة على تكوين الغشاء الحيوي وتضمنت { 6 (37.5 %) أعطت غشاء حيويًا قويًا strong و 62.5 %) 10 (أعطت غشاء حيويًا متوسطًا intermediate } وأن 15 (48.4 %) لم تكون غشاء حيويًا كما بينت النتائج بأن التركيز 150 ملغم/ مل قد أظهر أعلى منطقة تثبيط بلغت قيمتها 22 ملليمتر بينما التركيز 12.5 ملغم / مل أظهر أقل منطقتي تثبيط بلغت قيمتها 9 ملليمتر، وكذا تم حساب التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلص ضد خميرة إذ كانت قيمتها 12.5 ملغم / مل وعند حساب مستوى التعبير الجيني للجين ALS_1 يتبين أن التركيز 25 ملغم / مل هو التركيز المثبط الأدنى للغشاء الحيوي وبلغت مستويات التعبير الجيني للجين ALS_1 (0.21، 0.220، 0.394، 0.640) للتركيز (150، 100، 50، 25) ملغم/مل على التوالي في حين أن التركيز 12.5 ملغم / مل لم يظهر تأثيرًا واضحًا في مستوى التعبير الجيني عند مقاومته بالسيطرة عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ ، نستنتج من الدراسة الحالية كفاءة المستخلص الكحولي لقشور الرمان العالية في تأثيره على الغشاء الحيوي لخميرة

C.albicans من خلال تأثيره على الجين ALS_1 مما يدل على إمكانية استخدامه كعلاج للمصابين بمرض داء المبيضات *Candidiasis* لما له من فعالية عالية ضد الخميرة المسببة للمرض و ضد عوامل ضراوتها التي لها دور كبير في امراضيتها وجعلها مقاومة للمضادات الفطرية

الصفحة	الموضوع	ت
I - II	الخلاصة	1
III - VI	المحتويات	2
VII - VIII	قائمة الجداول	3
XI	قائمة الأشكال	4
X	قائمة المختصرات	5
	الفصل الأول	
	المقدمة	
	الفصل الثاني	
	استعراض المراجع	
4	خميرة <i>Candida albicans</i>	- 1
5	تصنيفها	1-1
5	امراضية خميرة <i>C.albicans</i> Pathogenecity of	2-1
6	أنواع (OPC) Oroharyngeal Candidiasis	1-2-1
7	عوامل الضراوة لخميرة <i>C.albicans</i> Virulence factors	3 -1
9	الغشاء الحيوي لخميرة <i>C. albicans</i>	4-1
9	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation	5-1
12	مقاومة الغشاء الحيوي للمضادات الفطرية	6-1
12	ما هي الفائدة من الغشاء الحيوي ؟	7-1
13	الجدار الخلوي لخميرة <i>C.albicans</i>	8-1
14	جينوم خميرة <i>C.albicans</i>	9-1
15	المضادات الفطرية وفعاليتها	-2
16	نبات الرمان <i>Punica granatum Linnaous</i>	-3
18	فعالية الرمان كمضاد للميكروبات	2-3
	الفصل الثالث	

	Materials and Methods المواد وطرائق العمل	
20	المواد وطرائق العمل	3-
20	المواد والاجهزة المستخدمة	1-3
20	الاجهزة والادوات المستخدمة والشركات المصنعة لها	1-1-3
21	المواد الكيميائية المستخدمة	2-1-3
22	الايوساط الغذائية المستخدمة والغرض من استخدامها	3-1-3
23	Kits العدد	4-1-3
24	Primers البادئات	5-1-3
25	المواد الكيميائية الخاصة بعمل RT –PCR	6-1-3
26	تصميم الدراسة study design	7-1-3
27	طرائق العمل Methods	2-3
27	الايوساط الزراعية الجاهزة	1-2-3
27	الايوساط الزرعوية المحضرة في المختبر	2-2-3
28	المحاليل المستخدمة	3-2-3
29	Sterilization التعقيم	4-2-3
29	Collection of Specimens جمع العينات	3-3
29	Isolation and Purification عزل العينات وتنقيتها	4-3
29	Identification التشخيص	5-3
29	وسط كروم آكار كانديدا	1-5-3
30	Microscopic examination الفحص المجهرى	2-5-3
30	Germ tube test اختبار الانبوب الجرثومي	3-5-3
30	Chlamyospores Test اختبار الابواغ الكلاميدية	4-5-3
30	Growth at 34 C° نمو في درجة الحرارة 45 م°	5-5-3
31	Integral system Yeast Plus (ISYP) العدة التشخيصية	6-5-3
31	Urease اختبار اليوريز	7-5-3
32	Congo Red Agar (CRA) اختبار احمر الكونغو	6-3
32	تحضير المستخلص الكحولي لقشور الرمان	7-3

33	اختبار حساسية خميرة <i>C.albicans</i> للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP)	8-3
33	طريقة الانتشار بالحفر Well diffusion method	1-8-3
34	اختبار التركيز المثبط الأدنى Minimum inhibitory Concentration (MIC)	2-8-3
35	اختبار تكوين الغشاء الحيوي لخميرة <i>C.albicans</i>	9-3
36	اختبار فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) على الغشاء الحيوي .	10- 3
37	فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)	11-3
37	استخلاص الاحماض النووية الكلي Total RNA extraction	1-11-3
38	قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الريبوسومي الكلي Assessing RNA Yield and Quality	2-11-3
39	المعاملة بأنزيم DNase I Treatment	3-11-3
40	طريقة تصنيع الـ cDNA synthesis	4-11-3
41	فحص - qRT - PCR (Quantitative Real – Time PCR)	5-11-3
43	طريقة تحليل بيانات Real – Time PCR data analysis	6-11-3
43	التحليل الاحصائي statistical Analysis	12- 3
	الفصل الرابع	
	النتائج والمناقشة	
44	النتائج والمناقشة	4
44	العزل والشخصية	1-4
55	الكشف عن قدرة خميرة <i>C.albcians</i> لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقة CRA	2-4
56	حساسية خميرة <i>C.albicans</i> للمستخلص الكحولي لقشور الرمان PGP	3-4

56	طريقة الانتشار بالحفر Well Diffusion Method	1-3-4
60	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) ضد خميرة <i>C.albicans</i>	2-3-4
62	نقاوة الحامض النووي المستخلص Total RNA وتركيزه	4-4
63	التعبير الجيني للمورثة ALS ₁ بطريقة العد النسبي Relative quantification	5-4
	الفصل الخامس	
74	الاستنتاجات	
74	التوصيات	
	المصادر	
75	المصادر العربية	
72	المصادر الاجنبية	

قائمة بالجدول

الصفحة	الموضوع	ت
20	الاجهزة والادوات المختبرية.	1-3
21	المواد الكيميائية	2-3
22	الايوساط الغذائية	3-3
23	العُدّ المستخدمة في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ	4-3
25	بادئات الدنا وتسلسل قواعدها النيروجينية وعددها المجهزة من جهة شركة Bioneer كوريا الجنوبية والمستخدمه في فحص qRT - PCR .	5-3
25	المواد الكيميائية المستخدمة مع الشركات المصنعة لها ومناشئها	6-3
40	(عُدّة الأنزيم المستخدمة للتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الاستخلاص .	7-3
40	عُدّة كما المستخدمة في عملية تصنيع الـ cDNA synthesis	8-3
41	الظروف الحرارية المثلى لمراحل تصنيع الـ cDNA حسب طريقة عمل العدة	9-3
41	مكونات مزيج تفاعل qRT - PCR للجين ALS_1	10-3
42	مكونات مزيج تفاعل qRT - PCR للجين ACT_1	11-3
43	الظروف الحرارية المثلى لمراحل qRT - PCR للجينات ALS_1 و ACT_1	12-3
44	الاختبارات التشخيصية لأنواع الكانديدا المعزولة	1-4
45	اختبار الكاربوهيدات ووسط Chrom لأنواع خميرة الكانديدا بواسطة العدة التشخيصية (ISYP)	2-4
48	أعداد عزل خميرة <i>Candida</i> ونسبها	3-4

55	اعداد العزلات المكونة للغشاء الحيوي لخميرة <i>C.albcians</i> بطريقة (CRA) ونسبها	4-4
57	معدلات الافطار التثبيطية (IZD) للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) ضد خميرة <i>C.albicans</i> بطريقة الانتشار بالحفر	5-4
60	التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خميرة <i>C.albicans</i>	6-4
63	نقاوة وتركيز الحامض النووي RNA لعزلات خميرة <i>C.albicans</i> باستخدام جهاز Nanodrop Spectrophotmeter وعلى طولين موجيين (280 -260) نانومتر .	7 - 4
64	التعبير الجيني للجين ALS1 باستخدام طريقة $2^{-\Delta\Delta ct}$ livak method) لخميرة <i>C.albicans</i>	8-4

قائمة بالأشكال

الصفحة	الموضوع	ت
8	التشكل في الخميرة <i>C.albicans</i>	1 - 2
11	مراحل تكوين الغشاء الحيوي لخميرة <i>C.albicans</i>	2 - 2
26	مخطط تصميم تجربة الدراسة	1- 3
50	مستعمرات خميرة <i>C.albicans</i>	1 - 4
51	مستعمرات انواع خميرة الكانديدا على وسط كروم اكار الكانديدا	2 - 4
52	الانبوب الجرثومي لخميرة <i>C.albicans</i> بقوة تكبير 40 X	3 - 4
52	الابواغ الكلاميدية وخلايا خميرة <i>C.albicans</i> مصبغة بصبغة كُرام وبقوة 10 x	4 - 4
53	الابواغ الكلاميدية لخميرة <i>C.albicans</i> مصبغة بصبغة لاكتوفينول ازرق القطن وبقوة 40 x	5 - 4
53	مستعمرات خميرة <i>C.albicans</i> على وسط أكار طحين الذرة	6 - 4
54	العدة التشخيصية لاستهلاك الكاربوهيدرات لخميرة <i>C.albicans</i>	7 - 4
56	الغشاء الحيوي لخميرة <i>C.albicans</i> على وسط أكار احمر الكونغو CRA	8 - 4
58	الاقطار التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خلايا خميرة <i>C.albicans</i>	9 - 4
65	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي للجين ALS_1 في معاملات التجربة ومجموع السيطرة	1 - 4
71	A تكوين الغشاء الحيوي في اطباق بتري قطر 6 سم، B الغشاء الحيوي مصبغ بصبغة البنفسج البلوري Crystal violet	10 - 4
72	الغشاء الحيوي مصبغة بصبغة البنفسج البلوري بقوة تكبير 40 X	11 - 4

قائمة بالمختصرات

المصطلح Term	المختصر Symbol
Agglutinin – like sequence	ECM
B-Actin I	ACT 1
Cek 1 Mitogen – activated protein Kinase	MAPK
Congo Red Agar	CRA
Confocal laser scanning microscopy	CLSM
Cyclic AMP – Protein Kinase A	CAM- PKA
Cycler Threshold	CT
Extracellular Polymeric Matrix	EPM
5 – Flurocytosine	5 - FC
5 – Fluroruacile	5 - FU
5 – Flurouridine monophaspat	FUMP
Glycosl – Phosphatidyl – Inositol – Cell Wall Proteins	(GPI -CWPs)
Hyphal wall Protein	HWP
Inhibition Zone Diameter	IZD
Lipase	Lip
Minimum inhibitory Concentration	MIC
Microtiter Plate Method	MTP
Tube Method	TM
Oropharyngeal Candidiasis (OPC)	OPC
Phospholipases	PSB
Protein with Internal Repeats	PIR
Punica granatum Peels	PGP
Quorum – Sensing	QS
Secreted Aspartyl Proteinases	SAPs
Target of Rapamycin	TOR

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

المقدمة

Introduction

تعد خميرة *C.albicans* من الكائنات الدقيقة التي تتواجد بصورة طبيعية على الجلد و الاغشية المخاطية في الافراد الاصحاء (Francoiset *al.*,2013).وعلى الرغم من ذلك فان لهذه الفطريات الانتهازية Opportunistic fungi القدرة على ان تسبب ما يعرف بداء المبيضات (Candidiasis) لما يقرب 30-50 % من الاشخاص الاصحاء بالعالم (Coretaset *al.*,2011;Zuluagaet *al.*,2010) و بالامكان أن يتطور داء المبيضات من اصابة سطحية (Superficial infection) في الاصحاء الى اصابة تهدد حياة الافراد كما في الاشخاص ضعيفي المناعة (immunocompromised). (Francoiset *al.*,2013). و مما أسهم في امراضية خميرة *C.albicans* هو امتلاكها لمختلف عوامل الضراوة Virulence factors المتمثلة في قدرتها على الالتصاق Adhesion باسطح المضيف وانسجته (Konopkaiket *al.*,2010 ; Punithavathyet *al.*,2012)، وتكوينها للهايفات Hyphae formation واختراق سطح الخلية Penetration وتكوين الاغشية الحيوية Biofilm formation والتبديل المظهري Phenotypic – switching فضلا عن افرازها للانزيمات المحللة مائيا (Nichollas et Hadrolytic enzymes *al.*,2011)

بين Taff *et al.*(2013) بأن الغشاء الحيوي Biofilm من عوامل الضراوة الرئيسية في خميرة *C.albicans* الذي يعد سببا لمقاومة الخميرة للمضادات الفطرية. وهو عبارة عن تجمعات من الخلايا و الخيوط (Hyphae and Pseudohyphae) الذي يكون مغلفا بمادة خارج خلوية Extra Cellular Matrix (ECM) تفرزها خلايا خميرة *C.albicans* . (Blankenship et *al.*,2006)

وعملية تكوين الغشاء الحيوي على اسطح المضيف تتوسطها عملية تشفير للجزيئات الكبيرة لبروتينات الجدار الخلوي (GPI – CWPs) - Cell wall - Proteins - Inositol - Phosphatidyl - Glycosyl , بواسطة جينات خاصة بخميرة *C.albicans* مثل عائلة الجين (ALS – Agglutinin – like sequence) family (gene) التي لها دور مهم في عملية الالتصاق (Hoyer et *al.*,2008 ; 2007 ; Yeater , *et al.*,2007 ; Nobile et *al.*,2006).

و تتضمن عائلة الجين (ALS) ثمانية اعضاء او جينات ($ALS_1 \rightarrow ALS_7$ and ALS_9) (Zhao et al.,2007) . و يظهر الجين (ALS_1) تعبيراً عالياً overexpression في تكوين الغشاء الحيوي داخل جسم الكائن الحي in vivo (Nailis et al.,2010 ; Li et al.,2007), و خارج جسم الكائن الحي in vitro (Riciova et al.,2010 ; Nett et al.,2009).

استخدمت في الآونة الاخيرة المنتجات الطبيعية بوصفها مصادر للمضادات الحيوية لامتلاكها فعالية حيوية لمختلف انواع الاحياء الدقيقة و يعزى ذلك لكون هذه النباتات غنية بانواع المركبات الثانوية (التانينات Tannins ، التيربينات Terpenoids ، الفلافونويدات Flavonoids ، القلويدات Alkaloids وغيرها) التي تتميز بخصائصها المضادة للميكروبات.(sher,2009).وسلّطت بعض الدراسات الضوء على نبات الرمان (*Punica granatum L.*) لامتلاكه هذه الخصائص. (Sadeghin et al.,2011).

يعد الرمان (*Punica granatum L.*) من النباتات الطبية القديمة التي استخدمت بشكل واسع في الطب الشعبي و كان يعرف قديماً بالفاكهة الصالحة للاكل (Edible fruits) ، إذ استخدم في امريكا و اسيا و افريقيا و اوروبا لمعالجة مختلف الامراض.(Olapour, et al.,2010) . لما يمتلكه من فعالية عقاقيرية متنوعة. (Jurenka.2008).واشار(Anibale et al.,(2012) الى فعالية الرمان بوصفه مضاداً للفطريات Antifungal في دراسته على الفطر *Candida albicans*.

وهناك العديد من الطرق التي يتم الكشف بواسطتها عن الغشاء الحيوي (Biofilm) منها طريقة Microtiter plate (MTP) (Rukayadi and Hwang,2006 ; Mathur et al.,2006) . وطريقة انبوب الاختبار (TM) Tube method (Millsap et al.,2001). وطريقة وسط احمر الكونغو Congo red Agar method (CRA) (Hassan et al.,2011) . وطريقة مجهر الليزر الماسح البؤري Confocal laser scanning microscopy (CLSM) (Xavier et al.,2003) وغيرها. وقد استخدمت تقنية qRT – PCR للكشف عن التعبير الجيني للجين ALS الذي يدخل في تكوين الغشاء الحيوي في خميرة *C.albicans* للعينات المعزولة من منطقة الفم (Green et al.,2006 ; 2004) .

في الدراسة الحالية استخدم المستخلص الكحولي Ethanolic Extract لقشور الرمان *P.granatum* (PGP) بهدف تقدير فعاليته على الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* من خلال التعبير الجيني gene expression للجين (ALS_1) و يمكن تحقيق ذلك من خلال المحاور الآتية :

- 1- عزل خميرة *C.albicans* وتشخيصها من منطقة الفم و ماحول الاسنان من الاشخاص المصابين.
- 2- الكشف عن قدرة الخميرة *C.albicans* على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة احمر الكونغو (CRA).
- 3- تقدير حساسية خلايا الخميرة للمستخلص الكحولي لقشور الرمان و ذلك بعد استخلاصه و عمل تراكيز مختلفة منه
- 4- تنمية الغشاء الحيوي للخميرة في اطباق بتري (Petri dishes) و معاملته بالتراكيز المختلفة للمستخلص الكحولي.
- 5- تقدير فعالية المستخلص على الغشاء الحيوي من خلال التعبير الجيني للجين $ALS1$ بواسطة تقنية . Quantitative Real – Time Polymerase chain Reaction (qRT-PCR).

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literaturel review

1 - خميرة *Candida albicans*

أطلق Charles Philipe Robin في عام 1853 تسمية *Oidium albicans* على خميرة *Candida albicans* مستخدمًا مصطلحات *albicans* إشارة إلى الابيضاض (Whiten) أحد اعراض مرض السلاق (Thrush) الذي تسببه هذه الفطريات . وعرفت بأسم *Monilia albicans* في العام 1890 من لدن Zopf . أما Brownlie في العام 1920 فقد أطلق عليها تسمية *Blastomyces albicans* ثم استقرت تسميتها لتصبح *Candida albicans* في عام 1923 من لدن Berkhout . واكتشفت قدرة خميرة *C.albicans* على التحول الشكلي Switching morphology على يد Slutsky وجماعته (1985) . (Refai , et al . 2015) .

وعلى الرغم من وجود العديد من أنواع الكانديدا *Candida spp.* ولكن تعد خميرة *C.albicans* الأكثر شيوعًا حيث تصل إلى أكثر من 80% من أنواع الخميرة الموجودة في الفم (Scully, et al. 1994) ، وهي داخلية النشوء Endogenous إذ أنها تمثل جزءا من الفلورا الطبيعية في الإنسان التي يمكن عزلها من (30 - 50 %) من الافراد الاصحاء ، وتتواجد خميرة *C.albicans* في الغشاء المخاطي أو الطلائي للإنسان (الفم , و القناة المعوية و الجهاز التناسلي الانثوي) وتعد أكثر مواطن الإصابة بهذه الخميرة ، وعلى الرغم من كونها جزءًا من الفلورا الطبيعية التي توجد بصورة متعايشة Commensalism الا أنها ذات أهمية طبية لكونها تمثل واحدة من الممرضات الانتهازية Opportunistic Pathogens كما هو الحال في مرضى الايدز (AIDS) حيث يلاحظ اصابتهم بداء المبيضات Candidiasis في منطقة البلعوم والمريء , وتوجد خمسة انواع من خميرة الكانديدا التي تتميز بأهمية طبية *C.albicans* , *C.krusei* , *C.parvasilosis* , *C.tropicalis* (Reiss, et *C.glbarta*) ولكن تبقى *C.albicans* هي الأكثر أهمية . (al., 2012) .

تبدو خميرة *C.albicans* عند فحصها بالمجهر بشكل خلايا بيضوية أو دائرية كبيرة ومتبرعمة Blastoconidium ، وفي ظروف خاصة يمكن أن تظهر الخميرة بشكل خيوط فطرية حقيقية أو خيوط فطرية كاذبة وكذا يمكن أن ترى في احيان أخرى بشكل ابواغ كلاميديية Chlamydospores عند زرعها على وسط اكار طحين الذرة Cornmeal

agar ومظهر تعدد الاشكال Polymorphism هو ما يميز هذه الخميرة .
(Zhou,etal.2015; Reiss,et,al.2012) .

1-1 : تصنيفها Classification

صنفت خميرة *C.albicans* في البداية ضمن عائلة Deutromy cetaceae
اشارة إلى فقدانها التكاثر الجنسي ، بيد أنه اتضح فيما بعد أن العديد من أنواع الـ Candida
الممرضة وغير الممرضة تمتلك مرحلة جنسية . (Calderone et al . 2002)
ويمكن تصنيف الكانديدا كما يأتي :-

Kingdom : Fungi

Division : Ascomycota

Class : Saccharomycetes

Order : Saccharamycetales

Family : Saccharomycetaceae

Genus : *Candida*

Species: *albicans* (Taylor , 2006)

2-1 : امراضية خميرة *C.albicans* Pathogenecity of

يمكن لخميرة الكانديدا الاستجابة سريعاً للتغيرات الحاصلة في البيئة المتواجدة فيها
وهذه الخاصية تمكن الخميرة من الاستفادة من الضعف المناعي للمضيف وسهولة احداث
الإصابة بداء المبيضات Candidiasis الذي يمكن أن يتطور من إصابة سطحية إلى إصابة
تهدد حياة الإنسان وخاصة لدى المصابين بمرضى السرطان ومرضى نقص المناعة المكتسبة (AIDS)
(Francois, etal.2013 ; Larriha,et .al.2000) ،وتصيب الكانديدا
الاعشوية الطلائية بالتجويف الفمي ويطلق عليها تسمية (Oropharyngeal Candidiasis)

(OPC) الذي يكون بشكل بقعة بيضاء مثل اللبن الرائب على اللسان والاعشية المخاطية الاخرى وتولد شعور بالحرقه والالم وإذا لم تعالج يمكن أن تكون مندمجة مع السطح وتنزف عند ازالتها ويعرف (OPC) ايضاً بمرض السلاق Thrush . (Reiss et al.,2012) .

1-2-1 : أنواع (OPC) Oropharyngeal Candidiasis

A - Pseudomembranous candidiasis : وهو داء المبيضات الكاذب ويعرف ايضاً بالسلاق الفموي أو القلاع Oral Thrush وقد حدث في حديثي الولادة والمسنين بما يقرب 5-10% ويتميز بوجود طبقة بيضاء White plaques يمكن التخلص منها بسهولة بواسطة قشط المنطقة المصابة ، الفحص النسيجي للطبقات أو الألواح البيضاء تكشف عن وجود العناصر الفطرية بأشكال الخيوط الفطرية والخمائر معاً مع الخلايا الطلائية . (Williams,2011;Samaranayake,1991;Samaranayake et al.1986).

B- داء المبيضات الحمامي Erythematous : يكون بشكل شقوق حمراء أو جروح مسطحة اسفل اللسان أو على مناطق التدوق، وتسبب للمصاب حرقه عند اكل الطعام المالح أو الحامض.

C- Denture Stomatitis : وهو التهاب لثة الإنسان وتكون حمراء في منطقة طقم الاسنان ويكون التهاباً مزمناً بدون التصاق اغشية بيضاء .

D- التهاب اللسان المعيني المتوسط Median rhomboid glossitis : ويكون الغشاء المخاطي احمر اللون وسط اللسان .

E- التهاب زوايا الشفتين Angular cheilitis : وهو جروح حمراء اللون بشكل حبة Sore .

F- Hyperplastic : وهي طبقات بيضاء سميكة لا تزال بسهولة .

1_3: عوامل الضراوة لخميرة *C.albicans* Virulence factors

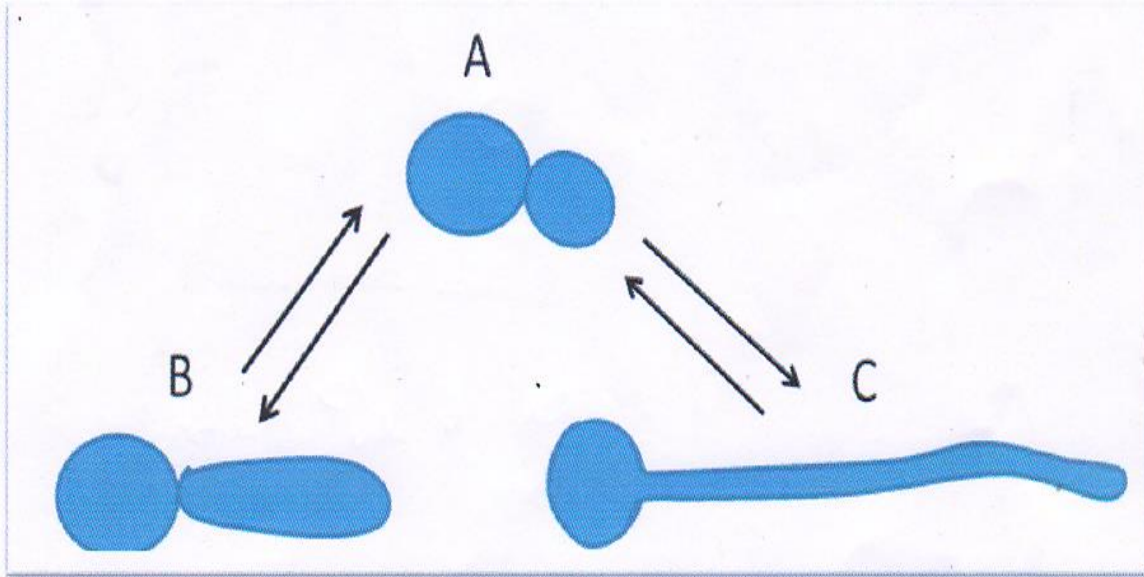
إن قابلية الخميرة *C.albicans* لإصابة المضيف تتحدد بفعل العديد من عوامل الضراوة التي تشمل التشكل Morphogenesis وتكوين الهيافات Hyphae Formation، واختراق سطح الخلية Penteration ، والالتصاق Adhesion وتكوين الاغشية الحيوية Biofilm Formation بالإضافة إلى افراز الانزيمات المحللة مائياً Hydrolytic enzymes (Nicholls , et al., 2011) .

يعرف التشكل في خميرة *C.albicans* بأنه الانتقال من شكل خميرة وحيدة الخلية إلى الشكل الخيطي (Hyphae and Pseudohyphae) . (Khan , et al. 2010) . والنمو بأشكال مختلفة يعد من المظاهر الحياتية المدهشة لهذه الخميرة . (Gow,etal.2002) ويمكن لخميرة *C.albicans* التحول من شكل الخلية إلى شكل الهيافا الحقيقية True hyphae التي تتميز بامتلاكها جدارين متوازيين ولا يوجد تخرصات واضحة في مواقع الحواجز وكذا تتميز بأن قطرها (2mm) وهو اضيق من قطر الهيافات الكاذبة , أما الاخيرة فتتكون نتيجة تكون براعم بنوية من خلية الخميرة الام (daughter buds) تأخذ بالتطاول Elongation وبعد تكوين الحاجز تبقى هذه الخلايا البنوية بتماس مع الخلية الام لا تنفصل عنها (Sudbery,et al.2004) ويعد الانبوب الجرثومي germ tube المتكون من جدار خلية الخميرة بداية لنمو الهيافات Hyphal growth . (Yang,et al.2003) .

ومن الاشكال الاخرى التي يمكن لخميرة *C.albicans* تكوينها هي الابواغ الكلاميدية Chlamydo spores وهي ابواغ لاجنسية خلاياها كروية، سميكة الجدران وتتكون في نهايات الهيافات الكاذبة . (Sudbery , etal.2004 ; Montazeri ,et al.1984)

للتشكل Morphogenesis علاقة وثيقة بامراضية *C.albicans* فلأنبوب الانبات أهمية في التصاق الخميرة بالاسطح الطلائية للمضيف , وللهايفا أثر في تحطيم أنسجة المضيف وغزوها في حين يسمح شكل الخلية الوحيدة unicellular form للخميرة بالانتشار خلال مجرى الدم وتحدث الإصابة في أماكن بعيدة من الجسم . (Sobel ,et .al.1984 ; Gaw . (Sund strom 2006 ; 2002 , وتكمن أهمية التحول الشكلي في حماية خميرة *C.albicans* من الاليات الدفاعية للمضيف . (Lo ,et al., 1997) , التي تمثل بصورة رئيسية عملية البلعمة Phagocytosis لخلايا الفطريات بواسطة الخلايا الموجودة في الجهاز المناعي الذاتي (macrophages) . (Brown ,etal.,2001) ، هنالك عدة

عوامل تساهم في التغير الشكلي للكانديدا مثل (التغير في الاس الهيدروجيني PH ، و التغير في درجات الحرارة ، ومستويات ثنائي اوكسيد الكربون ، ونقص المواد الغذائية) (Nadeem , et ,al. 2013) .



صورة رقم (1) التثكل في خميرة *C. albicans* , A- خلايا خميرة متبرعمة . B- الخيوط الفطرية الكاذبة . C- الخيوط الفطرية الحقيقية

للأنزيمات المحللة مائياً Hydrolytic enzymes أثرٌ في امراضية خميرة

C. albicans تعد انزيمات (SAPs) Secreted Aspartyl Proteinases و Phospholipases و Lipases من عوامل الضراوة المهمة التي لها اثر كبير في التصاق خميرة *C. albicans* بأسطح المضيف واحداث الإصابة . (Schaller , et al. 2005) وتتحكم في افراز هذه الانزيمات جينات متخصصة، إذ تقوم انزيمات (SAPs) بهضم الجزئيات لغرض تغذية الخميرة وهضم جدران الخلايا لتسهيل عملية الالتصاق . في حين تقوم انزيمات Phospholipases بتحليل خلايا المضيف من خلال تحطيم الاواصر الاسترية glycerophospholipids مما يسهل من عملية غزو الانسجة من قبل الخميرة (Bhat et al. 2011) , أما انزيمات Lipases فلها علاقة بتحطيم الاواصر الاسترية للدهون منتجة احماضاً دهنية حرة Menoacyl glycerol بالإضافة إلى الكيسيرول glycerol وتشكل هذه الانزيمات اثراً مهماً في تموضع الإصابة , (Paraje , et al. 2009 ; Jatta , et al. 2009) .

4-1 : الغشاء الحيوي لخميرة *C. albicans*

يعرف الغشاء الحيوي بأنه شكل ثلاثي الأبعاد يتكون من مجاميع من خلايا خميرة *C.albicans* والهايفات الكاذبة والهايفات الحقيقية وجميعها تكون مطمورة في مادة خارج خلوية Extracellular Polymeric Matrix (EPM) مكونة ثقوب وقنوات معطية مظهرًا مختلفًا عن مظهر خلايا الخميرة Planktonic cells وتتكون (EPM) من سكريات متعددة Polysaccharides وبروتينات Proteins و DNA وغيرها من المكونات اللازمة لحصول الالتصاق. (Seneviratne,etal.2008)، ويتحكم في تكوين الغشاء الحيوي العديد من الجينات من بين هذه الجينات عائلة (ALS) gene (إذ تقوم بتشفير بروتينات الجدار الخلوي (GPI) التي تترأس تفرعات glycoproteins التي تتوسط مرحلة التصاق الخميرة بأسطح المضيف (Hoyer, 2008b , 2001a)، ويمكن أن يتكون الغشاء الحيوي على الأسطح الحية Biotic مثل الخلايا الطلائية للمضيف وعلى الأسطح غير الحية (Abiotic) مثل طقم الأسنان والأدوات الطبية. (Lynch , et .al . 2008)

5-1 : تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

تتضمن عملية تكوين الغشاء الحيوي مراحل عدة:

1- **مرحلة الالتصاق Adhesion stage**: وفيها تلتصق خلايا خميرة *C.albicans* لأسطح المضيف (Epithelial and Endothelial) وتتخلل هذه المرحلة تفاعلات مشتركة بين ميكانيكيات التصاق غير متخصصة Non adherence mechanisms (hydrophobic attraction and electro static – forces) ، وأخرى متخصصة Specific (مستلمات الخلايا التي تميز بروتينات اللعاب). والمفتاح الأول للقوى غير المتخصصة في عملية الالتصاق هي قوة تجاذب كارهة Hydrophobic attraction في جزئيات سطح الكانديدا إلى مواقع الاتصال الهدف في المضيف ومع وجود قوى كهربائية مستقرة electrostatic forces فإن شبكة تجاذب سوف تتولد ومن ثم تتكون مسافة قريبة بين الخميرة وسطح المضيف ، وبذلك يعد مدخلاً لحدوث آليات الالتصاق المتخصصة Specific بين مستلمات المضيف وجزئيات الالتصاق في الخميرة . (Costerton,1987)

2- مرحلة تكوين المستعمرات والانتشار والغزو Colonization, Proliferation and invasion

تتكاثر خلايا الخميرة بتكوين مستعمرات صغيرة Colonization التي تنتشر وتنمو إلى الهيافات بنوعيتها ومن ثم تضمن التصاقها بقوة لأسطح الاغشية الطلائية للمضيف وهنا تكمن أهمية الخيوط في عملية احداث الغزو والاصابة . (Bartie,etal. 2004; Malic,etal.2007) ،الخيوط الفطرية والخلايا تكون الطبقة القاعدية للغشاء الحيوي (Bartie,etal. 2004) وللأنزيمات المحللة التي تفرزها خلايا الخميرة اثراً في الالتصاق والغزو واحداث الإصابة .

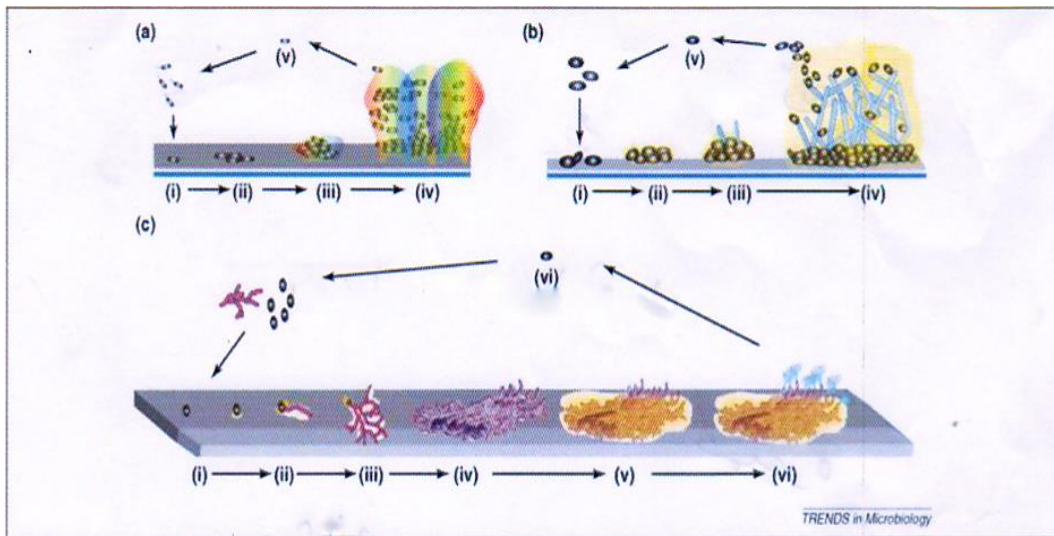
3- مرحلة الغشاء الحيوي الناضج The mature biofilm stage

يتكون الغشاء الحيوي الناضج بعد 48 ساعة حيث يكون ببنية ثلاثية الابعاد متكوناً من الهيافات بنوعيتها والخلايا ومغلفا بالمادة الخارج خلوية (EPM) , بالإضافة إلى احتوائه على الكربوهيدرات والبروتينات و Hexoamines وفسفور ويورونيك اسيد uronic acid . (Williams ,etal.2011) ، ففي هذه المرحلة تتجمع خلايا الغشاء الحيوي لتكون مستعمرات بعملية تدعى (Quorum -Sensing (QS التي تعني تجميع خلية مع خلية اخرى , والكائنات الدقيقة تستخدم هذه الميكانيكية (QS) لتنظيم تعبير جيناتها استجابة لتقلبات الكثافة السكانية للخلايا (Shrama and Albuquerqueand Casadevall , 2012 ; Prasad , 2011)

وتدخل في تنظيم تعبير جينات عديدة لا في معدل النمو فحسب وإنما في الانفصال عن الغشاء الحيوي ويوجد نوعان من الجزئيات التي تنظيم (QS) في خميرة *C.albicans* وهما Farnesol و Tyrosol . (Romage ,etal.,2005) ، Farnesol جزيئة هايدروكربونية عضوية صغيرة وتوجد ايضا في النباتات ،أما Tyrosol فيشتق من الحامض الاميني الاروماتي تايروسين وهذه الجزئيات تؤثر في التحول الشكلي لخميرة *C.albicans* بين شكل الخلايا والخيوط الفطرية استجابة للظروف البيئية المحيطة (Alem,et al.2006) ،تعمل جزيئة Farnesol بوصفها مثبطا لنمو الهيافات في خميرة *C.albicans* . (Shchepin , 2003) ،أما جزئيات Tyrosol فتساهم في تسريع تكوين خيوط خميرة *C.albicans* . (Chen , 2004) .

4-مرحلة انفصال الخلايا Detachment of cells

في هذه المرحلة تبدأ الخلايا بالانفصال عن الاغشية الحيوية وتنتقل الى مكان اخر لتبدأ بتكوين اغشية حيوية جديدة ،ويحدث الانفصال نتيجة تأثير عوامل عدة منها نقص المغذيات ومن ثم نقص المواد متعددة السكريات وكذلك انسياب السوائل المختلفة فوق الغشاء الحيوي تؤدي الى انفصال الخلايا الى اماكن بعيدة لتحدث الاصابة.



صورة رقم (2) عملية تكوين الغشاء الحيوي (Stoodley, et al. 2002)

Biofilm formation (i) adsorption, (ii) active attachment , (iii) microcolony I (germling and/or monolayer), (iv) microcolony II (mycelial development , hyphal layering , hyphal bundling), (v) development of the mature biofilm , and (vi) dispersal or planktonic phase .

6-1: مقاومة الغشاء الحيوي للمضادات الفطرية

الغشاء الحيوي من عوامل الضراوة المهمة في امراضية خميرة *C.albicans* حيث يعد خازناً للإصابة ومن الصعب التخلص منه بسبب مقاومته العالية للمضادات الفطرية . (Odds, et al. 2007; Jain, et al. 1998) ، وقد عرفت عدة آليات لهذه المقاومة منها :-

- 1- قلة كميات المضادات الفطرية التي تخترق الغشاء الحيوي لتصل إلى خلايا الخميرة .
- 2- تقليل فعالية المضادات الفطرية من خلال ارتباط Extracellular Polymeric Matrix (EPM) مع المضادات الفطرية ايونياً .
- 3- تنشيط فعالية الخلايا الموجودة في منطقة الإصابة من خلال قلة الاوكسجين والمواد الغذائية المارة خلال طبقات (EPM) مما يجعلها أقل تأثراً للمضادات الحيوية .
- 4- التنظيم الجيني لخلايا الغشاء الحيوي مثل الجينات التي لها علاقة بمقاومة المضادات الفطرية كالجينات المشفرة لحاملات البروتين (ABC) ATP- binding Casetle التي لها علاقة بمقاومة المضادات الفطرية Azoles . (Mah, et al .2001)

7-1 ما هي الفائدة من الغشاء الحيوي ؟

لا تقتصر فائدة الغشاء الحيوي على حماية خلايا خميرة *C.albicans* من الميكانيكية التدفقية للعاب , بل يكون حاجزاً دفاعياً لا يمكن اختراقه من مكونات الجهاز المناعي للمضيف . (Hawser , et .al .1995) ، بل يزيد من قدرة الكائنات المجهرية على تحمل المضادات الحيوية وضغوط البيئة (التغير في الاس الهيدروجيني PH ودرجة الحرارة و CO₂ و O₂ والتجمد والاشعة فوق البنفسجية) ، كما تظهر فعالية (EPM) في التقليل من عملية التحلل المائي للغشاء الحيوي ومكوناته من خلال ارتباطها مع الماء ، بالإضافة إلى التغير في كمية المواد الغذائية والعمليات الأيضية عند التصاق المايكروبات إلى أسطح المضيف . (Annous ,et al. 2009 ; Donlan ,2002 ; Costerton ,et al.1999)

وكذا إن الجهاز المناعي للمضيف غير قادر على تدمير الغشاء الحيوي الناضج وذلك لارتباط (B-glucans) في الجدار الخلوي للخميرة بخلايا الجهاز المناعي مما يسبب في إيقاف فعاليتها وإيقاف الاستجابة المناعية . (Xie,et al .2011).

8-1 : الجدار الخلوي لخميرة *C.albicans*

يقع الجدار الخلوي إلى الخارج من الغشاء البلازمي ويتكون من طبقتين :

الطبقة الخارجية Outer layer : التي تكون غنية ببروتينات Mannoproteins والتي تبدو بشكل شبكة كثيفة من اللييفات تسمى Fimbriae (زوائد خيطية طويلة من سطح الخلية التي يمكن أن تتوسط عملية الالتصاق بخلايا المضيف) ، أما الطبقة الداخلية inner layer فتكون حاوية على الكايتين Chitin وبوليمرات الكلايكان glycan polymers . (Tokunaga ,et al. 1986 ; Yu ,et al. 1994) ، وتظهر هذه البوليمرات بشكل تفرعات متمثلة بالتفرع (β -1,3 glucan) والتفرع (β -1,6 glucan) (Kandasamy , et al.,2000 ; Kapteyn , et al .,2000) وتتضمن بروتينات الجدار الخلوي ثلاثة اصناف ترتبط مع تفرعات glucan بواسطة اواصر تساهمية : الصنف الاول يمثل بروتينات Glycophosphatidy Inositol (GPI - CWPs) (مثل بروتينات الالتصاق AIS_{1p} , AIS_{3p})، وترتبط هذه البروتينات بالتفرع β -1,6 glucan) ، في الطبقة الخارجية في الجدار الخلوي ، اما الصنف الثاني فيتضمن البروتينات التي يشفرها جين (PTR) Protein with Internal Repeats ، وتتوزع بشكل متجانس في جميع انحاء الطبقة الداخلية للجدار الخلوي وترتبط مع التفرع β -1,3 glucan ، أما الصنف الثالث فيتضمن بروتينات يتم افرازها إلى المسافة خارج الخلية Extra cellular space(ECS) ، ويتم تشفير جزيئات البروتينات الكبيرة (GPI - CWPs) بواسطة بروتينات عائلة الجين (ALS) المتواجدة في الجدار الخلوي إذ أن لها دورا مهما عملية التصاق الخميرة *C.albicans* إلى أسطح المضيف (Chaffin, et al.,2008)

9-1 جينوم خميرة *C.albicans*

جينوم خميرة *C.albicans* ثنائي الكروموسوم (Diploid) , ويمتلك ثمانية مجاميع من ازواج الكروموسومات وإن الجينوم المفرد MP 16 هو أكبر من جينوم خميرة *Saccharomyces Cervisiae* بحوالي 30% ، وإن قاعدة البيانات لهذا الجينوم محفوظة في الموقع ([http:// WWW.Candidagenome.org/](http://WWW.Candidagenome.org/)) ، وتوجد العديد من الجينات التي تسهم في عملية التصاق خميرة *C.albicans* بالأسطح الغشائية للمضيف ومنها الجين (*ALS*) من ثماني جينات ($ALS_1 \longrightarrow ALS_7 \text{ and } ALS_9$) (Chaffin ,etal., 2008) ، حيث تقوم هذه الجينات بتشفير بروتينات الجدار الخلوي (Hoyer ,etal. 2001).(GPI)

بين (Hoyer , 1995) أن جين *ALS* وصف أولاً في خميرة *C.albicans* وأشار Fu,etal.(2002) إلى إن الجين ALS_1 له دور في تشفير بروتينات جدار الخلية التي لها علاقة بعملية الالتصاق ، حيث بين (Hoyer,et.al.(2003a,2001b) ، أن جين ALS_1 يتكون من ثلاث مناطق : المنطقة الاولى هي منطقة N الطرفية (N-terminal) الحاوية على إشارة الببتيد المفترض ، أما المنطقة الثانية فهي المنطقة المركزية التي تحتوي على سلسلة من التعاقبات (Tandem repeats) (طولها 36 حامض أميني) حاوية على موقع واحد من N-glycosylation وبعض من O- glycosylation اما المنطقة الثالثة فهي غنية بالحامض الاميني السيرين والثريونين Serine – theroine وتعرف بمنطقة C الطرفية (C-terminal) وتحتوي هذه المنطقة على تتابعات بروتينات الجدار الخلوي (GPI) .

البروتينات التي تشفر بواسطة عائلة الجين *ALS* يعير عنها خلال الإصابة (Hoyer , 1999) ، وبين Lipke et al.(1995) بأن منطقة N- terminal حاوية على اشارة التعاقب الببتيدي الذي هو من المحتمل يحفز تكوين البروتين الذي يُفرز إلى سطح الخلية , أما Hoyer (2001) فقد بين أن أعداد التعاقبات (Tandem repeats) للمنطقة الوسطية للجين ALS_1 تتنوع فيما بين السلالات المختلفة لخميرة *C.albicans* وفي بعض الاحيان بين الاليلات المختلفة لنفس السلالة .

اشار (2002 ; 1998) Fu ,et .al إلى إن الجين ALS_1 ينتج ALS_{1p} وهو بروتين السطح الخلوي الذي يتوسط عملية الالتصاق للأغشية (Endothelial , Epithelial) ، وظهرت نتائج Loza وجماعته (2004) أن مناطق ارتباط بروتين ALS_1 تتموضع في منطقة (N- terminus) وأن منطقة التعاقبات المتكررة (Tandem repeats) من المحتمل أن تلعب دورًا في استقرارية الارتباط . و أن تتابعات (C-terminus) ضرورية لتموضع بروتين ALS_{1p} إلى سطح الخلية .

بين Tronchin وجماعته (2008) أن بروتينات الجدار الخلوي لخميرة *C.albicans* المتمثلة في (GPI – CWP₃) مثل بروتينات الالتصاق ALS_{1p} ، ALS_{3p} ، الواقعة في الطبقة الخارجية للجدار الخلوي ترتبط مع مكونات الجدار الخلوي الأخرى (Chitin , Mannoproteins) وبصورة رئيسية بتفرعات β -glucans ، وكذلك بروتينات الطبقة الداخلية للجدار الخلوي التي تشفر بواسطة الجين PIR التي ترتبط مع التفرع β -1,3 glucans . هذه البروتينات تكون موجودة في N- terminal الحاوية على الإشارة الببتيدية ، ومنطقة المكررات المتعاقبة Tandem repeats وتحفظ بصورة عالية في منطقة C الطرفية (C- terminus) (حيث ترتبط مجاميع الهيدروكسيل في بقايا السيرين والثريونين مع بروتينات Mannoproteins) .

2- المضادات الفطرية وفعاليتها Antifungales agents and their activities

يمكن تصنيف المضادات الفطرية حسب تأثيرها على خميرة *C.albicans* إلى :

A- البولينات Polynes

وتشمل البولينات المضاد الفطري Amphotericin، Nystatine و تتداخل البولينات مع Ergosterol الجدار الخلوي مما تؤدي إلى تكوين ثقب في الجدار الخلوي تؤدي إلى تغير في نفاذية الغشاء الخلوي مسببةً بذلك تسرب في الايونات وبالنتيجة موت الخلية . (Ghannoum and Rice , 1999) .

B - Azoles

مثل فلوكونازول Fluconazole و اترakonazol و Itraconazole و كيتاكونازول Ketaconazole ، وتسهم مركبات الازول في تنشيط تكوين Ergosterol للجدار الخلوي من خلال تفاعلها مع انزيم lanosterol demethylase المسؤول عن تكوين Ergosterol .

C - Pyrimidine analogues

مثل Flucytosin أو (5-F C) 5-Fluorocytosine وتظهر فاعليته في ارتباطه بالاحماض النووية DNA و RNA وأن (5-F C) عند دخوله الخلايا الفطرية بواسطة الانزيم Cytosine Permease يتحول إلى (5- F U) 5-fluorouracile بواسطة انزيم Cytosine – Deaminase يتحول بعدها إلى Fluorouridylic acid (FUMP) بواسطة انزيم Pyrophosphorylase وبعدها يتفسر الناتج ويرتبط مع RNA مؤدياً إلى تحطيم بناء البروتين .

(5 – F U) ايضاً يتحول إلى 5 – Flouroridine monophosphate الذي يتداخل مع بناء DNA . (Ghannoum and Rice , 1999) ، ويعد مثبّطاً مهماً لأنزيم thymidylate Synthase الضروري لتصنيع DNA وانقسام الخلية (Carrillo , 2006) .

D - Echinaocandins

ويشمل (Caspofungin و Micafungin) وهي منتجات شبه صناعية تشتق من نواتج التخمر للفطريات (Bellmann , 2007) وتكون ببتيديات دهنية حلّية Cyclic liropeptides لها دور في يثبط بناء β -glucan (Denning , 2003) من خلال

عملها كمثبطات لا تنافسية لأنزيمي β -1,6 glucan و β -1,3-الضروريين لتصنيع الكلوكان .

3- نبات الرمان *Punica granatum Linnaous*

استخدم الرمان *Punica granatum L.* الذي ينتمي إلى عائلة Punicaceae على مدى قرون لمعالجة مختلف الامراض في الهند واسيا حيث عُرف بفعاليتها الحيوية بوصفه مضاد اكسدة Antioxidant ، ومضاد للسرطان Anticarcinogenic ، ومضادا للالتهابات Antinflammation ، ومضاد للبكتريا Antibacterial ، ومضاد للفطريات Antifungal . (Seeram, et al.,2005 ; Das ,et al . ,1999) ، وذلك لأحتواء الرمان على العديد من المركبات الفعالة (التانينات Tannins ، الفينولات Phenols ، الفلويديات Alkaloids ، الفلافونوات Flavonoids ، gallic acids ، Ellagic acids) ، واطهرت هذه المركبات فاعليتها بوصفها مضادات للبكتريا ومضادات اكسدة . (Fetrow and Avira,2000 ; Gile ,et al . 2000; Abdel Mutal ,et al. 2011 ; Mansour et al. 2013) ، وكذا اظهرت المستخلصات المختلفة للأجزاء المختلفة لشجرة الرمان مثل القلف والاوراق وحبوب فاكهة الرمان بالإضافة الى قشور فاكهة الرمان كفاءة عالية في الاغراض العلاجية المختلفة ومنها دورها في تثبيط النمو للبكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لصبغة كرام. (Al-Zoreky , 2009 ; Rathinamaothy ,et al .,2011) ، بالإضافة إلى كفاءة تأثيرها المضاد لأنواع الكانديدا *Candida spp.* ولخميرة *Saccharomy* . (Duman , et al. 2009) .

وتمثل قشور الرمان (PGP) 50% من الوزن الكلي لفاكهة الرمان فقد استخدم هذا الجزء غير الصالح للأكل من فاكهة الرمان على نطاق واسع في الطب الشعبي Folk Medicine (Reddy , et al ., 2007) ، لاحتوائه على الكثير من المواد الفعالة التي لها دور مضاد للبكتريا وللفطريات . (Ahmed ,et al ., 2012) .

3-1 فعالية الرمان بوصفه مضادا للمايكروبات

عرف الرمان بفعالته العالية بوصفه مضادا للمايكروبات , فقد بين Burapadja, et al. (1995) امتلاك مركب قشور الرمان Punicalagin فعالية مضادة ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* ، وقد بين Perez, et al.,(1994) أن مستخلص قشور الرمان يمتلك فعالية عالية ضد العديد من بكتريا التيفوئيد المقاومة *Salmonella typhi* .

استخدم Voravuthikunchai et al.(2004) المستخلص الايثانولي ضد بكتريا *E. coli* , وتوصل Vasconcelos et al.(2006) إلى نتائج جيدة عند اختبار فعالية مستخلص الرمان للسيطرة على قابلية مختلف الجراثيم الموجودة في التجويف الفمي على الالتصاق , حيث بينوا فعالته العالية ضد التصاقية بكتريا *Streptococcus mutans* , *Streptococci strains* , و خميرة *C.albicans* .

واظهرت دراسات اخرى فعالية قشور الرمان ضد الفايروسات من خلال تثبيط عملية الاستنساخ وعزت ذلك التأثير إلى احتواء قشور الرمان على مركبات التانينات .

بين Hadari et al.(2009) أن مركبات Polyhenols في مستخلص الرمان يثبط فايروس الانفلونزا .

في دراسة اخرى لـ Dahhan et al.(2010) بينوا الفعالية المضادة للبكتريا التي يمتلكها مستخلص قشور الرمان والبذور والثمرة بأكملها , حيث بينوا فعالية الرمان ضد بكتريا *S.aureus* و ضد الفطر *Aspergillus niger* .

واشار كل من Karteek et al.(2012) ; Bhowmik et al.(2013) إلى فعالية الرمان التثبيطية ضد كل من بكتريا *S.aureus* , *P.aeruginosa* , *E.coli* , *Bacillus Subtilis* , *Proteus Vulagris* كما بين كل من Singla et al.(2013); Ahmed et al.(2013); التأثير التثبيطي للمستخلص المائي والكحولي لقشور الرمان ضد خلايا خميرة *C.albicans* .

من ناحية اخرى فقد بين Oliveira et al.(2013) أن المستخلص الكحولي للرمان له تأثير واضح على الغشاء الحيوي الذي يعد مهماً في امراضية خميرة *C.albicans* من

خلال دراسته التي تضمنت تأثير المستخلصات النباتية ومنها نبات الرمان *P.granatum* بوصفه مضاد فطري للغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* المتكون على طقم الاسنان ، كما اشار (Bakkiyaraj *etal.* (2013) إلى فعالية مستخلص الرمان بوصفه مضادا للغشاء الحيوي المتكون من قبل الجراثيم التي تصيب الانسان . (*S.aureus* , *E.coli* , *C.albicans*)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and

Methods

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل

1-3 المواد والاجهزة المستخدمة :

1-1-3 : الاجهزة والادوات المستخدمة والشركات المصنعة لها :

جدول (1-3) الاجهزة والادوات المختبرية.

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
Germany	Binder	Incubator	1 حاضنة
Germany	Binder	Sensitive Balance	2 ميزان حساس
Germany	GFL	Distiller	3 جهاز تقطير
Germany	Hitch	Centrifuge	4 جهاز طرد مركزي
Germany	Human	Micropipettes	5 ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
Korea	Jeio –Tech	Laminar flow cabinet	6 كابينة بايولوجية
Korea	Lambeth	Shaker incubator	7 حاضنة هزازة
Korea	LG	Refrigerator	8 ثلاجة
Italy	Rome	Vortex	9 مازج
China	YX – 280 B	Autoclave	10 مؤصدة
Germany	Witeg	Hot Plate	11 صفيحة ساخنة
England	Difco	Millipore Filters	12 مرشحات غشائية
Italy	Eriotti	Electric Oven	13 فرن كهربائي
Japan	Olympus	Microscope with Camera	14 مجهر تصوير
USA	Bio Rad	Miniopticon Real – Time PCR	15
Germany	Memmert	Water bath	16 حمام مائي
Canada	Bio basic	Eppendorf tubes	17 انبوبة اختبار
USA	BBL	Conical flasks	18 دورق مخروطي

Korea	Bioneer	Thermo cycler جهاز الدورات الحرارية appartues (PCR)	19
UK	Thermo scientific	Nano drop Spectro Photometer	20
Korea	Bioneer	Exispin Vortex Centrifuge	21
Germany	Eppendorf	High Speed Cold Centrifuge	22
Koria	Bilab	Soxhlet جهاز ساكسوليت	23
Japan	Yamato	Rotary Evaporator جهاز المبخر الدوار	24

2-1-3 : المواد الكيميائية المستخدمة

جدول (2 - 3) المواد الكيميائية

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم المادة	ت
India	Himedia	Nystatin المضاد الفطري	1
India	Himedia	Glucose كلوكوز	2
India	Himedia	Peptone ببتون	3
UK	BDH	Absolut Ethhanol (ايثانول مطلق) C ₂ H ₅ OH)	4
UK	BDH	Bacl ₂ كلوريد الباريوم	5
UK	BDH	H ₂ SO ₄ حامض الكبريتيك	6
UK	BDH	Normal Saline محلول فسيولوجي	7
UK	BDH	Urea يوريا	8
UK	BDH	Sucrose سكروز	9
USA	Difco	Agar – Agar آكار – آكار	10
India	Himedia	Yeast extract خلاصة الخميرة	11
UK	BDH	Glycerol كليسرول	12
Iraq	Blood bank	Human Serum مصل الإنسان	13

UK	BDH	Gram Stain	صبغة كرام	14
Germany	Fluka	Lactophenol blue Cotlon	صبغة ازرق القطن	15
Italy	Liofilchem	Integral system yeasts Plus	عدة التشخيص	16
BDH	UK	Methylene Blue	صبغة المثلين الازرق	17
USA	sigma	Congo red stain	صبغة احمر الكونغو	18

3-1-3: الاوساط الغذائية المستخدمة والغرض من استخدامها

جدول (3-3) الاوساط الغذائية

ت	الوسط	الشركة المصنعة	المنشأ	الغرض من استخدامها
1	سابرويد دكستروز آكار Sabrouid Dextose Agar (SDA)	Himedia	India	العزل والتنقية لخميرة Candida albicans
2	كروم آكار كانديدا Chromagenic Agar Candida (CAC)	Conda	England	التفريق والتشخيص بين انواع الكانديدا (Candida SPP.)
3	آكار القلب والدماغ Heart Brain infusion Agar (HBIA)	Himedia	India	حفظ وتنشيط الخلايا
4	نقيع القلب والدماغ Heart Brain infusion Broth (HBIB)	Himedia	India	الحفظ وتنشيط الخلايا لغرض استخدامها في الاختبارات

اختبار حساسية الخلايا للمضادات	India	Himedia	مولر هينتون آكار Muller – Hinton Agar (MH)	5
تنمية الابواغ الكلاميدية لخميرة <i>C.albicans</i>	India	Himedia	آكار طحين الذرة meal Agar	6
الكشف عن قدرة الخميرة على تكوين انزيم اليوريز	India	Himedia	آكار اليوريا Ureae Agar	7
لتنمية الغشاء الحيوي ولاستخدامه في تقدير فعالية المستخلص النباتي على الغشاء الحيوي لخميرة <i>C.albicans</i>	USA	Sigma	RPMI – 1640 Media With L-glutamin , MOPS Without Sodium bicarboniat	8
للكشف عن قدرة الخميرة على تكوين الغشاء الحيوي	حضر في المختبر		احمر الكنغو Congo red Agar	9
تنمية خلايا خميرة <i>C.albicans</i>	حضر في المختبر		Yeast Extract Peptone Dextrose Agar	10

Kits 4-1-3 العدد

الجدول (4-3) العدد المستخدمة في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ

ت	اسم العدة	مكوناته	الشركة وبلد المنشأ
1	AccuZol™ Total RNA Kit Extraction	Trizol Reagent 100ml	Bioneer (Korea)

Bioneer (Korea)	- Rocket Script Reverse (200 u)	Accu Power® Rockscript RT PreMix	2
	- 5x Reaction Buffer (1 x)		
	- DTT (0.25 mM)		
	- dNTP (250 µM each)		
	- RNase Inhibitor (1 u)		
Bioneer (Korea)	2x Greenster Master Mix	Accu Power® Master Greenstar qPCR Mix	3
	8 Well strips x 12 each		
	DEPC – D.W, 1.8 ml x 4 tubes		
Bio Basic (Candida)	DNase I enzyme	DNase I enzyme set kit	4
	10 x buffer		
	Free nuclease water		

5-1-3 : البادئات Primers

تم تصميم هذه البادئات في هذه الدراسة الخاصة بخميرة *C.albicans* وذلك باستخدام موقع NCBI GenBank Data وباستخدام برنامج تصميم البادئات Primer 3 Plus . وقد تم تجهيز هذه البادئات من لدن شركة Bioneer الكورية كما في الجدول (3 – 5) .

جدول (3 - 5) بادئات الدنا وتسلسل قواعد النيتروجينية وعددها المجهزة من لدن شركة Bioneer كوريا الجنوبية والمستخدم في فحص qRT – PCR .

اسم الباديء Primer	تسلسل القواعد النيتروجينية DNA Sequence (5 – 3)	حجم نواتج تضخيم qRT – PCR (Bb)
ALS ₁	F AGCGGTTCTCATGAATCAGC	133bp
	R CAGAAGAAACAGCAGGTGATGG	
ACT ₁	F TGTGTAAAGCCGGTTTTGCC	136bp
	R TTGGATTGGGCTTCATCACC	

F : الباديء الأمامي (Forward)

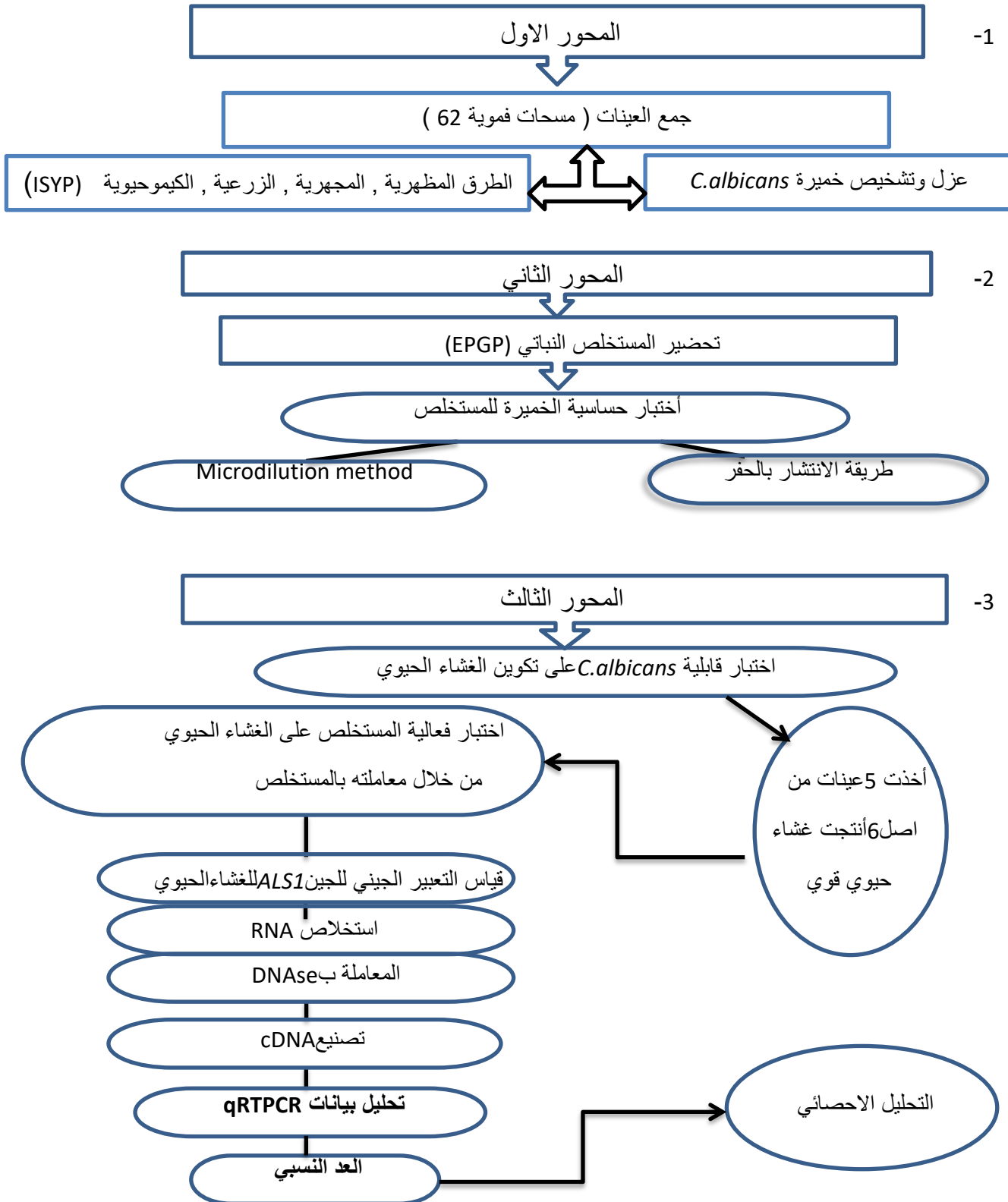
R : الباديء الخلفي (Reverse)

6-1-3 : المواد الكيميائية الخاصة بعمل RT –PCR

جدول (3 - 6) المواد الكيميائية المستخدمة مع الشركات المصنعة لها ومناشئها

ت	المواد الكيميائية	الشركة	المنشأ
1	ايتانول	BDH	England
2	ايزوبروبانول	BDH	England
3	DEPC – Water	Bioneer	Korea
4	Free nuclease water	Bioneer	Korea

7-1-3 : تصميم الدراسة study design



شكل (1 - 3) مخطط تصميم تجربة الدراسة

2-3: طرائق العمل Methods

1-2-3 : الاوساط الزراعية الجاهزة

حضرت الاوساط الزراعية طبقاً لتعليمات الشركات المصنعة لها وتم تعقيمها بالمؤصدة بدرجة 121 م وبضغط 15 باوند / انج² لمدة 15 دقيقة ما عدا وسط RPMI – 1640 .

2-2-3 : الاوساط الزراعية المحضرة في المختبر:

1-2-2-3 : وسط مولر هنتون (MH)

استخدم لغرض اختبار حساسية خميرة *C.albicans* للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) بطريقة الانتشار بالحفر Well diffusion method ويتم إضافة 2 % كلوكوز و 0.5 غم / لتر من صبغة ازرق الميثيلين methylene blue , (CLSI , M44- A , 2004) , إضافة الكلوكوز وصبغة ازرق الميثيلين لتحسين نمو الاحياء قيد الاختبار كما أن المنطقة المحيطة بالحفر تكون حادة وواضحة . (Barry , et al . 2003) .

2-2-2-3 : وسط احمر الكونغو (CRA)

استخدم لغرض الكشف عن قدرة خميرة *C.albicans* على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm . وحضر وسط (CRA) من اذابة :

37 غم	BHIB	- نقيع القلب والدماغ
50 غم	Sucrose	- سكروز
10 غم	Agar – Agar	- آكار - آكار
900 مل	Distilled Water	- ماء مقطر

وتم تحضير صبغة احمر الكونغو بإذابة 8 غم من مسحوق الصبغة في 100 مل ماء مقطر وعقمت بصورة منفصلة عن الوسط .

3-2-2-3 : وسط Yeast Extract Pepton Dextrose Broth

استخدم هذا الوسط لغرض تنمية خميرة *C.albicans* لاستخدامها لاحقاً في استخلاص RNA وتم تحضير هذا الوسط من المكونات الآتية :

10 غم	Yeast Extract	- خلاصة الخميرة
20 غم	Pepton	- بيبتون
20 غم	Dextrose	- دكستروز
1000 مل	Distille Water	- ماء مقطر

3-2-3 المحاليل المستخدمة

1-3-2-3 : محلول مكفر لاند القياسي (No. 0.5) Macfarland's Standard

تم تحضيره وفقاً للطريقة الموصوفة من لدن المنظمة البريطانية للعلاج الكيميائي المضاد للميكروبات لعام 2013 British Society for, 2013 و Antinimicrobial Chemotherapy (BSAC) 2013 . حيث تم إضافة 0.5 مل من كلوريد الباريوم $BaCl_2$ (0.048M) إلى 9.5 مل من حامض الكبريتيك H_2SO_4 (0.18 M) وتم مزجها جيداً للحصول على عكورة تعادل (1.5×10^6) وحدة مكونة للمستعمرة / مل (CFU / ml) , استخدم هذا المحلول لمعايرة عدد الخلايا الخميرية .

2-3-2-3 : محلول اليوريا Ureae Solution

تم اذابة 20 غم من مسحوق اليوريا في 100 مل ماء مقطر ثم عقم بمرشحات دقيقة (Macfaddine,2000). Millipores (0.22 um)

3-3-2-3 : المحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline

حضر عن طريق اذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر واكمل الحجم إلى 100 مل ثم عقم بالمؤصدة وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م لحين الاستعمال . استخدم

المحلول الفسيولوجي لغرض اعداد التخافيف المطلوبة للدراسة . (Harly and Prescott , 1996) .

4-2-3 : التعقيم Sterilization

المحاليل والصبغات والايوساط الغذائية عقم قسم منها باستعمال المؤصدة (إذا كانت تتحمل درجات الحرارة العالية) بدرجة 121 م وضغط 15 باوند / انج² لمدة 15 دقيقة , في حين عقت باقي المواد مثل السكريات والمضادات الحيوية (التي لا تتحمل درجات الحرارة العالية) بالترشيح بمرشحات دقيقة (Milipores) بقطر 0.22 مايكروميتر. أما الزجاجيات المستعملة في تحضير هذه المواد فقد عقت بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة 180 م لمدة 30 دقيقة

3-3 : جمع العينات Collection of Specimens

تم جمع 62 عينة من منطقة الفم وما حول الاسنان من المرضى في مستشفى المسيب العام – محافظة بابل بواسطة مسحات قطنية معقمة Sterile Swabs لاتحتوي على وسط ناقل. ثم نقلت العينات للمختبر حيث تم تنميتها في اطباق بتري الحاوية على وسط (SDA) وحضنت هوائياً بدرجة حرارة 37 م ولمدة 48 ساعة في نفس اليوم الذي اخذت فيه العينة.

4-3 : عزل العينات وتنقيتها Isolation and Purification

عزلت ونقيت المستعمرات الفردية من كل العينات التي زرعت سابقاً على وسط (SDA) لغرض اجراء الاختبارات التشخيصية لها . (Marsh , et al . 2000) .

5-3 : التشخيص Identification

1-5-3 : وسط كروم آكار كانديدا

تم اخذ عدد من مستعمرات المزروع النقي بواسطة Loop معقم وخطت على وسط كروم آكار كانديدا وحضنت الاطباق هوائياً بدرجة 37 م ولمدة 48 ساعة . (Beighton,etal . 1995) .

2-5-3 : الفحص المجهرى Microscopic examination

تم اخذ جزء من المستعمرات ونشرت على شريحة زجاجية معقمة وصبغت بصبغة كرام ثم فحصت تحت المجهر الضوئي بقوة (40 X) لملاحظة خلايا الخميرة من حيث الشكل والترتيب. (Atlas et al.,1995)

3-5-3 : اختبار الانبوب الجرثومي Germ tube test

تم استخدام الطريقة الموصوفة من لدن Forbes وجماعته (2007) حيث نقل جزء صغير من مستعمرة المبيضات إلى انبوبة معقمة حاوية على 0.5 مل من مصلى الإنسان ثم حضن المزيج بدرجة حرارة 37 م° لمدة ساعة ونصف إلى 3 ساعات . ثم اخذت قطرة من العالق ووضعت على شريحة زجاجية معقمة وغطيت بغطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر بقوة (40 X) لملاحظة الانبوب الجرثومي .

4-5-3 : اختبار الابواغ الكلاميدية Chlamydospores Test

اخذت مستعمرة نقية مفردة من خميرة *C.albicans* ولقح بها وسط اكار طحين الذرة (Cornmeal agar) ، وتم عمل ثلاثة خطوط متوازية على سطح الاكار وغطيت الخطوط بوساطة غطاء شريحة معقم ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 48 ساعة وبعدها رفع غطاء الشريحة بواسطة ملقط معقم ووضعت على شريحة زجاجية حاوية على قطرة من صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن وفحصت تحت المجهر بقوة (10 X) لملاحظة الابواغ الكلاميدية في طرف الهايفات الكاذبة . (Marsh and Martin et .al . 2009)

5-5-3 : النمو في درجة الحرارة 45 م° Growth at 45 C°

اجري هنا الاختبار حسب طريقة Pinjon وجماعته (1998) وذلك بتخطيط العينات على وسط SDA ثم حضنت بدرجة حرارة 45 م° وهذا الاختبار مهم للتمييز بين نوعي خميرة *C.albicans* وخميرة *C.dublinsiensis* .

6-5-3 : العدة التشخيصية (ISYP) Integral system Yeast Plus

استخدمت هذه العدة لغرض التشخيص الدقيق لانواع خميرة الكانديدا *Candida spp* على اساس تمثيل الكربوهيدرات (12 نوع من الكربوهيدرات) بالإضافة إلى لون الوسط عند اضافة العالق إلى الحفرة الحاوية على كروم آكار واجري هذا الاختبار على النحو الآتي :

أولاً : تحضير العالق الفطري

1- محلول A : اخذت مستعمرة واحدة أو اكثر ومزجت مع انبوبة حاوية على المحلول الفسيولوجي للحصول على عكورة تطابق عكورة المحلول القياسي مكفرلاند رقم (0.5) والتي تعادل 1.5×10^6 خلية / مل (CFU / ml) .

2- محلول B : اخذ 0.02 مل (20 μ L) من محلول A واضيفت إلى انبوبة محلول فسيولوجي اخرى.

ثانياً : التلقيح

1- اضيفت 0.2 مل (4 قطرات) من العالق A إلى الحفر (1-13) واحتوت هذه الحفر على المواد الاتية: (كلوكوز، مالتوز، سكروز، لاكتوز، كالكثوز، مليبايوز، سيلوبايز، اينوسيتول، كزايولوز، رافينوز، تريهالوز، ديولسيتول، وسط كروم آكار الكانديدا) على التوالي.

2- اضيفت 0.2 مل (4 قطرات) من العالق B إلى الحفر (14-24) واحتوت هذه الحفر على المضادات الفطرية الاتية : نيساتين، امفوتريسين، فلوسايتوسين، ايكونازول، كيتكونازول، كلوتريمازول، مايكونازول، اتراكونازول، فوريكونازول، فلوكونازول، وسط سيطرة للمقارنة

3- اضيفت قطرة من الزيت إلى كل حفرة ما عدا حفرة 13- كروم آكار وحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة .

4- قورنت النتائج مع حفرة السيطرة اعتمادا على التغير اللوني لكل حفرة فعند تغير اللون البنفسجي الى اللون الاصفر في تمثيل الكربوهيدرات تعد النتيجة موجبة وعدم تغير اللون البنفسجي تعد النتيجة سالبة .

5- قورنت نتائج تأثير المضادات الفطرية مع وسط السيطرة الذي كان ذو لون اصفر فعند تغير اللون الاحمر الى الاصفر يدل على وجود نمو قليل للخميرة وانها ذات حساسية ومقاومة متوسطتين لذلك المضاد كما ان تغير اللون الاحمر الى البرتقالي يدل على وجود نمو كثيف للخميرة وانها مقاومة للمضاد في حين ان عدم تغير اللون يدل على حساسية الخميرة للمضاد الفطري.

7-5-3 : اختبار اليوريز Urease

نقل لقاح من خميرة *C.albicans* إلى انابيب اختبار حاوية على وسط آكار اليوريا (Urea Agar), ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة . واجري هذا الاختبار للتحري عن قدرة الخمائر لأنتاج انزيم اليوريز ويستدل عليه من خلال التغير اللوني للوسط . (Macfaddin , 2000) .

6-3 : اختبار احمر الكونغو (CRA) Congo Red Agar

اجري هذا الاختبار للكشف عن قدرة خميرة *C.albicans* على تكوين الغشاء الحيوي, حيث تم تخطيط مستعمرات الخميرة على وسط CRA ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة . (Freeman , et .al . 1989) .

7-3 : تحضير المستخلص الكحولي لقشور الرمان

اولاً - جمعت قشور الرمان *Pomaganrate Peels* بعد فصلها من فاكهة الرمان وغسلت وجففت بدرجة حرارة الغرفة (25 م) ثم طحنت بالطاحونة الكهربائية .

ثانياً - استخدم جهاز الساكسوليت (Soxhlet Apparatus) للحصول على المستخلص الكحولي لقشور الرمان حيث وضع 50 غم من باودر قشور الرمان في غرفة thimble الخاصة بجهاز الساكسوليت ، واستخدم كحول الاثيل كمذيب حيث وضع 500مل من الكحول في الدورق (randome) وشغل الجهاز بدرجة حرارة لا تتجاوز 40 م , وانتهت عملية

الاستخلاص عندما اصبح لون المذيب لا لون له Colorless عند خروجه من Thimble واستغرقت عملية الاستخلاص لما يقرب اربع ساعات .

ثالثاً - تم تركيز المستخلص بشكل باودر وذلك بتجفيفه باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة حرارة لا تتجاوز 40 م° , وحفظ المستخلص المركز (الباودر) في اكياس بولي اثيلين بدرجة 4 م° لحين تحضير تراكيز مختلفة منه . . (Radubvie ,et .al . 2007) .

رابعاً - تحضير تراكيز مستخلص قشور الرمان

1- حضر المحلول الخزين (Stock Solution) للمستخلص الكحولي لقشور الرمان وذلك بوزن 1.5 غم من مسحوق المستخلص المحضر مسبقاً (باودر قشور الرمان) .

2- اضيف له 10 مل من الكحول الايثيلي بتركيز (70 %) للحصول على Stock Solution بتركيز 150 ملغم / مل .

3- حضر التركيز 100 ملغم / مل وذلك بأخذ 2 مل من Stock Solution واضيف له 1 مل من كحول الاثيل 70 % .

4- حضر التركيز 50 ملغم/ مل وذلك بأخذ 1 مل من Stock Solution واضيف له 2 مل من كحول الاثيل 70 % .

5- حضر التركيز 25 ملغم/ مل وذلك بأخذ 0.5 مل من Stock Solution واضيف له 2.5 مل من كحول الاثيل 70 % .

6- حضر التركيز 12.5 ملغم/ مل وذلك بأخذ 0.25 مل من Stock Solution واضيف له 2.75 مل من كحول الاثيل 70 % .

7- عقت التراكيز بمرشحات غشائية دقيقة بقطر (0.22 um) . (Wang ,etal. 2006; . الدعي , 2014) .

8-3 : اختبار حساسية خميرة *C.albicans* للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP)

1-8-3 : طريقة الانتشار بالحفر Well diffusion method

1- اللقاح الفطري Fungal inocula

مزجت عدة مستعمرات من خميرة *C.albicans* مع 5 مل من المحلول الفسيولوجي وتم مطابقة عكورة العالق مع عكورة محلول مكفر لاند القياسي (0.5) الذي يعادل 1.5×10^6 CFU/ml.

2- غطست مساحات قطنية معقمة في العالق الفطري ثم خطط سطح الأكار (مولر هنتون MH + 2 % كلوكوز + 0.5 غم / لتر صبغة ازرق اليمثلين) بالعلق وتركت الاطباق لمدة 15 دقيقة لامتناس المزيغ من قبل الأكار .

3- تم عمل عدة حفر في كل طبق بقطر (6 mm) بواسطة ثاقب فليبي معقم .

4- وضع في كل حفرة 50 مايكروليتر من كل التراكيز المختلفة (150 , 100 , 50,25 , 12.5 ملغم / مل واستخدم المذيب (الكحول الاثيلي 70 %) ليمثل سيطرة سالبة Negative Control , في حين استخدم المضاد الفطري النيستاتين (Nys) 100,000 وحدة دولية (IU) كسيطرة موجبة Positive Control .

5- بعد مدة حضانة 48 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ قرأت اقطار المناطق التثبيطية Diameter of Inhibition Zones (DIZ) . (AL- Mohana , et . al., 2008)

2-8-3 : اختبار التركيز المثبط الأدنى Minimum inhibitory Concentration (MIC)

اجري اختبار الـ (MIC) بطريقة Microdilution method المعتمدة من قبل (CLSI (2002) , كما في الخطوات الاتية :

1- حضر العالق الفطري لخميرة *C.albicans* باستخدام وسط RPMI – 1640 media وتم مطابقة عكورة العالق مع عكورة محلول مكفرلانند القياسي (0.5) التي تعادل (1.5×10^6) خلية / مل .

2- استعملت 8 انابيب رقمت من 1-8 و اضيف اليها 1 مل من وسط RPMI -1640 .

3- لتحضير المحلول الخزين Stock Solution من المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) أُذيب 1.5 غم منه في 10 مل من كحول الايثيل بتركيز (70 %) للحصول على تركيز نهائي 150ملغم/مل ثم حضر التركيز 100ملغم/مل ومنه حضرت سلسلة من التخفيف النصفية (3.12,6.25,12.5,25,50,100,150) ملغم / مل للمستخلص الكحولي باستخدام الوسط RPMI- 1640 وذلك بإضافة 1 مل إلى الانبوب الاول ورج جيدًا ثم نقل 1 مل من الانبوب الاول إلى الانبوب الثاني ورج جيدًا ثم نقل 1 مل من الانبوب الثاني إلى الانبوب الثالث وكررت العملية وصولاً إلى الانبوب رقم 8 إذ رُج وأزيل منه 1 مل للحصول على حجم نهائي مقداره 1 مل في كل انبوب وغيرت الماصة بين انبوب وآخر لمنع حدوث التلوث

4- تم استخدام صفيحة Microtiter Plate الحاوية على 96 حفرة (96 Wells) .

5- وضع في كل حفرة (150) مايكروليتر من كل من التراكيز التي حضرت مسبقاً .

6- اضيف 50 مايكروليتر من العالق الفطري لكل حفرة ، واستخدم المضاد الفطري النيساتين (Nys.) بتركيز 100,000 وحدة دولية واستخدم كحول الايثيل (70 %) كسيطرة سالبة .

7- غطيت الصفيحة وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضانة فحصت جميع حفر الصفيحة بوجود أو عدم وجود العكورة Turbidity .

8- حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) بعد الحضانة الذي يمثل أقل تركيز من المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) لم يلاحظ فيه نمو لخميرة *C.albicans* مرئياً .

9-3 : اختبار تكوين الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans*

تم تنمية الغشاء الحيوي وفقاً لطريقة Chandra وجماعته (2001) وهذه الطريقة مطابقة تماماً لطريقة Microtiter Plate (MTP) لتكوين الغشاء الحيوي لخميرة *C. albicans* التي اتبعها Pierce وجماعته (2010) مع بعض التحوير إذ استخدمت أطباق بتري لتنمية الغشاء الحيوي. تم اختبار خمس من أصل ست عزلات جميعها كونت غشاءاً حيوياً قوياً Strong Biofilm بطريقة أحمر الكونغو (CRA) واتبعت الخطوات الآتية في الاختبار الحالي :-

أولاً : تحضير المزروع لخميرة *C. albicans*

- 1- تم تلقيح دورق مخروطي حاوي على 25 مل من وسط Yeast Pepton Dextrose Broth (YPDB) بعدد من مستعمرات خميرة *C. albicans*.
- 2- حضن المزيج في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 30 م° و 180 دورة في الدقيقة ولمدة 18 ساعة.
- 3- اخذ المزروع الذي سبق حضنه ليلة كاملة وعرض للتردد المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق .
- 4- غسلت الخلايا (الراسب Pellet) مرتين بالمحلول الفسيولوجي ثم اضيف 20-25 مل من وسط RPMI- 1640 إلى (الراسب) المغسول وتم المزج بواسطة جهاز Vortex .
- 5- من العالق الاخير تم تحضير عالق فطري مخفف يطابق في عكورته عكورة محلول مكفر لاند القياسي 0.5 الذي يعادل (1.5×10^6 CFU / ml) .

ثانياً : تكوين الغشاء الحيوي في اطباق بتري البلاستيكية

- 1- تم استخدام اطباق بتري البلاستيكية ذات قطر (6 سنتمتر) وبمعدل خمسة اطباق لكل عزلة مع طبق سيطرة لكل عزلة .
- 2- وضع في كل طبق 9 مل من وسط RPMI- 1640 ثم اضيف 1 مل من العالق الفطري المحضر مسبقاً .
- 3- احيطت الاطباق بشريط parafilm وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة .

4- تم التخلص من محتويات الاطباق (ما عدا اطباق السيطرة حيث استمرت مدة حضانتها 48 ساعة) .

5- غسلت الاطباق بالمحلول الفسيولوجي ثلاث مرات بحركة دائرية خفيفة للتخلص من الخلايا الطافية غير الملتصقة . بعد هذه المرحلة يبدو قعر الطبق مضيقاً مما يدل على تكون الغشاء الحيوي .

6- تم تصبيغ الاطباق الحاوية على الغشاء الحيوي باضافة 10مل من صبغة البنفسج البلوري بتركيز 1% وتركت لمدة 45دقيقة ثم تم التخلص من الصبغة وغسلت الاطباق بالماء المقطر للتخلص من بقايا الصبغة وجففت الاطباق ثم اضيف اليها ايثانول 95% لمدة دقيقة واحدة ثم تم التخلص من الكحول وغسلت الاطباق بالماء المقطر وتركت لتنشف ثم فحصت تحت المجهر بقوة 40X لرؤية الغشاء الحيوي المتكون.

3- 10 : اختبار فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) على الغشاء الحيوي من خلال تأثيره على الجين ALS1.

1- بعد غسل الاطباق (غير المصبغة) في الخطوة الخامسة ،اضيف اليها 5 مل من وسط RPMI- 1640 + 5 مل من المستخلص الكحولي لقشور الرمان وبمعدل تركيز لكل طبق (12.5 , 25 , 50 , 100 , 150) ملغم / مل .

2- حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 48 ساعة .

3- تم التخلص من محتويات الاطباق وغسلت بالمحلول الفسيولوجي ثلاث مرات .

4- أُضيف لكل طبق (1) مل من وسط RPMI- 1640 بالإضافة إلى اطباق السيطرة .

5- قشط الغشاء الحيوي المتكون في الاطباق بلطف بواسطة اداة قشط معقمة .

6- نقلت محتويات كل طبق (الغشاء الحيوي المقشوط + الوسط) إلى انابيب باندروف Pandroff tubes ووضعت للطرد المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق .

7- تم التخلص من الراشح بواسطة micropipette .

8- أُحتفظ بالراسب Pellet بدرجة 20- درجة سيليزية لحين استخدامه في استخلاص RNA.

11-3 : فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)

Quantitative Reverse Transcription Real – Time PCR (qRT –PCR)

تم اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس المستويات الكمية للحمض النووي المرسل (mRNA) للدلالة على مقدار التعبير الجيني لجين (*ALS₁ gene*) *Candida albicans* biofilms وكذلك تم استخدام جين الـ (*Act1*) بوصفه جينا منظما قياسيا لحساب التعبير الجيني .

تم اجراء هذا الفحص حسب طريقة (Nailis , et . al., 2010) كما في الخطوات الاتية :-

1-11-3 : استخلاص الاحماض النووية الكلي Total RNA extraction

تم استخلاص الحمض النووي Total RNA وذلك باستخدام عدة الـ Trizol kit المجهزة من لدن شركة Bioneer الكورية ولقد تم العمل بهذه العدة حسب تعليمات الشركة المصنعة كما في الخطوات الاتية:-

1- تم اخذ الانبوبة الحاوية على الراسب Pellet المحضرة في الفقرة (3-10) ثم اضيف 1 مل من محلول الـ Trizol ومزجت جيّدًا لمدة دقيقتين .

2- اضيف 200 مايكروليتر من كحول الـ Chloroform لكل عينة من العينات ورجت لمدة 15 دقيقة بواسطة المازج Vortex .

3- حضن الخليط في الثلج لمدة 10 دقيقة .

4- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقيقة بسرعة 12000 دورة / دقيقة .

5- نقلت الطبقة العليا (الشفافة) إلى انبوبة ابندروف جديدة بواسطة Micropipette وأضيف إليها كمية متساوية من Isopropanol al Cohol وقلبت الانبوبة 4-5 مرات باليد.

6- حضنت العينات بدرجة حرارة 20 - م لمدة 10 دقيقة .

7- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي 12000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقيقة ثم تم التخلص من الطافي وأخذ المترسب Pellet .

8- أُضيف للمترسب 1 مل من Ethanol Alcohol بتركيز 80 % ومع الرج المستمر بجهاز Vortex ثم وضع الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقيقة وتم التخلص من الطافي وأخذ المترسب Pellet .

9- جففت الانابيب بدرجة حرارة الغرفة.

10- حفظ المترسب اضافة DEPC water بمقدار 50µ ووضعه في حمام مائي بدرجة حرارة (55 - 60) م ولمدة 10 دقيقة بعد ذلك حُفظ الحمض النووي RNA المستخلص في درجة حرارة -70 م .

2-11-3 : قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الريبوسومي الكلي Assessing RNA

Yield and Quality

تم الكشف عن الحمض النووي RNA المستخلص من خلال استخدام جهاز خاص Nanodrop Spectrophotometer وذلك لتحديد تركيز الحمض النووي الريبوسومي RNA (µg \ ng وقياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة 260/ 280 nm) على النحو التالي :-

1- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع RNA .

2- قُمنّا بتصفير الجهاز وذلك بوضع 2 مايكروليتر من (Free nuclease water) باستخدام ماصة دقيقة معقمة على سطح ركيزة المقياس و اجراء التصفير وبعدها نُظفت الركيزة باستخدام اوراق تنشيف لقياس العينات .

3- ضغطنا على زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـ RNA وذلك باستخدام 1 ميكروليتر من كل عينة من الـ RNA المستخلص ومن ثم نُظفت ركيزة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى .

4- حددت نقاوة عينات الـ RNA المستخلص بقراءة الامتصاصية بجهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260 / 280 nm) حيث أن الحمض النووي RNA المستخلص يعد نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (2-1.2) .

3-11-3: المعاملة بأنزيم DNase 1 Treatment

تم معاملة مستخلص الحمض النووي الريبوسومي RNA باستخدام DNase 1 Treatment وذلك للتخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم كما في الجدول (3-7) .

بعد ذلك حضن المزيج في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 30 دقيقة , وبعدها أُضيف 1 مايكروليتر من مادة الـ EDTA وحضنت ايضاً بالحمام المائي بدرجة حرارة 65 م° لمدة 10 دقائق وذلك لتثبيط فعل الأنزيم .

جدول (3-7) عدة الأنزيم المستخدمة للتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الاستخلاص .

الاحجام بالميكروليتر Volume	المزيج Mix
10 µL	Total RNA 100 ng\ ul
1 µL	DNase I enzyme
4 µL	10 X buffer
5 µL	DEPC water

المجموع Total	20 µL
---------------	-------

4-11-3 : طريقة تصنيع الـ cDNA synthesis

تم استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي cDNA المكمل للـ DNA من عينات الحمض النووي الـ RNA المستخلص لاستخدامه في تضخيم مورث التعبير الجيني والمورث المحافظ بفحص الـ RT – PCR باستخدام عدة Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزة من لدن شركة Bioneer الكورية ، وتم اجراء هذه العملية حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول (3 - 8) .

جدول (3 - 8) عُدّة كَما المستخدمة في عملية تصنيع الـ cDNA synthesis

Volume	RT Master Mix
10 µL	Total RNA 100 ng\ ul
1 µL	Random Hexamer Primer 10 pmol
9 µL	DEPC water
20	Total

بعد ذلك تم إضافة مكونات مزيج RT master mix التي ذكرت في الجدول اعلاه إلى انابيب عدة cDNA synthesis والحاوية على انزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcription ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج Vortex (Eixspin) centrifuge بسرعة 3000 rpm في الدقيقة الواحدة لمدة ثلاث دقائق , بعد ذلك نقلت الانابيب إلى جهاز الدوار الحراري (Mygene , Korea) Thermo cycler وتم تطبيق الظروف الحرارية لعملية تصنيع الـ cDNA حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول (3 - 9) . ونقلت بعد ذلك العينات للحفظ بدرجة -20 م لحين استخدامها في فحص RT – PCR .

جدول (3 – 9) الظروف الحرارية المثلى لمراحل تصنيع الـ cDNA حسب طريقة عمل العدة

الوقت Time	الحرارة Temperature	الخطوة Step
1 hour	50 C°	cDNA synthesis (RT step)
5 minutes	95 C°	Heat inactivation

5-11-3 : فحص (qRT - PCR) Quantitative Real – Time PCR

تم اجراء فحص الـ qRT - PCR لعينات الـ cDNA لمجاميع التجربة وكذلك باستخدام عدة Accupower 2x Green Star qPCR Kit المجهزة من لدن شركة بايونير الكورية ، لأجراء هذا الفحص والحاوي على صبغة السابير الخضراء التي تتفاعل مع الجينات المتضخمة في جهاز الـ Real - Time PCR كما يأتي :-

أ- تحضير مزيج تفاعل qRT - PCR للجين الهدف (ALS_1 gene) . (جدول 3 – 10) .

جدول (3 – 10) : مكونات مزيج تفاعل qRT - PCR للجين ALS_1

Volume	qPCR master mix
5 μ L	cDNA template
1 μ L	ALS_1 gene Forward primer (10pmol)
1 μ L	ALS_1 gene Reverse primer (10pmol)
12.5 μ L	2x green star qPCR master mix
5.5 μ L	DEPC water
25 μ L	Total

ب- تحضير مزيج تفاعل qRT – PCR للجين للمحافظ القياسي ACT_1 genes (جدول 3- 11)

جدول (3- 11) مكونات مزيج تفاعل qRT –PCR للجين ACT_1

Volume	qPCR master mix
5 μ L	cDNA template
1 μ L	ACT_1 gene Forward primer (10pmol)
1 μ L	ACT_1 gene Reverse primer (10pmol)
12.5 μ L	2x green star qPCR master mix
5.5 μ L	DEPC water
25 μ L	Total

أضيفت المكونات التي ذكرت في الجداول اعلاه إلى انابيب qRT –PCR الخاصة , ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج Vortex centrifuge (Eixspin) بسرعة 3000rpm في الدقيقة الواحدة لمدة ثلاث دقائق ، وبعدها نقلت الصفيحة إلى جهاز (Miniopticon Real – Time PCR, BioRad USA) وتم تطبيق الظروف الحرارية qPCR Thermo Cycler condition لكل الجينات حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول (3 – 12) .

جدول (3- 12) الظروف الحرارية المثلى لمراحل qRT – PCR للجينات ACT_1 و ALS_1

Repeat Cycle	Time	Temperature	qRT- PCR Step
1	3 min	95 C°	Initial Denaturation
45	20 sec	95 C°	Denaturation
	30 sec	60 C°	Annealing Extension Detection (scan)

1	0.5 sec	60 - 95 C°	Melting
---	---------	------------	---------

6-11-3: طريقة تحليل بيانات Real – Time PCR data analysis

نقوم حلت البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلورة في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة Livak Method التي وضعت من لدن Livak and Schmittgen , (2001) , والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية (Relative Quantitve) من خلال عملية تصحيح ومعادلة الجينات الهدف مع جينات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بايولوجي لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي تم الحصول على النتائج في الجدول اعلاه باستخدام طريقة (Livak method $2^{-\Delta\Delta ct}$) , وتحتاج هذه الطريقة إلى وجود جين هدف الذي تمثل بهذه الدراسة الجين (ALS_1) الخاص بخميرة *C.albicans* وايضًا إلى جين محافظ أو معياري (HKG) Housekeeping Gene وتمثل في الجين β –Actin1 (ACT_1) وكما في المعادلات الاتية:

1- معادلة CT للجين الهدف بالنسبة إلى الجين المعياري لكل من العينات المعاملة و عينات السيطرة (غير المعاملة) ، باستخدام القوانين الآتيين :

$$\Delta CT (test) = CT (target , test) - CT (ref , test) .$$

$$\Delta CT (control) = CT (target , control) - CT (ref , control) .$$

CT (target , test) : يشير إلى عتبة الدورة (الجين الهدف ، العينة المعاملة) .

CT (ref ,test) : يشير إلى عتبة الدورة (للجين المحافظ ، العينة المعاملة) .

CT (target , control) : يشير إلى عتبة الدورة (الجين الهدف ، عينة السيطرة) .

CT (ref , control) : يشير إلى عتبة الدورة (الجين المحافظ ، عينة السيطرة) .

2- معادلة ΔCT للعينة المعاملة بالنسبة إلى ΔCT لعينة السيطرة باستخدام القانون الاتي :-

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT (test) - \Delta CT (control) .$$

3- ايجاد نسبة التعبير الجيني (Fold change) ، باستخدام القانون :

$$\text{Gene expression Ratio} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

12- 3 : التحليل الاحصائي statistical Analysis

خُلت البيانات احصائيًا باستخدام برنامج التحليل الاحصائي (SPSS) ، وقورنت المتوسطات والخطأ القياسي (Std. error) والتباين المعنوي عند مستوى احتمال $(P \leq 0.05)$.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4 العزل والشخصية Isolation and Identification

استخدم وسط السابروييد دكستروز آكار (SDA) وسطا اوليا لعزل الفطريات حيث يسمح بنمو انواع خميرة الكانديدا *Candida spp.* ويثبط نمو الكثير من انواع البكتريا الموجودة في الفم بسبب انخفاض الاس الهيدروجيني PH وأن إضافة المضادات الحيوية لهذا الوسط يجعله اختيارياً أكثر لنمو الفطريات (Marsh and Martin , 2009 ; Odds.1991) وقد ظهرت مستعمرات خميرة *C.albicans* على وسط (SDA) بشكل مستعمرات دائرية , بيضاء إلى كريمية اللون مرتفعة عن سطح الآكار لماعة ذات حواف ملساء وهذه الصفات تتوافق مع ما توصل إليه Baveja , (2010) . واستخدم الوسط كروم آكار كانديدا (CAC) للتفريق بين انواع التابعة لخميرة الكانديدا ، كما شخصت خميرة *C.albicans* بالاعتماد على مجموعة من الاختبارات البايوكيميائية والفسولوجية مثل اشكال المستعمرات ولونها ورائحتها واصطبغها بصغة كرام وقابليتها على تكوين الانبوب الجرثومي والابواغ الكلاميدية ونتاج انزيم اليوريزوالنمو بدرجة 45م° (جدول 1-4)، بالإضافة إلى استهلاكها للكربوهيدرات من خلال استخدام العدة التشخيصية Integral System Yeast Plus (ISYP) ، جدول (2-4) .

جدول (1-4) الاختبارات التشخيصية لأنواع الكانديدا المعزولة

ت	العزلات	CAC		Gram stain	GTT	CF	UT	Growth at 45°
		Shape	Colour					
1	<i>C. albicans</i>	اخضر فاتح	المستعمرات مرتفعة عن سطح الآكار , ملساء لماعة	+	+	+	-	+
2	<i>C. dubinienisi</i>	اخضر غامق	المستعمرات مرتفعة عن سطح الآكار , ملساء لماعة	+	+	+	-	-
3	<i>C. tropicalis</i>	مستعمرات	مستعمرات مسطحة	+	-	-	-	-

					بنفسجية اللون ذات حواف زرقاء				
	-	-	-	+	مسطحة تقريباً ذات حواف متعرجة	وردي فاتح ذات حواف وردي مائل للأبيض	<i>C. kruesi</i>	4	

. GTT = اختبار الانبوب الجرثومي Germ Tube Test .

. UT = اختبار اليوريز Urease Test .

. CF = اختبار تكوين الابواغ الكلاميدية Chlamyospores Formation .

جدول (2-4) اختبار الكربوهيدرات ووسط Chrom لأنواع خميرة الكانديدا بواسطة العدة
التشخيصية (ISYP)

الأنواع				استهلاك الكربوهيدرات
<i>C. kruesi</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. dubinienisi</i>	<i>C. albicans</i>	
+	+	+	+	Glucose
-	+	+	+	Maltose
-	+	+	+	Sucrose
-	-	-	V	Lactose
-	+	+	+	Galactose
-	-	-	-	Melibiose
-	V	-	-	Cellobiose
-	-	-	-	Inositol
-	+	-	V	Xylose

-	-	-	-	Raffinose
-	+	-	V	Trehalose
-	-	-	-	Dulcitol
Pink	Blue	Colourless	Green	(chr) الخاص بالعدة التشخيصية

V : متغير Variable .

+ : حصول تغير لوني .

- : عدم حصول تغير لوني

(Chr) وسط الكروم Chromagar.

في الاختبارات التشخيصية لأنواع الكانديدا *Candida spp.* المعزولة من منطقة الفم وما حول الاسنان تم استخدام الوسط التفرقي كروم آكار كانديدا (CAC) للتمييز بين أنواع الكانديدا بالاعتماد على مظهر المستعمرات ولونها حيث ظهرت خميرة *C. albicans* بلون اخضر فاتح في حين ظهرت مستعمرات *C. dubliniensis* بلون اخضر غامق أما مستعمرات خميرة *C. tropicalis* فكانت بلون بنفسجي ذات حواف متعرجة زرقاء اللون وظهرت مستعمرات خميرة *C. Krusei* بلون وردي ذات حواف متعرجة بلون وردي فاتح مائل إلى الابيض , واتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Schoofs وجماعته (1997) . ولعل ظهور مستعمرات الخمائر بالوان مختلفة على وسط Chromagar هو نتيجة ادخال مواد لاصباغ ثانوية تتفاعل مع الانزيمات المفرزة من عند هذه الاحياء , حيث تتميز هذه الاوساط المطورة المذكورة بكونها متخصصة لأنواع معينة (Species – Specific) إذ يمكن من خلالها تشخيص النوع عن طريق لون وخصائص المستعمرات . (Martens , 1994 , et .al ., Fenn , 2004 ;) , ويعد الانبوب الجرثومي والابواغ الكلاميدية من الصفات التشخيصية المهمة التي تميز خميرة *C. albicans* من الانواع الاخرى من خميرة الكانديدا (*C. tropicalis* , *C. Krusei*) , حيث يتكون الانبوب الجرثومي في خميرة *C.albicans* بشكل تركيب خيطي ذي جدران متوازية ولا يوجد تخرص أو حاجز في

منطقة اتصاله بالخلية الام ويكون الانبوب الجرثومي خاليا من الحواجز ويتكون بعد مدة حضانة 1.5- 3 ساعات بدرجة حرارة 37م° ، في حين أن الانواع الأخرى من خميرة الكانديدا غير مكونة للانبوب الجرثومي واتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Kumar and Shukla , 2010) ، كما تتميز خميرة *C.albicans* بقدرتها على تكوين الابواغ الكلاميدية Chlamydospores وهي خلايا جنسية كروية الشكل ذات جدران سميكة وتتكون في النهاية القمية للهايفات الكاذبة (براعم بنوية متطاولة تبقى متصلة مع الخلية الام بعد تكون الحواجز فيما بينها) . وتوافقت هذه النتائج مع نتائج Bose وجماعته (2011) ، ومع ما توصل إليه (Sudbery , et .al . , (2004) . قابلية *C. albicans* على تكوين الانبوب الجرثومي والابواغ الكلاميدية والهايفات الكاذبة تعد من عوامل الضراوة المهمة التي لها علاقة وثيقة بامراضية خميرة *C.albicans* ، حيث تكمن أهمية الانبوب الجرثومي في تمكين الخميرة من الالتصاق بالاسطح الطلانية للمضيف لأحداث الإصابة ، ويلاحظ تكون الانبوب الجرثومي عندما تأخذ خميرة *C.albicans* بالتحول من شكل الخميرة Yeast form إلى شكل الخيط الفطري Hyphae form . (Yang , 2003) .

يكون التحول من شكل الخلية إلى شكل الخيط الفطري عكسي ويحدث نتيجة بعض العوامل مثل درجة الحرارة (37 م° لتكوين الهايفا والخلايا) و PH (عندما يكون PH حامضيا تتكون الخلايا وعندما يكون PH متعادلا تتكون الهايفا) ، أما عند توافر المواد الغذائية الضرورية تتكون الخلايا في حين أن النقص في المواد الغذائية يؤدي إلى تحول الخميرة إلى الهايفا وعندما يكون هنالك انعدام في المواد الغذائية تقوم خلايا الخميرة بالدخول إلى مجرى الدم وتحدث إصابة جديدة في أماكن بعيدة من الجسم . (Sudbery , etal.2004 ; Gow , 2007) (Webstrand weber , 2006 , Sundstorm , 2002) ، وتختلف خلايا الخميرة والهايفات في قابليتها على أحداث المرض حيث بين (Odds (1994 في ابحاثه بأن الهايفا مغطاة بالمانو بروتين Mannoproteins هذه البروتينات تلتصق بقوة مع البروتينات المتواجدة في أسطح الاغشية الخلوية للمضيف ، وكذا تقوم الهايفا بإفراز انزيم Aspartyl proteins وانزيم Lipases القادرين على هضم وتحطيم انسجة المضيف (Hube and Naglik , 2001) ، وكانت نتائج اختبار اليوريز سالبة مما يدل على عدم قدرة الخميرة *C.albicans* على انتاج انزيم اليوريز الذي يعمل على تحليل اليوريا في الوسط ومن ثم لا يتحول الوسط إلى اللون الاحمر الارجواني بل يبقى اصفر اللون واتفقت هذه النتيجة مع ما

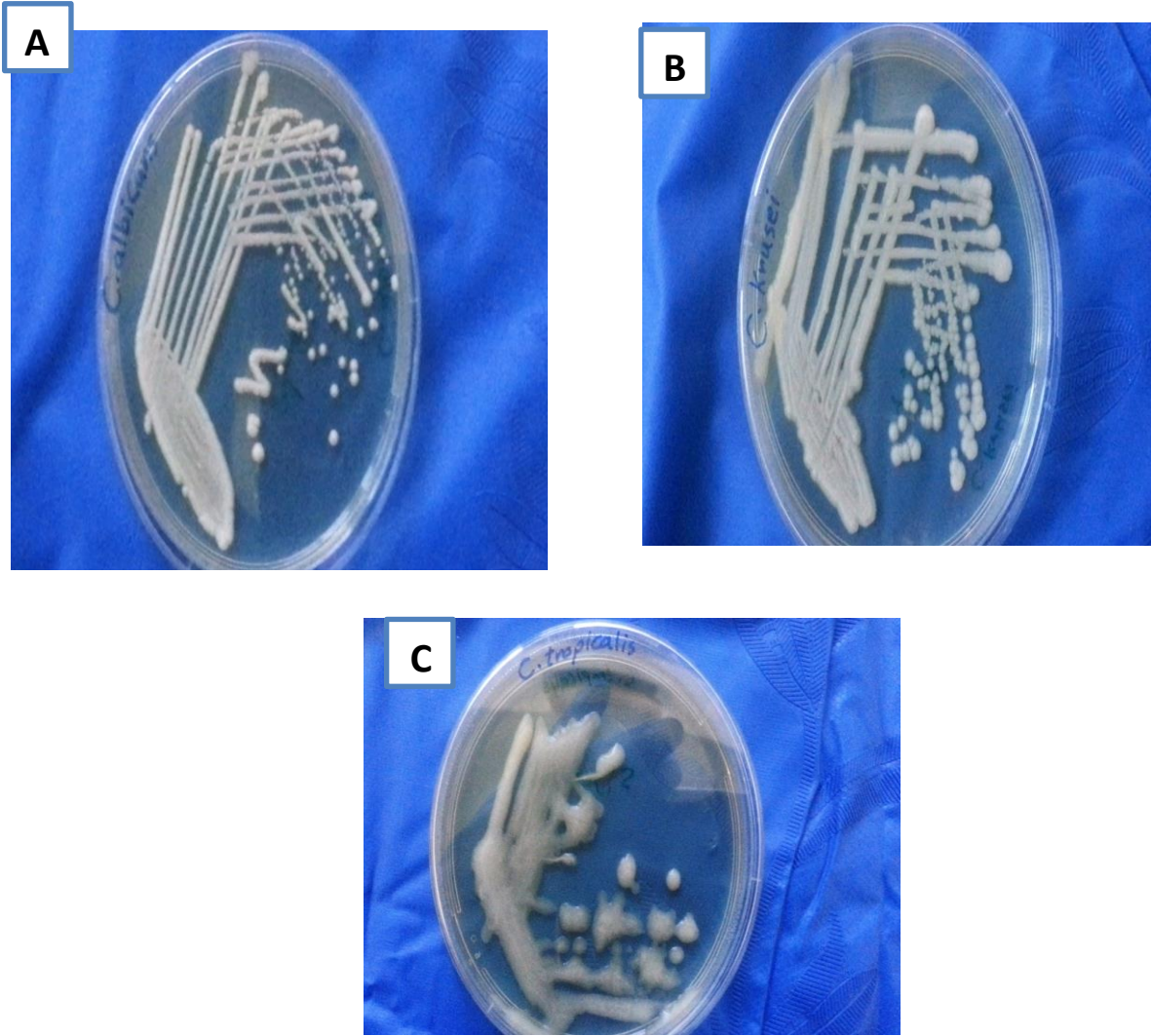
توصل إليه (Macfaddine ,2000; Collee ,etal., 1996) ، وان قابلية خميرة *C.albicans* على النمو في درجة حرارة 45 م° يجعلنا قادرين على التمييز بين هذه الخميرة وبين خميرة *C.dublineinsis* التي لا تستطيع النمو في نفس الدرجة الحرارية (45 م°) ، وجاءت هذه النتائج متوافقة مع نتائج Pinjon وجماعته (1998) الذي بين بأنها طريقة بسيطة ، غير مكلفة وسريعة للتفريق بين هذين النوعين من خميرة الكانديدا ويعزى السبب في قابلية خميرة *C.albicans* على النمو في درجة (45 م°) إلى قابليتها على تحمل درجة الحرارة العالية لكونها من الفطريات المحبة للدرجات الحرارية العالية ، وكانت نتائج العدة التشخيصية (ISYP) مطابقة لنتائج الاختبارات التشخيصية أن هذا النوع من التشخيص سريع ودقيق ، تم تشخيص 31 (50 %) عزلة تعود للنوع *C.albicans* ، 12 (19.35 %) تعود للنوع *C.dublinensis* ، و 11 (17.74 %) تعود للنوع *C.tropicalis* و 8 (12.90 %) تعود للنوع *C.Krusei* ، جدول (3- 4) .

جدول (3 – 4) :أعداد عزلات خميرة *Candida* ونسبها

العزلات	العدد	النسبة المئوية
<i>C.albicans</i>	31	50 %
<i>C.dublinensis</i>	12	19.35 %
<i>C.tropicalis</i>	11	17.74 %
<i>C.Krusei</i>	8	12.90 %
المجموع	62	100 %

إن سيادة خميرة *C.albicans* على باقي الانواع الاخرى تتفق مع الموسوي (2006) كما تتفق هذه النسب مع ما توصل إليه و Saxena وجماعته (2004) ، ولعل السبب في سيادة خميرة *C.albicans* اكثر من غيرها من انواع الكانديدا هو قابليتها الكبيرة على الالتصاق بأسطح المضيف مسببة داء المبيضات *Candidiasis* بالإضافة إلى نجاحها في تكوين مستعمرات عديدة *Colonizaton* وتثبيطها للميكانيكيات الدفاعية في مواضع مختلفة من جسم المضيف . (Dhanase Karan , etal .,2013) .

ويعزى السبب في انتشار خميرة *C.albcians* لتواجدها بشكل كبير في جسم الإنسان فهي مكيفة لدرجة حرارة الجسم , وكذا تمتاز بقابليتها على التحول إلى ممرضة عند حدوث ضعف مناعي في الجسم وبسبب التعاطي الكبير للمضادات الفطرية ; (Petri , et .al ., 1997)
(Vincent , et . al ., 1998) , وكذا تعد خميرة *C.albcians* واحدة من اكثر انواع *Candida* خطورة وذلك لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة المتمثلة بأنبوب الانبات القابلية على الالتصاق , والقابلية على التحول الشكلي وامتلاكها للأنزيمات المحللة . (Med Calderone and Fonzi , 2001) , حيث تنتج أنزيمات Proteinase و Uronidase و Collaginase و Neuroaminsdae التي تساعدها في اختراق انسجة وخلايا المضيف واحداث الامراضية . (Rouabhia and Chmielewski , 2012)

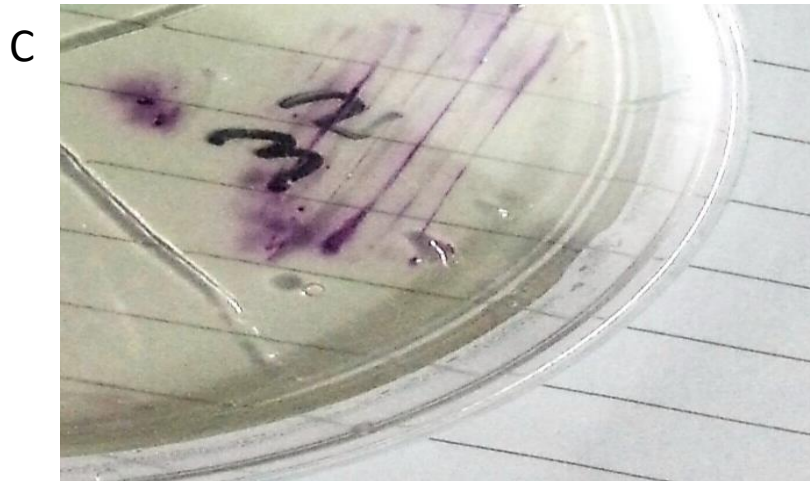


صورة رقم (4 - 1) مستعمرات خميرة *Candida spp.* على وسط (SDA)

. A - مستعمرات خميرة *C. albicans* .

. B - مستعمرات خميرة *C. krusei* .

. C - مستعمرات خميرة *C. tropicalis* .

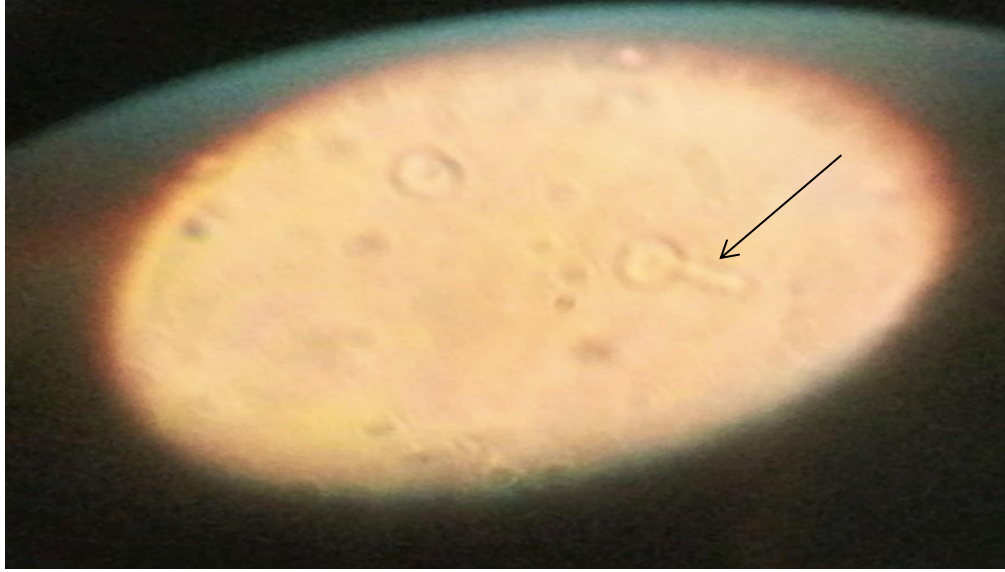


صورة رقم (4-2) مستعمرات انواع خميرة الكانديدا على وسط كروم آكار كانديدا

. A - مستعمرات خميرة *C. albicans* .

. B - مستعمرات خميرة *C. krusei* .

. C - مستعمرات خميرة *C. tropicalis* .



صورة رقم (3-4) الانبواب الجرثومي لخميرة *C.albicans* وبقوة تكبير $40 \times$.



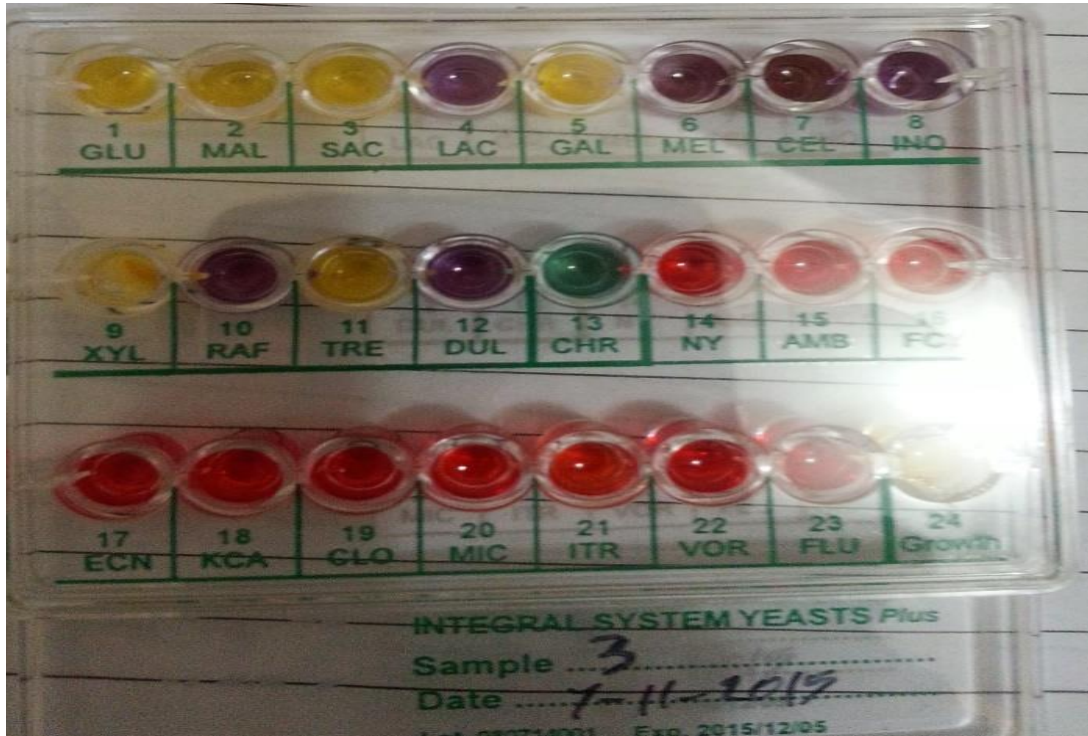
صورة رقم (4-4) الابواغ الكلاميدية وخلايا خميرة *C.albicans* مصبغة بصبغة كرام وبقوة تكبير $10 \times$.



صورة رقم (4-5) الأبواغ الكلاميدية لخميرة *C. albicans* مصبغة بصبغة اللاكتوفينول أزرق القطن وبقوة تكبير 40 x .



صورة رقم (4-6) مستعمرات خميرة *C. albicans* على وسط أكار طحين الذرة corn meal agar .



صورة رقم (4-7) العدة التشخيصية لأستهلاك الكربوهيدرات لخميرة C.albicans .

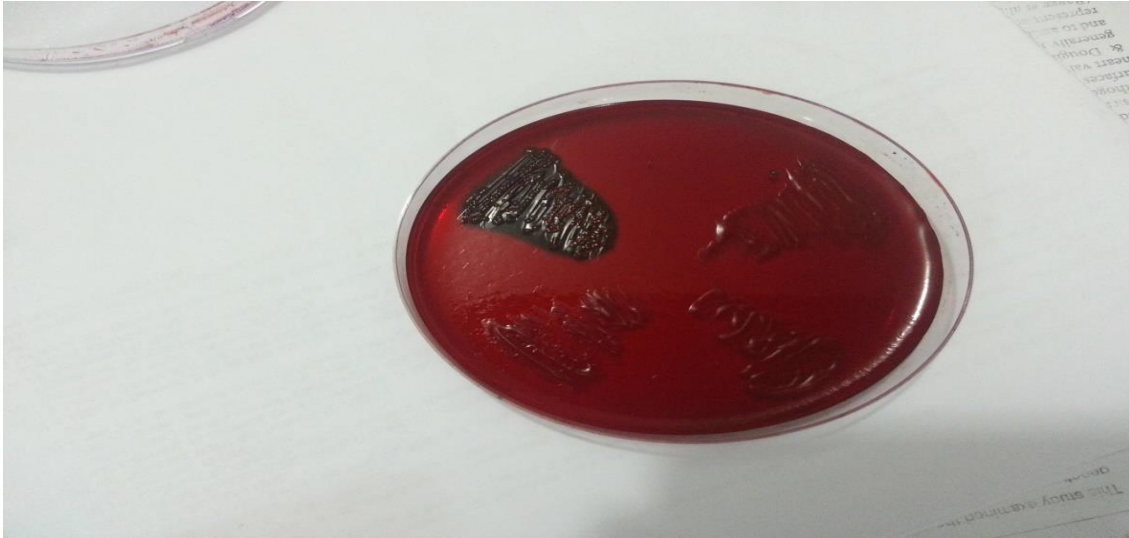
2-4 الكشف عن قدرة خميرة *C.albicans* لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقة CRA .

يوضح الجدول رقم (4 - 4) أن 16 (51.6 %) منتجة للغشاء الحيوي وتضمنت 6 (37.5 %) من خميرة *C.albicans* انتجت (Strong Biofilm) وأن 10 (62.5 %) انتجت (intermidate Biofilm) ، وأن 15 (48.4 %) من بين عزلات خميرة *C. albicans* غير منتجة للغشاء الحيوي. (Freeman, et al. ,1989). (جدول 4- 4).

جدول (4 - 4) : اعداد ونسب تكوين الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* بطريقة (CRA)

Biofilm Positive no (%)			Biofilm negative no (%)	NO: (%)	العزلات
Total	Intermediate	Strong			
(51.6) 16	(62.5) 10	(37.5) 6	(48.4)15	(50) 31	C.albicans

وقد تم التوصل إلى هذه النتائج من خلال شكل مستعمرات خميرة *C.albicans* على وسط (CRA) ، إذ أن الخمائر المكونة للغشاء الحيوي تكون مستعمراتها سوداء اللون ذات مظهر كريستالي خشن (Strong) ، أو ذات لون أحمر نبيذي (Intermediate) ، وقد تكون المستعمرات ذات لون وردي فاتح مما يدل على أنها غير منتجة للغشاء الحيوي وتتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Saxna وجماعته (2014) عند استخدامهم طريقة أحمر الكونغو (CRA) في تكوين الغشاء الحيوي لخميرة الكانديدا حيث اشاروا إلى أن (52.2 %) من مجموع خميرة *C.albicans* هي غير منتجة للغشاء الحيوي في حين أن (41.8 %) هي منتجة للغشاء الحيوي (Strong % 9.5 , Intermediate % 90.5) ، وقد يعزى التغير في لون المستعمرات بهذه الطريقة والذي يحدث في المراحل الاخيرة من مدة الحضانة إلى وجود نواتج ابيضية ثانوية ، وكذا يوصف استخدام السكرور أو الكلوكوز 5 % بانه عامل اساسي لتحديد انتاج السكريات الخارجية المتعددة Exopolysaarides باستخدام اوساط غذائية غنية . (Oliveira and Cunha , 2010 ; Freeman , et .al ., 1989) ، وقد يكون التغير اللوني سببه ارتباط صبغة الكونغو الاحمر بشكل مباشر بمتعدد سكريات معين مكونة معقدات ملونة (Hassan , et .al ., 2011).



صورة (4 - 8) الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* على وسط آكار احمر الكونغو
Congo red agar(CRA)

3-4 : حساسية خميرة *C.albicans* للمستخلص الكحولي لقشور الرمان PGP

1-3-4- طريقة الانتشار بالحفز Well Diffusion Method

يوضح الجدول (4-5) معدلات الاقطار التثبيطية Inhibition Zone Diameters (IZD) مقاسة بوحدات (mm) المليمتر للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) ضد خميرة *C.albicans* ، وكذا بينت النتائج أن معدلات المناطق التثبيطية تتراوح ما بين (9 - 22) مليمتر مما يدل على انخفاض معنوي $P \leq 0.05$ في اعداد خلايا خميرة *C.albicans* مقارنة بالسيطرة (النيستاتين وكحول الاثيل) وهذا يدل على أن جميع عزلات خميرة *C.albicans* حساسة للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) .

جدول (4-5) معدلات الاقطار التثبيطية (IZD) للمستخلص الكحولي لقشور الرمان
(PGP) ضد خميرة *C.albicans* بطريقة الانتشار بالحفر .

معدلات الاقطار التثبيطية (mm)	التراكيز بوحدات ملغم / مل
22	150
19.33	100
15.5	50
13.97	25
9	12.5
8.67	Control ⁺ (Nys .)
5.33	Control ⁻ (Chol)

قيمة: $1.9271=(0.5)L.S.D$

Nys. : المضاد الفطري النيسنتاتين Nystatin 100.000 وحدة دولية .

Cohol : كحول الايثيل بتركيز 70 % .

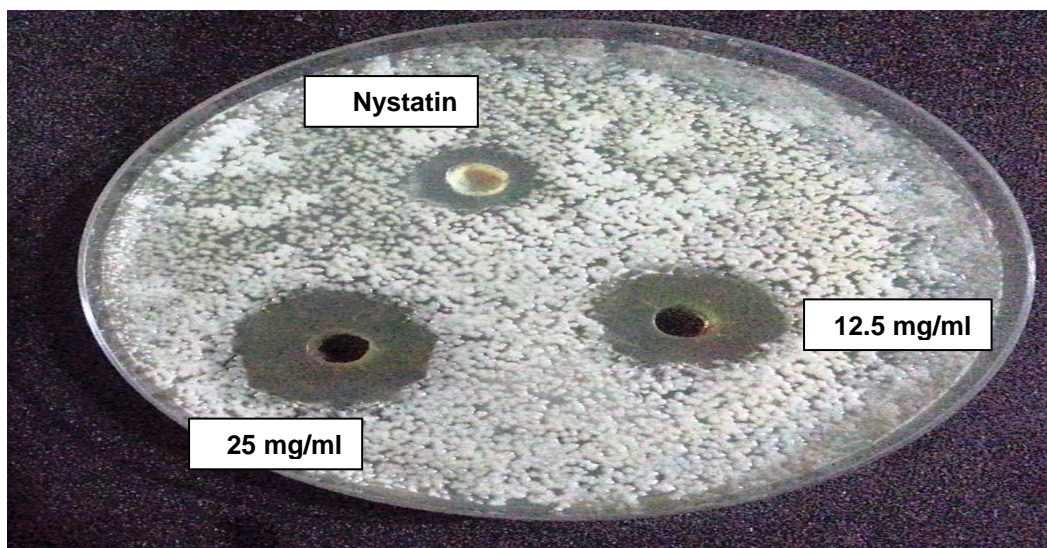
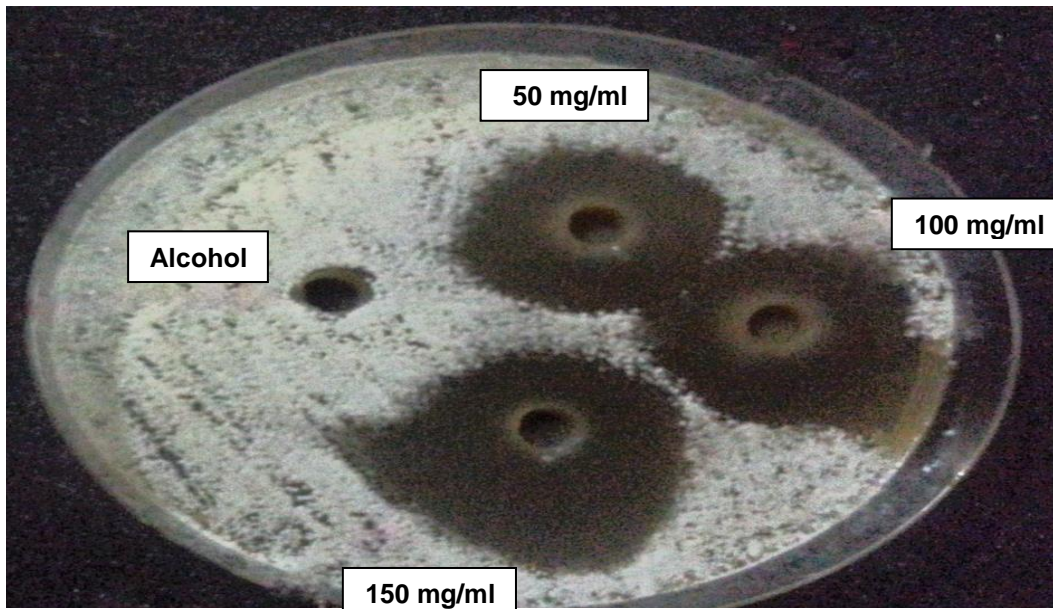
L.S.D : اقل فرق معنوي Least Significant Difference

0.05 : مستوى معنوية $P \leq 0.05$.

اعطت التراكيز (12.5 , 25 , 50 , 100 , 150) ملغم / مل معدلات الاقطار
التثبيطية (9 , 13.97 , 15.5 , 19.33 , 22) على الترتيب .

ونستنتج من ذلك أنه كلما زاد تركيز المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP)
كلما كبر قطر المنطقة التثبيطية , مما يدل على التأثير الطردني الفعال للمستخلص الكحولي
لقشور الرمان كمنشط لخميرة *C.albicans* , وهذه النتائج تتفق مع نتائج Pai وجماعته
(2011) في الحصول على اقطار تثبيطية بمعدل (16 , 19 , 21 , 25 , 28) ملليمتر
للتراكيز (1% , 3% , 5% , 7% , 9%) على التوالي أي كلما زاد التركيز زاد معدل

الاقطار التثبيطية , وكذا اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل إليها (2003) , Vasconcelos ,et .al في أن المستخلص الكحولي لقشور الرمان هو المضاد الفطري الامثل ضد خميرة *C.albicans* , في حين أن النتائج التي تم التوصل إليها مخالفة لما توصل إليه Abdallahzadeh وجماعته (2010) حيث بينوا بأنه لا يوجد تأثير مثبت للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خميرة *C.albicans* فقد كانت معدلات الاقطار التثبيطية (6 , 6.5 , 6.5) ملليمتر للتراكيز (4 , 8 , 12) ملغم / مل على التوالي وقد عزا ذلك إلى أن التأثير الميكانيكي للتانينات الموجودة في الرمان غير واضحة وأن فعاليتها يمكن أن يكون لها علاقة بسميتها أو قابلية الدواء القابضة أو التركيب الجزيئي لها.



صورة (9-4) الاقطار التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خلايا خميرة *C.albicans*

وتعود كفاءة المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) التثبيطية لخلايا خميرة *C.albicans* إلى احتواء قشور الرمان على مركبات فعالة عديدة لها دور مضاد للميكروبات (البكتريا والفطريات) . (Ahmed ,etal .2012) ، ويمكن أن يكون السبب في التأثير التثبيطي لقشور الرمان إلى انها تحتوي على مركبات متعدد الفينولات Polyphenols التي من الممكن أن تتداخل مع خلايا خميرة *C.albicans* الا أن التراكيز المطلوبة لأثبتات فعاليتها التثبيطية للفطريات داخل الخلايا غير معروفة . (Cushnie and Lamb , 2005 ; Havesteen , 2002) ، وكذا أن للفينولات القدرة على اقتناص الايونات المعدنية اللازمة لنمو الفطريات بواسطة Metalloproteases وخاصة ايون الحديد Fe^{+2} . (Yardano, . Fe⁺² , 2008) ، بالإضافة إلى قدرتها على تغيير صلابة الغشاء الخلوي لتتمكن هذه الجزئيات من الدخول إلى الطبقة الدهنية الثنائية للجدار الخلوي للفطريات (Saija ,et .al . 1995) ، وحال دخولها ستسبب تغيراً في نفاذية الجدار الخلوي للأيونات مؤدية إلى موت الخلية . (Cushnie and Lamb, 2005) ، ومن المحتمل أن يكون التأثير التثبيطي للفينولات من خلال امتصاصها بواسطة الغشاء الخلوي ، التفاعل مع الانزيمات والايونات المعدنية . (Lamer , et .al ., 2008) ، كما أن التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لقشور الرمان يمكن أن يعود إلى احتواء القشور على مركبات Punicalains و Ellagitannin حيث اظهرت قدرتها على قنص الحديد المحفز لتفاعلات الأكسدة داخل الخلية المايكروبية (Endo, et .al ., 2010 ; Kulkarni , et . al .,2007) وللتانينات التي تحتويها قشور الرمان أثراً في ترسيب البروتينات الموجودة في الجدار الخلوي للأنواع المختلفة لخميرة الكانديدا *Candida spp.* ، بالإضافة إلى قدرتها على زعزعة الاستقرار في الساييتوبلازم والغشاء البلازمي وتثبيط الانزيمات الخارج خلوية الضرورية للأبيض الخلوي والنقص الحاصل في المواد الغذائية اللازمة لنمو الميكروبات ما هي الا بعض الميكانيكيات التي تبين قدرة مركبات التانينات للقضاء على مختلف انواع المسببات المرضية (Puupponen – Pimia ,et .al .,2004 ; Vasconcelos , et . al ., 2003 ; Ikigai ,etal .,1993) .

2-3-4- تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلص الكحولي لقشور الرمان
(PGP) ضد خميرة *C.albicans*

استخدمت مجموعة التراكيز (3.123 , 6.25 , 12.5 , 25 , 50 , 100 , 150)
ملغم / مل لحساب MIC بطريقة Micordilution Methed , وكان التركيز (12.5)
ملغم / مل هو اقل تركيز مثبط لخلايا خميرة *C.albicans* . (جدول 4 - 7)

جدول (4 - 6) : التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خميرة

C.albicans

نمو الخميرة	التركيز ملغم / مل
+	3.125
+	6.25
-	12.5
-	25
-	50
-	100
-	150

+ : تعني وجود نمو .

- : تعني عدم وجود نمو .

توافقت هذه النتائج (El- Kichaoi , et al., (2015) حيث سجلوا تركيز مثبط ادنى للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (12.5) ملغم / مل، وكذلك توافقت مع Adwan and (2008) , Mhanna , اللذين اوضحا بأن نتائج المستخلص النباتي الخام يحتوي على العدد من المركبات الفعالة التي تعمل على تثبيط الفطريات والبكتريا من خلال ميكانيكيات مختلفة , وكذا أن النواتج الايضية المختلفة في النبات مثل كاروتينات , و فلافونات , و فيتامينات , وقلويدات , والصبغات لها تأثير حيوي وربما تمتلك آليات مقاومة مثل تثبيط الفعالية الانزيمية ,

تحويل المواقع الفعالة وتقليل تراكم المواد بين الخلية . (Abeyasinghe and Weeraddana , 2011)

إن انخفاض القيمة الخاصة بتركيز (MIC) للمستخلص النباتي يشير إلى مدى الفعالية العالية للمستخلص النباتي ضد خميرة *C.albicans* وهذا ما أكده (Fabry , et al ., 1998) . إن احتواء قشور الرمان على تراكيز عالية من مركبات (Punicalagin بالإضافة إلى التانينات مثل Pedunculagin و Tellimagrandin و Gallagyldilacton و Panicalin) تجعل من الرمان مضادا فطريا فعالا ضد انواع خميرة الكانديدا *Candida spp.* , فقد اظهر المستخلص الايثانولي لقشور الرمان تداخلا مع تركيب خلية الخميرة مما ادى إلى تغير في الجدار الخلوي الذي اصبح اكثر سمكا ومشوه مع تغير في الغشاء البلازمي . (Anibal , et al ., 2012) , وافترض Scalbert , (1991) آليات مختلفة لتوضيح فعالية التانينات ضد المايكروبات التي تضمنت تثبيط الانزيمات , تقليل من المواد الغذائية والايونات المعدنية اللازمة لنمو المايكروبات وتثبيط عملية الفسفرة التأكسدية ومن ثم تثبيط عمليات الايض الخلوي , في حين افترض (1996) Haslam بإمكانية التانينات من تكوين معقدات مع جزئيات اخرى التي تتضمن الجزئيات الكبيرة مثل البروتينات والسكريات المتعددة .

بين (Anibal et al.(2012) تأثير المستخلص الايثانولي لقشور الرمان في تغيير شكل وتركيب خلايا أنواع خميرة الكانديدا *Candida spp.* بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح حيث اظهرت النتائج تغير في الخلايا بالإضافة إلى تثبيط تجميع الخلايا ونموها وقد ظهرت الخلايا المعاملة بالمستخلص النباتي بأنها ذات جدار خلوي غير منتظم مع مادة لزجة على اسطح الخلايا بالإضافة إلى تمزق وتفتت الهايفات ، كما يبدو الجدار الخلوي بأنه مكون من عدة طبقات، وسمك غير طبيعي في الحواجز بين الخلايا الام والبرعم كما أنه لا يوجد فصل واضح بين الخلايا . في حين بدت الخلايا غير المعاملة بالمستخلص بمظهر منتظم ومتجانس بالإضافة إلى حالات تبرعم طبيعية وخلايا وهايفات طبيعية مما يدل على أن المستخلص النباتي سبب اضرارا في تركيب خلايا الخميرة ، ومن ناحية اخرى فقد بينت بعض الدراسات تأثير مستخلص الرمان على عوامل الضراوة الخاصة بخميرة *C.albicans* ومنها الغشاء الحيوي فقد بين (Olivera,et al.(2013) الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي للرمان لخميرة *C.albicans* بالإضافة إلى تأثيره الكابح للغشاء الحيوي لتلك الخميرة عند

اجراء دراسة في تأثير بعض المستخلصات النباتية على الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* المتكون في اطقم الاسنان ، وقد عللوا سبب فعالية المستخلص إلى مركبات الفينولات التي يحتويها المستخلص والتانينات وتفاعل هذه المواد مع البروتينات الخاصة بهذه الكائنات الدقيقة ومن ثم جعلها خاملة وغير نشطة . (Naz , et al .,2007) ، واكد هذه الدراسة Endo,etal.(2012) في فعالية مستخلص فاكهة الرمان كمشبط لخلايا خميرة *C.albicans* ودوره الفعال في إزالة الغشاء الحيوي وذلك نتيجة احتوائه على مركبات Punicalangin ،للتانينات ايضًا اثرٌ فعال في تثبيط الانزيمات والبروتينات الموجودة في غشاء الخلية ، وتمتلك التانينات سمية للفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا وقد وجد أن التانينات المكثفة قد ترتبط بجدار الخلية وتمنع النمو من خلال تثبيط فعالية انزيم Protease (Jons , et al ., 1994) ، كما تقلل من قابلية الخلية المايكروبية على الالتصاق وتثبيط عمل الانزيمات الناقلة المحيطة بالخلية المايكروبية وتعمل ايضًا تكوين معقدات مع السكريات المتعددة . (Ya ,et al ., 1988) .

4-4 نقاوة وتركيز الحامض النووي المستخلص Total RNA

قيمت نقاوة الحامض النووي RNA الكلي المستخلص وتركيزه بواسطة جهاز الـ Nanodrope Spectrophotmeter ، وكانت نتائج التراكيز (Mean \pm SD) بوحدهات نانوغرام / مايكرو ng/ μ l وقدرت نقاوة الحامض النووي RNA المستخلص من خلال قياس النسبة بين الطول الموجي 260 إلى الطول الموجي 280 (A260 / A280) للحصول على التراكيز المطلوبة من RNA لإكمال عملية RT- PCR . (جدول 4 – 7) .

جدول (4-7): نقاوة الحامض النووي RNA وتركيزه لعزلات خميرة *C.albicans* باستخدام جهاز Nanodrope Spectrophotmeter وعلى طولين موجيين (280 - 260 نانومتر .

النقاوة A260 / A280 Mean \pm SD	التركيز (ng / μ l) Mean \pm SD	RNA الكلي لمجاميع التجربة
1.72 \pm 0.15	502.87 \pm 107.26	C
1.73 \pm 0.16	400.45 \pm 85.26	T1
1.65 \pm 0.19	332.35 \pm 59.30	T2
1.60 \pm 0.24	518.33 \pm 139.71	T3
1.57 \pm 0.30	336.27 \pm 66.53	T4
1.73 \pm 0.08	351.94 \pm 66.87	T5

5-4 التعبير الجيني للمورثة ALS_1 بطريقة العدد النسبي Relative quantification.

لحساب التعبير الجيني Gene expression للجين ALS_1 الذي له علاقة بتكوين الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* ، تم اجراء العدد النسبي باستخدام طريقة ($2^{-\Delta\Delta ct}$) المعتمدة على عملية التصحيح Normalization باستخدام الجين المحافظ ACT_1 ، وُحلت قيم الـ (CT) Cycler Threshold للجين الهدف ALS_1 باستخدام قيم الـ CT للجين المحافظ أو المعياري ACT_1 في كل معاملات التجربة ومجموعة السيطرة لأتمام عملية التصحيح في التعبير الجيني .

اظهرت مستويات التعبير الجيني للجين ALS_1 وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في عزلات المعاملة ومجموعة السيطرة ، حيث بينت نتائج التعبير الجيني للجين ALS_1 وجود انخفاض واضح (تنظيم منخفض down regulation) في كل من المعاملة الثانية T2 ، والمعاملة الثالثة T3 ، والمعاملة T4 ، والمعاملة الخامسة T5 ، في حين لم يلاحظ فرق معنوي للتعبير ($p \leq 0.05$) الجيني للجين ALS_1 في المعاملة الاولى T1 مقارنة مع نتيجة التغيير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبيراً جينياً بمقدار (1 fold change) حسب طريقة Livak . (جدول 4 - 8) .

جدول (8-4) التعبير الجيني للجين ALS_1 باستخدام طريقة ($2^{-\Delta\Delta CT}$ livak method) لخميرة *C.albicans*.

Mean \pm st.Error	Fold change $2^{-\Delta\Delta CT}$	$\Delta\Delta CT$	ΔCT control	ΔCT Test	CT ACT_1	CT ALS_1	تراكيز المعاملات ملغم/مل	رقم العزلة
0.851 \pm 0.41455	0.38	1.38	1.30	2.68	33.35	36.03	(12.5) T1	1
	0.69	0.54	1.30	1.84	33.35	35.66	(12.5) T1	2
	1.40	-0.49	1.30	0.81	33.18	33.99	(12.5) T1	3
	0.63	-0.66	1.30	1.96	33.23	35.19	(12.5) T1	4
	1.15	-0.20	1.30	1.10	33.15	34.24	(12.5) T1	5
0.640 \pm 0.51339	1.38	-0.47	1.30	0.83	33.33	34.16	(25) T2	1
	0.75	0.41	1.30	1.71	33.30	35.01	(25) T2	2
	0.15	2.72	1.30	4.02	33.21	37.23	(25) T2	3
	0.76	0.39	1.30	1.69	33.72	35.41	(25) T2	4
	0.15	2.76	1.30	4.06	33.17	37.23	(25) T2	5
0.394 \pm 0.06731	0.49	1.02	1.30	2.32	33.97	36.29	(50) T3	1
	0.39	1.36	1.30	2.66	33.62	36.28	(50) T3	2
	0.30	1.76	1.30	2.05	33.52	36.58	(50) T3	3
	0.40	1.32	1.30	2.62	32.73	35.35	(50) T3	4
	0.39	1.36	1.30	2.66	33.43	36.09	(50) T3	5
0.220 \pm 0.1064	0.17	2.59	1.30	3.89	33.23	37.12	(100) T4	1
	0.22	2.19	1.30	3.49	33.12	36.61	(100) T4	2
	0.11	3.20	1.30	4.50	33.25	37.75	(100) T4	3
	0.39	1.37	1.30	2.67	33.23	35.90	(100) T4	4
	0.27	1.91	1.30	3.20	32.95	36.15	(100) T4	5
0.021 \pm 0.01643	0.04	4.60	1.30	5.90	33.33	39.22	(150) T5	1
	0.04	4.70	1.30	6.00	33.44	39.44	(150) T5	2
	0.01	7.52	1.30	8.82	33.34	42.16	(150) T5	3
	0.01	7.02	1.30	8.32	33.74	42.06	(150) T5	4
	0.01	6.52	1.30	7.81	33.51	41.32	(150) T5	5
1.006 \pm 0.12779	0.89	0.16	1.30	1.46	33.04	34.50	Control	1
	1.14	-0.19	1.30	1.11	32.37	33.48	Control	2
	0.87	0.20	1.30	1.5	33.28	34.78	Control	3
	1.00	0.00	1.30	1.3	33.48	34.78	Control	4
	1.13	-0.18	1.30	1.12	33.03	34.15	Control	5

T1 : المعاملة الاولى بتركيز 12.5 ملغم / مل من المستخلص الكحولي لقتور الرمان .

T2 : المعاملة الثانية بتركيز 25 ملغم / مل من المستخلص الكحولي لقتور الرمان .

T3 : المعاملة الثالثة بتركيز 50 ملغم / مل من المستخلص الكحولي لقتور الرمان .

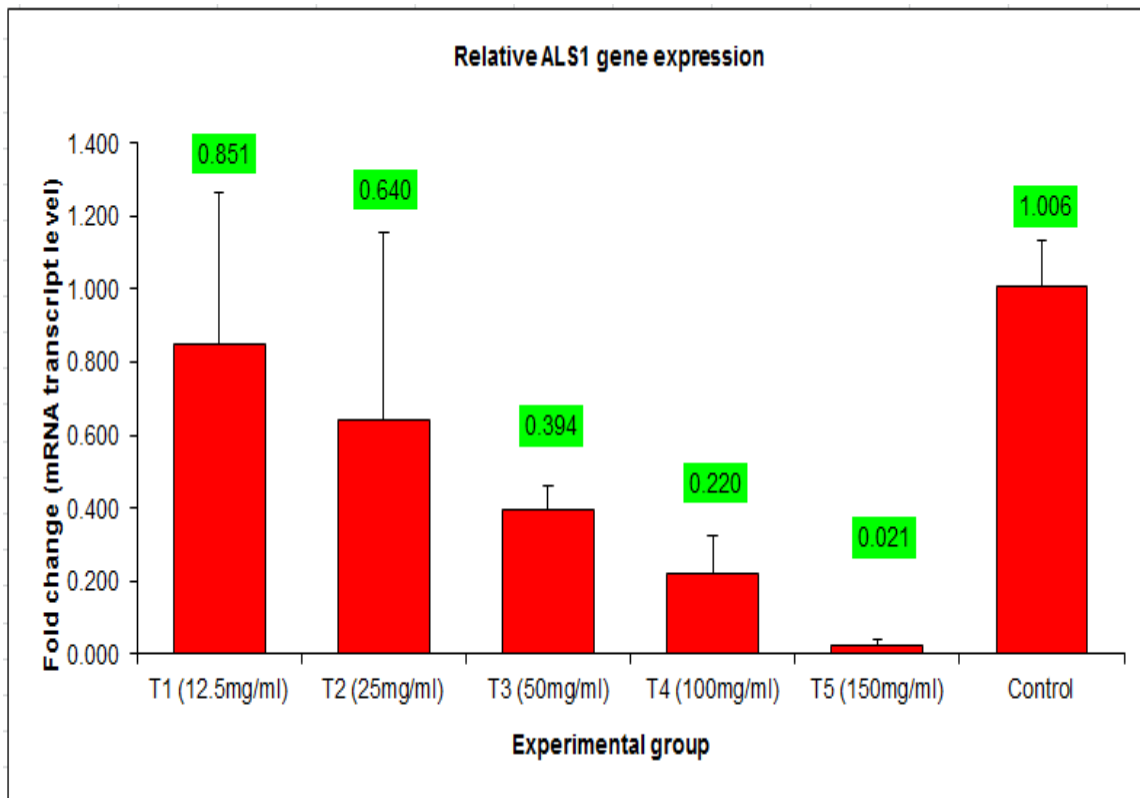
T4 : المعاملة الرابعة بتركيز 100 ملغم / مل من المستخلص الكحولي لقتور الرمان .

T5 : المعاملة الاولى بتركيز 150 ملغم / مل من المستخلص الكحولي لقتور الرمان .

CT ALS_1 عينة الدورة Cycle Thershold للجين الهدف ALS_1 في جهاز RT- PCR

CT ACT_1 عينة الدورة Cycle Thershold للجين المعياري ACT_1 في جهاز RT- PCR .

اظهرت نتائج التعبير الجيني للجين ALS_1 في المعاملة الثانية T2 (25 ملغم / مل) انخفاضاً downregulation بمقدار (0.640 ± 0.51339 fold change) وانخفضت المعاملة الثالثة T3 (50 ملغم / مل) بمقدار (0.394 ± 0.06731 fold change) ، وانخفضت المعاملة الرابعة T4 (100 ملغم / مل) بمقدار (0.220 ± 0.1064 fold change) ، وانخفضت المعاملة الخامسة T5 (150 ملغم / مل) بمقدار (0.021 ± 0.01643 fold change) ، بالمقارنة مع عينة السيطرة التي كان مستوى التعبير الجيني ALS_1 مرتفعاً upregulation بمقدار (1.006 ± 0.12779 fold change) ، من ناحية اخرى فإن التعبير الجيني للجين ALS_1 في المعاملة الاولى T1 (12.5 ملغم / مل) كان بمقدار (0.851 ± 0.41455 fold change) وهذا المستوى لا يدل على أن هنالك فرقا معنويا في التعبير الجيني بالمقارنة مع مستوى التعبير الجيني لعينة السيطرة ، واطهر الشكل البياني (4 - 2) للتعبير الجيني النسبي للجين ALS_1 وجود فرق معنوي بين معاملات التجربة (T5 , T4 , T3 , T2) ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$ ، في حين اشار إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملة (T1) ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال $P \leq 0.05$.



شكل (4 - 1) الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي للجين ALS_1 في معاملات التجربة ومجموع السيطرة

اظهرت نتائج التعبير الجيني للجين ALS_1 الخاص بخميرة *C.albicans* أن التركيز (12.5 ملغم / مل من المستخلص الكحولي لقشور الرمان لم يؤثر على مستوى تعبير الجين ALS_1 ومن ثم فهو لن يؤثر على عملية تكوين الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* ، في حين أن التركيز (25 ملغم / مل) من المستخلص الكحولي لقشور الرمان اظهر تأثيرًا واضحًا على مستوى التعبير الجيني للجين ALS_1 مقارنة مع السيطرة مما يشير إلى أن التركيز المثبط الأدنى (MIC) للغشاء الحيوي هو التركيز (25 ملغم / مل) من المستخلص الكحولي لقشور الرمان ، وعند المقارنة مع التركيز المثبط الأدنى (MIC) لخلايا خميرة *C.albicans* نلاحظ بان (MIC) لخلايا الخميرة كان بتركيز (12.5 ملغم / مل) واتفقت هذه النتائج مع النتائج التي توصل اليها (Jayant,etal.(2013) من حيث أن التركيز المثبط الأدنى (MIC) للغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* هو التركيز الثاني ، حيث اشاروا الى ان (MIC) من الكافيين Caffeine المستخلص من نبات الشاي والقهوة ضد خلايا خميرة *C.albicans* هو (12.5mM)، وان (MIC) للغشاء الحيوي هو (25mM) من الكافيين المستخلص، وتحتوي قشور الرمان على مادة الكافيين التي تعد من الفلويديات بتركيز (1.137) ملغم / مل من المستخلص الكحولي لقشور الرمان (Elsherbiny , et al .2016) حيث يساهم الكافيين في تغيير تركيب خلايا خميرة *C.albicans* (Mittag , 1994) ، وأن فعالية الكافيين تشبه فعالية العقار rapamycin في تأثيره على مسار (Target of Rapamycin (TOR) بروتين الكاينيز Protein Kinase المنظم لنشاط الخلايا بضمنها النمو والايض ، تكوين الخيوط ، تجمع والتصاق خلية مع خلية اخرى في الخمائر استجابة لمحفزات بيئية ، فمن المحتمل أن يظهر تأثير الكافيين من خلال تحويل مسار TOR . Homam . Bastidas ,etal.,2009 ; (Bastidas ,etal.,2009 ; Homam . TOR .,et al., 2009)

وكذا اشارت نتائج التعبير الجيني للجين ALS_1 الى أنه كلما زاد التركيز للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (50 ، 100 ، 150) ملغم / مل لكل من المعاملات (T3 ، T4 ، T5) على التوالي ، زاد انخفاض مستوى التعبير الجيني للجين ALS_1 ، مما يدل على كفاءة مستخلص قشور الرمان وفعاليتها العالية كمضاد للغشاء الحيوي - Anti biofilm ، وتوافقت هذه النتائج مع (Bakkiyaraj,etal.,(2013) في فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان كمضاد للغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* ، كما اتفقت هذه النتائج

مع النتائج التي توصل إليها (Oliveira,etal.,(2013). ولعل التأثير المثبط للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) يعود إلى تثبيط تكوين الانبوب الجرثومي الذي يعد من عوامل الضراوة المهمة لهذه الخميرة (Buschart ,etal., 2012) ، وعرقلة تكوين الغشاء الحيوي الاولي سواء بوجود المغذيات (الوسط + المستخلص) أو بعدم وجود المغذيات (المستخلص فقط بدون وسط) . (Cerda,et al.m 2003) ، فقد بينت الدراسات أن الغشاء الحيوي يكون ذا مقاومة عالية ضد المثبطات في الظروف التي تكون فيها المغذيات محدودة أو معدومة في حين أن الغشاء الحيوي يتأثر بنفس المثبطات تحت ظروف التشبع بالمغذيات (Maeda , et . al., 2012) ، إن ميكانيكية تثبيط الغشاء الحيوي بواسطة المستخلص (PGP) لا تزال غير معروفة فقد اشارت بعض الدراسات إلى قابلية المستخلص على ترسيب البروتينات وتثبيط الانزيمات . (Naz ,etal.,2007; Fan,etal.,2008) وأن احتواء قشور الرمان على تراكيز عالية من ellagic acid ومركبات التانينات يمكن أن تغير من الشحنة في السطح ومن ثم تتفاعل مع المكونات الخلوية الداخلية وتتفاعل مع عملية تكوين الغشاء الحيوي (Liu,et al., 2008) ، حيث تعمل التانينات على تثبيط الانزيمات والبروتينات الموجودة في غشاء الخلية . (Greulach , 1973) ، وتمتلك التانينات للفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا ، فقد وجد أن التانينات المكثفة قد ترتبط بجدار الخلية وتمنع النمو من خلال تثبيط فعالية انزيم الـ Portease . (Jones ,etal.,1994) ، كما تقلل من قابلية الخلية الميكروبية على الالتصاق وتثبيط على الانزيمات الناقلة المحيطة بالخلية الميكروبية وتعمل ايضاً على تكوين معقدات مع السكريات المتعددة . (Ya ,et al. , 1988)

من ناحية اخرى فإن للفينولات المتوافرة في قشور الرمان اثرا في تثبيط الانزيمات بوصفها مركبات مؤكسدة ، ومن المحتمل انها تتفاعل مع مجموعة السلفاهيدريل الـ (SH) أو من خلال الكثير من التفاعلات غير المتخصصة مع البروتينات (Masson and Wasserman , 1987) ، إذ تؤثر بشكل كبير في تغيير طبيعة البروتينات والاضرار بالأغشية من خلال ارتباطها بالمواقع الفعالة للأنزيمات الخلوية بواسطة مجاميع الهيدروكسيل فيها التي لها القدرة على تشكيل اواصر هيدروجينية مع تلك المواقع اكثر من المادة الاساس (Pelezar, et al., 1986)، ومن ثم قد تثبط واحداً أو اكثر من التفاعلات الايضية الضرورية التي تسيطر عليها تلك الانزيمات مما يؤثر على الخلية المايكروبية ، ومن المحتمل أن تكون للمركبات الفلافونية Flavonoids اثراً في جعل

المستخلص النباتي ذا كفاءة في فعاليته المضادة للغشاء الحيوية/خميرة *C.albicans* ، وذلك نتيجة لامتلاك هذه المركبات القدرة على تثبيط بروتينات الالتصاق والبروتينات الناقلة وإلحاق الضرر في غشاء الخلية الميكروبية . (Alavarce , et al ., 2015) .

وقد اقترح (Alavarce,etal.,(2015) احدى الفرضيات المحتملة لتفسير التأثير المضاد للغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* بواسطة المستخلص الكحولي لنبات *Equisetum giganteum L.* في امكانية الاعتماد على الاس الهيدروجيني للغشاء الحيوي حيث يتكون الغشاء الحيوي في اس هيدروجيني متعادل neutral PH لكن يمكن التغير في قيمة PH عند إضافة المستخلص النباتي ، فقد يكون PH عاليا جداً أو منخفضاً جداً (قاعدي أو حامضي) يمكن أن يصاحبه تغيرات في الايض الخلوي للميكروبات وخصائص السطح وبالتالي سوف يحصل تداخل في عملية الالتصاق لأسطح المضيف (Bott , 1995) ، فعلى سبيل المثال فإن محلول هايپوكلورايت Hypochlorite Solution ينتج PH قاعدي (PH > 11) وبذلك يزيد من التنافر الكهربائي بين خلايا الخميرة وسطح مادة طقم الاسنان ومن ثم سوف يؤدي إلى إزالة خلايا الغشاء الخلوي وحلها . (Fukuzaki , 2006) .

اشارت الدراسات إلى وجود العديد من الجينات التي لها علاقة وثيقة بتكوين الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicans* من هذه الجينات (HWP) Hyphal Wall Protein و Secreted Aspartyl Protease (ASP) والجين Phospholipase B(PLB) والجين Lipease (Lip) بالإضافة إلى الجين Agglutinin – Like Sequence (ALS) (ALS₁ → ALS₉) . (Nailis , et . al ., 2010) .

وإن سبب اختيارنا للجين ALS₁ للدراسة الحالية لعلاقته في تشفير بروتينات الجدار الخلوي التي تسهم في عملية التصاق خميرة *C.albicans* إلى سطح المضيف . (Hoyer,2001) ، ولأن التعبير الجيني للجين ALS₁ عالي up regulation في جميع أنماط أو طرائق تنمية الغشاء الخلوي . (Nailis,et al ., 2010) ، حيث بين O'Connor,etal.,(2004) أن مستوى التعبير الجيني للجين ALS₁ عالي up regulation خلال تكوين الغشاء الحيوي .

وإن نتائج الدراسة الحالية في التعبير الجيني العالي للجين ALS₁ في عينة السيطرة (1.006 ± 0.12779 fold change) توافقت مع نتائج O'Connor,etal.,(2004)

كما أن هذه النتيجة توافقت مع نتائج Nailis, *etal.*, (2010) في أن الجين ALS_1 يظهر تعبيرًا جينيًا عاليًا في جميع طرائق تنمية الغشاء الحيوي لخميرة *C. albicans* , وكانت هذه النتيجة مخالفة لما توصل إليه Marchais, *etal.*, (2005) حيث بينوا أن التعبير الجيني للجين ALS_1 ليس عاليًا وعللوا بأن السبب في هذه النتيجة أن مدة الحضانة كانت قصيرة بينما يتطلب تكوين الغشاء الحيوي للفطريات مدة حضانة أطول (48 – 72) ساعة .

ومن المحتمل أن يعزى انخفاض التعبير الجيني للجين ALS_1 في معاملات التجربة (, T2 , T3 , T4 , T5) إلى تثبيط فعالية الانزيمات التي لها دور مهم في امراضية خميرة *C. albicans* (بحوالي 80 %) بفعل المركبات الفينولية الموجودة في المستخلص الكحولي لقشور الرمان ، وتتضمن هذه الانزيمات (*PLB*) Phosphalipase B ، Lipase ، *Lip*) وانزيم (*SAP*) Secreted Aspartyl Protease ، وتتحكم في هذه الانزيمات الجينات (*SAP* , *Lip* , *PLB*) على التوالي (Yardanov , *et al.* , 2008) حيث يسهم كل من انزيم (*Lip*) وانزيم (*SAP*) في هضم وتحطيم انسجة المضيف وتقوم الهايفات بإفراز هذين الانزيمين . (Hube and Nag like , 2001) أما انزيم *PLB* فله دور مهم في اختراق الانسجة الطلائية للمضيف . (Yardanov, *etal.*, 2008) ,

من التفسير اعلاه ومن خلال نتائج الدراسة الحالية يمكن ان نفترض بأن انخفاض مستوى الجين (ALS_1) يعود إلى تثبيط فعالية هذه الانزيمات مما يؤدي إلى عدم قدرة خميرة *C. albicans* على اختراق انسجة المضيف ومن ثم يمنع حدوث عملية الالتصاق والتي تتوسطها عملية تشفير لبروتينات الجدار الخلوي بواسطة الجينات الخاصة (*HWP* , *ALS*) وعدم تكون الغشاء الحيوي , حيث يظهر الجين (ALS_1) تعبيرًا عاليًا في الغشاء الحيوي . (Nailis , *et .al.* , 2006) .

من ناحية اخرى فإن المركبات الفينولية يمكن أن تثبط عملية بناء DNA وبناء RNA ، فالتركيب الكيميائي للفينولات بإمكانه تحطيم الاصرة الهيدروجينية بين مكونات DNA والتداخل مع DNA . (Webb and Ebeler , 2004) , ويمكن أن يقود ذلك إلى انشقاق DNA وبذلك تثبيط عملية الاستنساخ في خلايا الكانديدا . (Cushnie , *etal.* , 2005) .

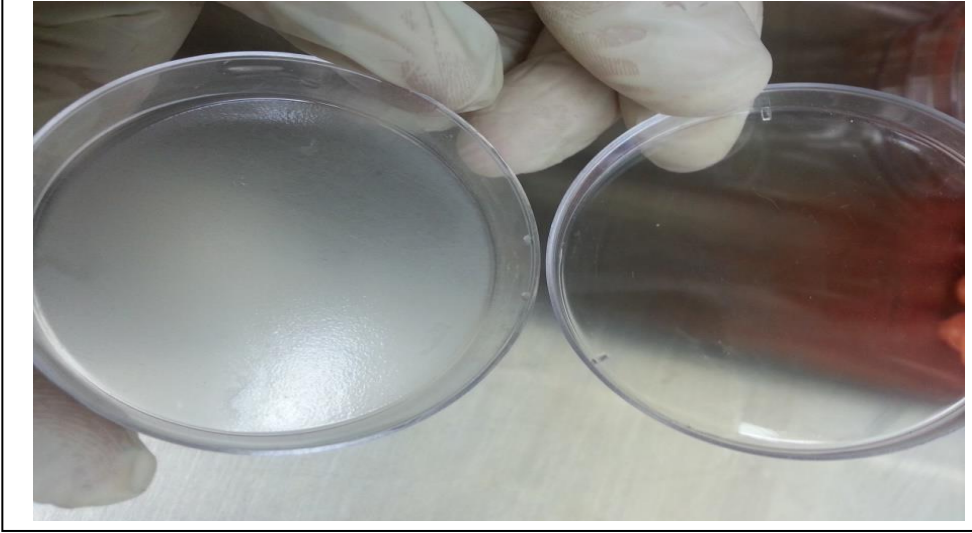
إن المركبات (التانينات و gallic acid) الموجودة في قشور الرمان يمكن أن تلعب دورًا مهمًا في تثبيط جزئيات (QS) Quorum – Sensing . (O'May and

(Farnesol تراكم جزئيات Tufenkji, 2011, Sarabhai, et al., 2013) , حيث يؤدي تراكم جزئيات Farnesol التي لها دور في تنظيم نظام (QS) إلى تثبيط تكوين الغشاء الحيوي , وحالما يصل تركيز Farnesol إلى حد معين فإن خلايا الخميرة المتبرعمة في الغشاء الحيوي الناضج لا تكون الانبوب الجرثومي وبالتالي لا تتكون الخيوط الفطرية التي لها علاقة وثيقة بتكوين الغشاء الحيوي , وكذا فإن الخلايا الجديدة تصبح ليس لديها القدرة على تكوين الانبوب الجرثومي والخيوط الفطرية , ومن ناحية اخرى فإن جزئيات Farnesol لها دور في تنظيم التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي وأن تراكم Farnesol بتركيز عالية في الوسط الغذائي أدى إلى انخفاض مستوى التعبير الجيني للجين (HWP) الذي يشفر بروتينات الجدار الخلوي للهايفات في الغشاء الحيوي الناضج (48 ساعة) . (Ramag , et al . , 2002) .

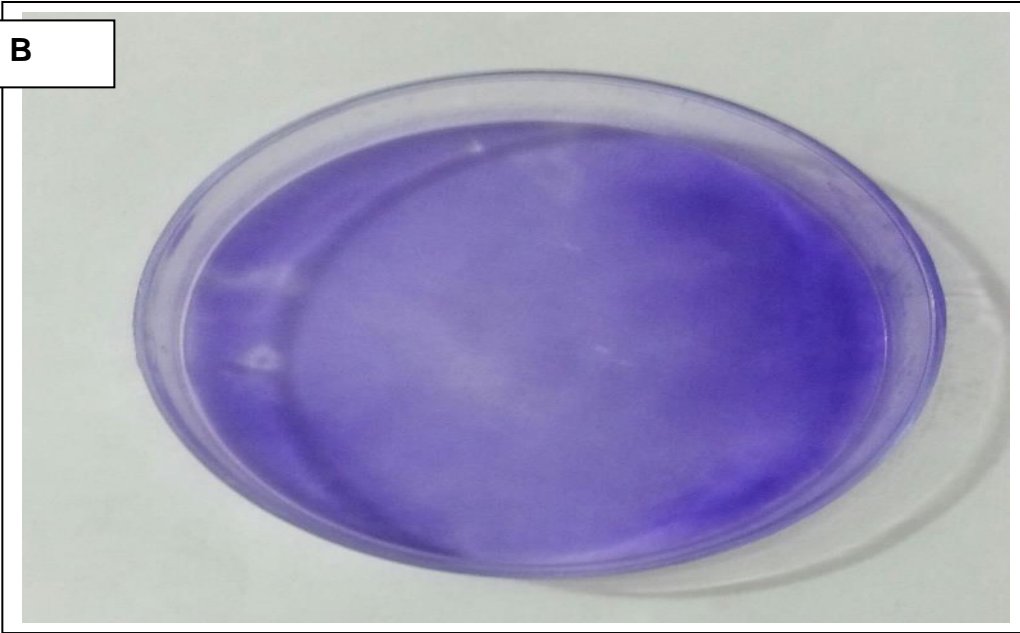
من خلال هذه الدراسة يمكن أن نفترض ان سبب انخفاض مستوى التعبير الجيني للجين (ALS₁) هو تراكم جزئيات Farnesol بفعل المركبات الفعالة الموجودة في المستخلص الكحولي لقشور الرمان حيث أن التراكيز العالية لجزئيات Farnesol يثبط من عملية تكوين الخيوط الفطرية بسبب عدم تكوين الانبوب الجرثومي بواسطة الخلايا مما يسبب عدم حدوث عملية الالتصاق التي تتخللها عملية تشفير بروتينات الجدار الخلوي بواسطة الجينات المسؤولة عن ذلك ALS , HWP , ومن ثم عدم قدرة خميرة *C.albicans* على الالتصاق واحداث الامراضية .

بين (Tsang, et al., 2012) التأثير المثبط للمركب Purpurin على الغشاء الخلوي لخميرة *C.albicans* وتكون الهايفات من خلال تقنية qRt – PCR , فقد اشاروا إلى انخفاض التعبير الجيني للجينات التي تدخل في تكوين الغشاء الحيوي (ALS₃, ECE1, HWP1 , HYR1) , وانخفاض التعبير الجيني للجين المنظم للهايفا (RAS1) حيث يقوم هنا الجين بتنشيط المسار (The cyclic AMP – Protein Kinase (CAMP – PKA) ومسار (MAPK) Cek 1 Mitogen – activated protein Kinase اللذين ينظمان ارتباط بروتينات الجدار الخلوي , وعند معاملة خميرة *C.albicans* بالمركب Purpurin فإنه يعمل على تثبيط عملية التشكل في خميرة الكانديدا مسببة تشوه في تشكيل الغشاء الحيوي .

A



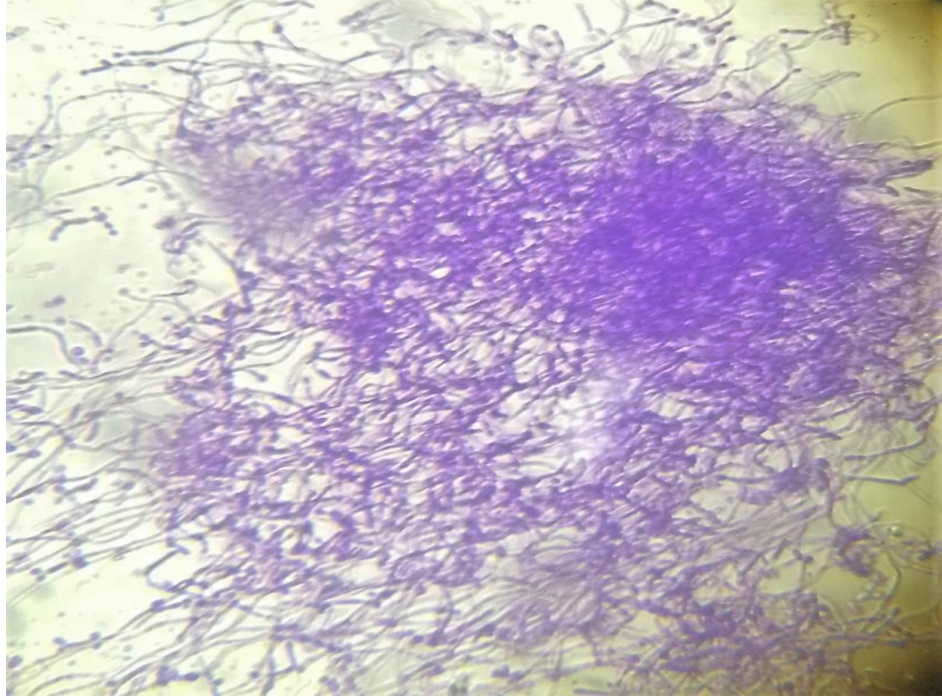
B



صورة (10-4) A تكوين الغشاء الحيوي في اطباق بتري قطر 6 سم

الغشاء الحيوي مصبغ بصبغة البنفسج البلوري Crystal violet

B



صورة(4-11)الغشاء الحيوي بقوة تكبير 40X ومصبغ بصبغة البنفسج البلوري

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion and Recommendation

الاستنتاجات والتوصيات Conclusion and Recommendation

الاستنتاجات Conclusion

- 1- نستنتج من الدراسة الحالية أن خميرة *C.albicans* المعزولة من منطقة الفم وما حول الاسنان هي اكثر انواع الكانديدا انتشارًا .
- 2- أن المستخلص الكحولي لقشور الرمان ذو فعالية عالية وتأثير مثبت عالي ضد خميرة *C.albicans* .
- 3- المستخلص الكحولي لقشور الرمان له تأثير مثبت للغشاء الحيوي Biofilm أحد عوامل الضراوة المهمة التي لها علاقة بإمراضية خميرة *C.albicans* الذي يزيد من مقاومتها للمضادات الفطرية التقليدية . من خلال تأثيره المثبط للجين المشفر لبروتينات الجدار الخلوي *ALS1* الذي اظهر انخفاضاً في مستوى التعبير الجيني لهذا الجين.

التوصيات Recommendation

- 1- دراسة المكونات الكيميائية الداخلة في تركيب قشور الرمان وعزل المركب الفعال .
- 2- اختبار تأثير المادة الفعالة في قشور الرمان على جينات لها علاقة بعوامل الضراوة لخميرة الكانديدا .
- 3- البحث في إمكانية دمج مستخلص قشور الرمان مع مستخلص نبات آخر كي تكون الفعالية مضاعفة .
- 4- اختبار فعالية مستخلص قشور الرمان داخل الجسم الحي .
- 5- استخدام مستخلص الرمان كعلاج دوائي بعد دمج مع غسول الفم ومعاجين الاسنان لمعالجة مختلف امراض الفم باستخدام تقنية النانوبايوتكنولوجي .

المصادر

Reference

1- المصادر العربية

- الموسوي , علياء موسى علي (2006) . عزل وتشخيص بعض البكتريا والخمائر المرافقة لبعض امراض الفم في مدينة الناصرية واختبار حساسيتها الدوائية . رسالة ماجستير / كلية التربية / جامعة ذي قار .
- الدعيمي , علاء عبد الحسين كريم (2014) . تنقية وتوصيف حامض الكوجك المنتج من عزلتين محليتين (*Aspergillus flavus* و *Aspergillus fumigates*) اطروحة دكتوراه , كلية التربية , جامعة القادسية .

- Abeyasinghe , P.and Weeraddana , D. (2000) . Screening of Petroleum ether , chloroform , E thy lacetate , Ethanol and water Extracts of Medicinal plant . Avicenna marine for Antibacterial Activity against Antibiotic Resistance Bacteria species *staphylococcus* and *Proteus* .*J. Pharm . Biomed .Scill* (18) : 2230 - 7885 .
- Abdel Motaal , A. and sheriff , S. (2011) .Anticanser and antioxidant Activities of standardized whole Fruit , Pulp , and Peel Extract of Egyptian Pomegranate . *Open . Conf . Proc . J. 2* : 41 – 45.
- Abdollahzadeh , S. ; Mashouf , R. ; Mortazavi , H. ; Moghaddam , M. ; Roozbahani , N. and Vahedi , M. (2011) .*J. Den . Techrn University of Med . Sci .* 8 (1)
- Adwan , G. and Mhanna , M. (2008) . Synergistic effects of Plant extracts and antibiotics on *staphylococcus aureus* strains isolated from Clinical specimens . Middle - East *J . Sci . Res.* 3 (3) : 134 -139 .
- Ahmed,N.H. .;Abood,S.A and AL- Janabi,A.A.(2013).Antimicrobil Effect of Pomegranate peel Extract on some pathogenic Microorganisms.*Eng.and Tech.J.*31(3):316-324.
- AL-mohana , A.; Mahdi , O. and Ali , H. (2008) . Antibacterial activity of alcoholic extract of local Propolis against *Listeria mono cytogens* . *J. Anbar . For Vet . Sci .* 1 : 61 – 67 .
- Atlas,R.M.;Parks,L.C.and Brown,A.E.(1995).Labortary mannal of experimental microbiology. Mosby. Year book , InC . St . Louis . Baaltimor.

- AL-zoreky , N .S. (2009) . Antimicrobial activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit Peels . *Int. J. Food Microbiol.* 134 : 244-248 .
- Albuquerque , P. and Casadevall , A. (2012) . Quorum Sensing in fungi . *Rev. Med. Mycol.* 50 :337 – 345 .
- Alem, M.A. ; Oteef , M.D.; Flowers , T.H. and Douglas , L.J.(2006) . Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development . *Eukaryot Cell* . 5 : 1770 - 1779 .
- Alavarce , R.A.S. ; Saldanha L. L. ; Almeida , N. L. M.; Porto , V.C.; Dokkeda , A.L. and Lara, V.S. (2015) . the Beneficial Effect of *Equisetum giganteum L.* against *Candida* Biofilm Formation : New Approaches to Denture stomatitis. Evidence - Based Complement. *Alternat . Med.*
- Annous , B.; Fratamico , P. and Smith , J.L. (2009) . Quorum Sensing in biofilms : why bacteria behave the way they do . *J. Food Sci.* 74 (1) PP. 24 - 37 .
- Anibal, P.C.; activity Peixoto , I.T.A.; Foglio , M.A. and Hofling , J.F. (2012) . Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum L.* and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the Cells of *Candida SPP.* *Brazil. J microbial.* 44(3) : 839 – 848 .

- Ausubel , F.M.; Brent , R. ; Kingston , R.E.; Moore , D.D.; Seidman, G.; Smith ,J.A.and Struhl,K.(2003).Current Protocols in Molecular Biology .Jhon Wiley and Sons ,Inc.:4755.
- Bareje , C. (2010) . Medical mycology . In : Text book of microbiology for dental students . 3rd ed . *Delhi , Arya Publicat.* :322-323 .
- Bastidas , R.J.; Heitman , J. and Cardenas , M.E. (2009) . The protein kinase Tor1 regulates adhesion gene expression in *Candida albicans* – *Plos. Pathog* . 5 : e1000294 - 10 .
- Barry , A.; Bill , J.; Bromn , S.; Ellis , D.; Meis , J.; Pfaller , M.; Rennie , R.; Rinaldi , M.; Rogers , T. and Traczewski , M. (2003) . Quality Control limits for fluconazole disk susceptibility tests on Muller – Hinton agar with glucose and methylene blue. *J. Clin . Microbiol* .41 : 3410 – 3412 .
- Bartie , K.L.; Williams , D.W.; Wilson , M.J.; Potts , A.J. and Lewis , M.A.O. (2004) .Differential invasion of *Candida albicans* isolates in an in vitro model of oral candidiasis *Oral Microbiol. Immuol* . 19:293 – 296 .
- Bakkiyaraj , D.; Nandhini, J.R.; Malathy , B.and Pandian , S.K. (2013). The antibiofilm Potential of Pomogranate (*Punica granatum L.*) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofuling J. Bioahesion and biofim Res.* 29(8): 929-937.
- Bellmann, R.(2007) Clinical Pharmacokinetics of systemically administered antimy cotics.*curr. Clin .Pharmacol.* 2:37 -58 .
- Beightony , D.;Ludford , R.; Clark , D.T.; Brails ford , S.R.; Pankhurst, C.L.(1995). Use of Chromagar Candida medium

- for isolation of Yeasts from dental samples *J.Clin .Microbiol .* 33(1) :3025 – 3037 .
- Bhowmik , D.; Gopinath , H.; Kumar , B.P.; Duraivel , S.; Aravind , G. and Sampath Kumar , K.P.(2013). Medicinal Uses of *Punica granatum* and Its Health Benefits .*J.Pharm . Phytochem .* 1(5) : 2278 – 4136 .
- Bhat , V.; Sharma , S.M.; Shetty , V.; Shastry , C.S. and Rao, V.(2011) . Extracellular enzymes of *Candida albicans* and their role in development of denture stomatitis – *Rev . J. Ind. Acad. Dent . Spec.* 2 (1) : 26- 30 .
- Bllankenship , J.R. and Mitchell , A.P. (2006) . How to build a biofilm : a fungal perspective . *Curr. Opin . Micromacol .* 2:37-58.
- Bose, S.; Ghosh , A.K. and Barapatre , R.(2011) The incidence of Candiduria in an ICV - A study .*J. Clin. Dia. Res.* 5(2) : 227 - 230 .
- Bromn , G.D. (2001) . Innate Antifungal Immunity : The key Role of Phagocytes , *Bnnu .Rev. Immunol .* 29 (1) : 1 -21 .
- Burapadaja , S. and Bunchoo , A.(1995). Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrine* . *Planta . Medica.* 61 : 365 .
- Buschart, A.; Burakowska , A and Biliteski , U.(2012) . The fungicide fludioxonil antagonizes fluconazole activity in the human fungal pathogen *Candida albicans* .*J. Med. Microbiol.* 61:1696 - 1703 .
- Calderone , R.A. (2002) . In : Calderone , R.A. *Candida and Candidiasis .* 4th ed .(*ASM Press,Washington*) , Chap . 2, PP:15 -27.

- Carrillo - Munoz , A.J.; Giusiano , G.; Ezkurra , P.A. and Quindos , G.(2006) . Antifungal agents : Mode of action in Yeast Cells . 19(2):130-9 .
- Cerda , B.; Ceron , J. J.; Tomas – Barberan , F.A. and Espin, J.C.(2003). Repeated oral administration of high doses of the Pomegranate ellagitannin Punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J. Agric Food Chem* . 51 :3493 - 3501 .
- Chaffine , W.L.(2008) . *Candida albicans* Cell wall Proteins . *Microbiol .Mol. Biol. Rev.* 72: 495 – 544 .
- Chen , H.; Fujita , M.; Feng , Q.; Clardy , T. and Fink , G.R.(2004) . Tyrosol is aquorum sensing molecule in *Candida albicans* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 101: 5048 – 5052 .
- Costerton , J. W.; Stewart , P.S. and Greenberg , E.P.(1999).Bacterial biofilms : a common cause of Persistent infections *Sci.* 284(5418) : PP.1318 – 1322 .
- Chandra , J.; Kuhn , D. M.; Mukherjee , P. K.; Hoyer , L. L.; McCormick , T. and Ghannoum , M.A.(2001) .Biofilm formation by the fungal Pathogen *Candida albicans* : development , architecture , and drug resistance . *J. Bacteriol* . 183(18) : 5385 - 5394 .
- Collee , J. G.; Fraser ,A .G; Marmion , B. P. and Simmons , A. (1996). Prcatical medical Microbiolgy . 4th ed . *Chuchill Living stone* . V.K.
- Coretas, J.A.; Reyes , P.; Gomez , C.; Buitraga , G. and Leal , A.L.(2011). Fungal blood stream infections in tertiary care hospitals in Collombia . *Rev. Iberoam . Micol.* (88) : 74 - 80.

- Costerton , J. W.; Cheng , K. J.; Geesey , G.; Ladd, T. I.; Nickel , J. C.; Dasgupta , M. and Marrie , T. J.(1987). Bacterial biofilms in nature and Disease . *Annu. Rev. Microbiol* . 41 : 435 - 464 .
- Cushnie , T. P. T and Lamb , A. J. (2005) . Review : Antimicrobial activity of flavonoids . *Internet.J. Antimicrobial Agents*. 26:343-356.
- Das , A. K.; Mandal S. C.; Banerjee , S. K.; Sinha , S.; Das, J.; Saha, B. P. and Pal , M.(1999) studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *J. Ethenopharmacol* . 68 :205-208 .
- Dahham , S.S.; Ali , M.N.; Tabassum , H. and Khan , M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their Pomological and phytonutrient Characteristics . *Molecules* . 14:1808-1817 .
- Denning , D.W.(2003) . Echinocadin antifungal drugs . *Lancet*. 362:1142 - 1151.
- Dhanasekaran , D.; Vinothini , K.; Latha , S.; Thajuddin , N. and Panneerselvam , A.(2013) . Human dental biofilm : Screening, Characterization , in vitro biofilm formation and antifungal resistance of *Candida* SPP. *The Saudi J. Den. Res*. 5: 55 – 70 .
- Diezmann, S.; Cox, C. J.; ScHonion , G.; Vilgalys , R. J. and Mitchell, T. G.(2004) . phylogeny and evolution of Medical Species of *Candida* and related taxa : Amultigenic analysis . *J. Clin . Microbiol* . 42 : 5624 - 5235 .
- Donlan , R.M.(2002). Biofilms microbial life on surfaces *Emerging Infectious Diseases* . 8(9): PP 881 - 890 .

- Duman , A. D.; Ozgen , M.; Dayisoğlu , K. S.; Erbil , N.; Durgac , C.(2009). Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) Varieties and their relation to some of their Pomological and phytonutrient Characteristics . *Molecules*. 14:1808-1817.
- Elsherbiny, E. A.; Amin , B. H. and Baka , Z. A.(2016). Efficiency of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peels extracts as a high Potential natural tool towards Fusarium dry rot on Potato tubers . *Postharvest Biol.and Technol.* 111 : 256 – 263 .
- El-Kichaoi , A.; El-Hindi , M.; Mosleh , F. and Elbashiti , T. (2015). The Antimicrobial Effects of the Fruit Extracts of *Punica granatum* , *Actinidia deliciosa* and *Citrus maxima* on some Human Pathogenic Microorganisms . 3 (2) : 63 - 75 .
- Endo , E. H.; Cortez , D. A. G.; Ueda – Nakamura , T.; Nakamura , C.V. and Filho , B.P.D. (2010) . Potent Antifungal of Extracts and pure compound Isolated from Pomegranate peels and Synergism with Fluconazole against *Candida albicans* . *Res.Microbial* . 161(7):534-540.
- Endo , E. H.; Ueda – Nakamura , T.; Nakamura , C.V. and Filho , B.P.(2012). Activity of spray – dried microparticles Containing Pomegranate Peel extract against *Candida albicans* , *Molecules* . 17(9) : 10094 -107 .
- Fabry , W.; Okemo , P.O. and Asorg , R.(1998) . Antimicrobial activity of East African medicinal plants . *J. Ethnopharmacol* . 60(1):79-87.
- Fan, W.; Chi, Y.; and Zhang , S.(2008) . The use of a tea poly phenol dip to extend the shelf life of silver carp

- (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chem* .108: 148- 153 .
- Fenn, J.; Segal , H.; Barland , B.; Denton , D.; Whisenatant J. and Chun, H.(1994) . Comparison of updated Vitek Yeast biochemical card and API 20C Yeast identification system .*J.Clin. Microbiol.* 32:1184-7 .
- Fetrow , C. W. and Avila , J. R.(2000). *Medicina Alternativa pava oprofissional . Guanabara Koogan Rio de Janiro . : 590 - 92 .*
- Freenman , D. J.; Falkiner , F. R and keane , C. T.(1989). New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *J. Clin. Pathol* . 42 (8) : 872 – 874 .
- Forber , B.E.; Sahm , D.F. and Weiss feld , A.S.(2007) . *Bailey and scott's Diagnostic Microbiol . 12th ed . Mosby Elsevier . Texas, U.S.A.*
- Francois , L. M.; Dumcan , W. and Bernhard , H.(2013). *Candida albicans* Pathogenicity mechanisms virulance , 4 (2) :119 - 128.
- Fukuzaki , S.(2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection process. *Biocontrol Sci.* 11(4):147-157.
- Fu , Y. Rieg , G.; Fonzi , W. A.; Belanger , P. H.; Edwards , J. J.; Filler , S.G. (1998). Expression of the *Candida albicans* gene *ALS₁* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells . *Infect. Immum* . 66: 1783 – 1786 .

- Fu , Y.; Ibrahim , A. S.; Sheppard , D. C.; Chen . Y. C.; French , S. W.; Cutler , J. E.; Filler , S. G. and Edwards , J. J.(2002) . *Candida albicans Als₁ p* :an adhesin that is adownstream effector of the EFGI filamentation *Pathway* . *Mol. Microbiol* . 44 : 61 – 72 .
- Ghannoum M. A. and Rice L. B. (1999). Antigungal agents : mode of action, mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol . Rev.* 12 : 50 – 517 .
- Gile , M. L.; Tomas - Barberan , F. A. ; Hess - Pirece , B.; Holcroft , D.M. and Kader , A. A.(2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and its relationship with phenolic composition and Processing . *J. Agric. Food. Chem.* 45 : 4581 - 4589 .
- Gow , N. A. and Brown , A. J. and Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion . *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (4):366-71.
- Green , C. B.; Cheng , G.; Chandra , J.; Mukherjee , P.; Ghannoum , M. A. and Hoyer, L. L.(2004). RT- PCR detection of *Candida albicans ALS* gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral Candidiasis and in model biofilms . *Microbiol* . 150 : 267- 275 .
- Green , C. B.; Marretta , S. M.; Cheng , G. ; Faddoul , F. F.; Ehrhart, E. J. and Hoyer, L. L.(2006) . RT- PCR analysis of *Candida albicans ALS* gene expression in a hyposalivatory rat model of oral Canidiasis and in HIV - Positive human patients . *Med. Mycol.* 44 :103 - 111.
- Grulach , V. A.(1973). Plant function and structure . The Macmillan. Co. , New York .

- Hawser , S. P. and Douglas ; L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents invitro. *Antimicrob Agents Chemother* . 39 : 2128 - 2131 .
- Harly , J. P. and Prescott , L. M.(1996). Laboratorial studies on the yeast causing Candidemia . *J. Med. Vet. Mycol*. 38: 221 - 232 .
- Haslam , E. (1996). Natural polyphenols (vegetables tannins) as drugs : possible models of action . *J. Nat. Prod*. 59 : 205 - 215 .
- Havsteen , B. H. (2002). The Biochemistry and medical significance of the flavonoids . *Pharmacol. Therapeut* . 96 : 67 – 202 .
- Haidari , M.; Ali M.; Casseclls , S. M. and Madjid , M.(2009). Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus has a synergistic effect with oseltamivir . *phytomedicine* . 16 : 1127 – 1136 .
- Hassan , A.; Usman , J.; Kaleem , F.; Omair , M.; Khalid , A. and Iqbal , M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates . *Braz. J. Infect. Dis* . 15 (4): 305-311.
- Hoyer , L. L.; Scherer, S.; Shatzman , A. R. and Livi , G. P. (1995). *Candida albicans* ALS₁ : domains related to *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif . *Mol. Microbiol* . 15 : 39 – 54 .
- Hoyer , L. L.; Clevenger , J.; Hecht , J. E.; Ehrhart , E. T. and Poulet , F.M.(1999). Detection of ALS proteins on the cell wall of *Candida albicans* in murine tissues . *Infect. Immun*. 97 (8): 4251 - 5.

- Hoyer , L.L. (2001) . The ALS gene family of *Candida albicans* .
Trends Microbiol . 9 : 176 - 180.
- Hoyer , L. L.; Green , C. B.; oh , S.H. and Zhao , X. (2007) .
Discovering the secrets of *Candida albicans* agglutinin like
sequence (ALS) gene family a sticky , Pursuit . *Med. Mycol.*
45 : 1 - 15.
- Hoyer , L. L.; Green , C. B. ; oh , S. H. and Zhao , X.(2008) .
Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinine
like sequence (ALS) gene family – a sticky Pursuit . *Med.*
Mycol. 46 : 1 - 15 .
- Homann , O. R.; Dea , J.; Noble , J. M.; Johnson . A. D. (2009) .
A phenotypic Profile of the *Candida albicans* regulatory
network . *PLos. Genet.* 5 : el000783 - 10 .
- Hube, B. and Naglike , J.(2001) .*Candida albicans* . proteinases :
resolving the mystery of a gene family . *Micobiol* . 147:1997-
2005.
- Ikigai , H.; Nakae , T.; Hara , Y. and Shimamura , T. (1993) .
Bactericidal Catechins damage the lipid Bilayer . *Biochem .*
Biophysic . Acta . 1147 : 132 - 136 .
- Jain , N.; Kohli, R.; Cook , E.; Gialanella , P.; Chang , T. and Fries ,
B. C.(2007) . Biofilm Formation by and antifungal
susceptibility of *Candida* isolates from Urine . *APPL. Environ.*
Microbiol . 73(6) :1697-703 .
- Jatta , B.; Gunasekaran , M. and Mohan , N.(2009) . Influnce of
Cultural Conditions on Lipase Production in *Candida albicans*
. *Asian J. Biotechnol* . 1 (3) : 118 – 23 .
- Jayant , S.; Nitin , , M.; Ravikumar , B. and karuppayil , S.(2013) .
Inhibition of Planktonic and biofilm growth of *Candida*

- albicans* reveals novel antifungal activity of caffeine .J. Med. Plants Res. 7(13) :777 – 782 .
- Jones , G. A.; McAllister , T. A.; Muir , A. D. and Cheng , K. J. (1994). Effect of sainfoin (*onobrychis viciifolis scop.*) condensed tannins an growth and Proteolysis by from strains of ruminal bacteria . *Appl. Environ . Microbiol .* 60 : 1364 – 1378.
- Jurenka ,J.S.(2008).Therapeutic applications of Pomegranate (*Punica granatum L.*):a review .*Altern .Med. Rev.*13(2):128-44.
- Kandaxamy , R.; VEDIYAPPAN , G. and chaffin , W. L. (2000). Evidence for the Presence of Pir - like Proteins in *Candida albicans* . *FEMS. Microbiol . Lett .* 186 : 239 - 243 .
- Kapteyn , J. C.; Hoyer , L. L.; Hecht , J. E.; Muller , W. H.; Andel , A.; Verkleij , A. J.; Makarow , M.; Van Den Ende , H. and klis , F. M. (2000). The Cell wall architecture of *Cnadida albicans* wild type Cells and Cell-wall defective mutants. *Mol. Microbiol.* 35 : 601- 61.
- Kartek , P; Jahnavi , V.; Keerthi , D.V. and Sravanthi , K.C. (2012). Evaluation of Antibacterial activity of Herbs . *Int. Res. J. Pharm.* 3 (8) :2230 – 8407 .
- Khan , M.S.A.; Ahmed , I.; Aqil , F.; Owais , M.; Shahid , M. and Musarrat, J. (2010). Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *C.albicans* . In : Ahmed , I.; Owais , M.; shahid and Aqil , F. ads. *Combating Fungal Infections . Problems and Remedy.* Springer – Verlage . Berl . : 21 - 45.

- Konopkaik , K.; Dorocka – Bobkowska , B.; Gebremedhin , S. and Duzgunes , N . (2010). Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole . *Antonie Van Leeuwenhoek*. 97 (4) : 413- 7.
- Kumar , R. and Shukla , P.K.(2010). Amphotericin B resistance leads to enhanced Proteinase and Phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans* . *Fun. Biol*. 114 (3):189-197.
- Kulkarni , A. P; Mahal , H. S.; Kapoor , S. and Aradhya , S. W. (2007). In Vita studies on the binding , antioxidant and cytotoxic action of punicalagin . *J. Agricul . and Food Chemist* . 55 (4) : 1491 - 1500.
- Larriha , G.; Rubio, J. J.; Ciudad , A. and Andaluz , E.(200) . *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. *Internat . Microbiol*. 3 (4) : PP 247 - 252 .
- Lamar , A. S.; Fonseca , G.; Fuentes , J. Cozzi , R.; Cundavi , E.; Fiore , M.; Ricody , R.; Perticone , P.; Degrassi , F. and Salvia , R. (2008). Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum L.* (Punicaceae) whole fruit extracts . *J. Ethnopharmacol* . 115: 416-422.
- Li, Y. F.; Cuo , C. J.; Yang , J. J.; Wei , J. Y.; Xu , J. and Cheng , S.(2007). Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in comparison with Pomegranate Pulp Extract . *Food Chem*. 96: 254-260.
- Livak , K. J. and Schmittgen , T. D.(2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantification PCR and the $2^{-\Delta\Delta^{ct}}$ method . *Methods* . 25 (4) : 402 - 408.

- Lipke , P. N.; Chen , M. H.; de Nobel , H.; Kurjan , J. and Kahn, P. C.(1995). Homology modeling of an immunoglobulin - like domain in the *Saccharomyces cerevisiae* adhesion protein α - agglutinin . *Protein . Sci .* 4 : 2168 - 2178.
- Liu , Y.; Gallardo - Moreno , A. M.; Pinzon - Aramgo , P. A.; Reynolds , Y.; Rodrigues , G. and Gamesano , T. A.(2008). Cranberry Changes the Physicochemical surface properties of *E. Col. Sci. Dir.* 65 (1): 35 - 42 .
- Lo, H.J.; kohler , J. R.; Didomenico , B.; Loebenberg , D.; Cacciapuoti , A. and Fink , G. R. (1997). Nonfilamentous *Candida albicans* Mutants Are a Virulent Cell . 90 (5) PP :939- 949 .
- Loza , L.; Fu, Y. Ibrahim , A. S.; Sheppard , D. C.; Filler , S. G. and Edwards Jr, J. E. (2004). Functional analysis of the *Candida albicans* ALS₁ gene Product . *Yeast.* 21 (6) : 473-482.
- Lynch , A. S. and Robertson , G. T.(2008). Bacterial and fungal biofilm infections . *Annu. Rev .Med.* 59 : 415 -428.
- Macfaddin , J. F.(2000). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria . 3rd ed . *Williams and Wilkins . Baltimor . U.S.A.*
- Mah , T. F. C. and ÓToole , G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents . *Microbiol .* 9 (1) :43-39 .
- Maertens , J. (2004). History of the development of azole derivatives . *J. Clin. Microbiol . Infect.* 10 : 1- 10 .
- Marchais , V.; kempf , M.; Licznar , P.; Lefrancois , C.; Bouchara , J.; Robert , R. and Cottin , J. (2005). *Elsevier , FEMS, Microbiol . Letters .* 245 : 25 - 32.

- Mathur , T.; Singhal , S.; Khan , S.; Upadhyay , D. J.; Fatma , T. and Rattan , A. (2006). Detection of biofilm formation among the Clinical isolates of *Staphylococci* : an evaluation of three different screening methods . *Ind. J. Med. Microbiol.* 24 (1) : PP 25 – 29 .
- Malic , S.; Hill , K. E.; Ralphs , J. R. Hayes , A.; Thomas , D. W.; Potts , A. J. and Williams , D. W. (2007) . Characterization of *Candida albicans* infection of an in vitro oral epithelial model using Confocal laser scanning microscopy . *Oral Microbiol. Immunol.* 22 :188 - 194.
- Marsh , P. D. and Martin , M.(2009). Oral fungal infections . *Oral Microbiol. Chrachill Livingstone, Edinburgh , U. K.* : 166-179 .
- Mansour , E.; Ben Khaled , A.; Lachiheb , B.; Abiod , M.; Bachar , K. H. and Ferchich , A. (2013). Phenolic Compounds , Antioxidant and Antibacterial activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate . *J. Agr. Sci. Tech.* 15 : 1393 - 1403.
- Mason , T. L. and wasserman , B. P. (1987). Inactivation of red beet beta - glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds . *Phytochemistry* . 26 :2197 - 2202 .
- Med Calderonme , R. A. and Fonzi , W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans* . *Trends Microbiol.* 9 :327 - 335.
- Meada , T.; Gracia – Contreras , R.; Pu , M.; Sheng , L.; Garcia , L.R.; Tomas , M. and Wood , T. K. (2012). Quorum quenching quandary : resistance to antivirulence compounds . *ISME . J.* 6 : 493 - 501.
- Mittag , H. (1994). Structural alterations in *Candida albicans* by caffeine and caffeine salts . *Mycoses* . 37. 337 - 341.

- Millisap , K. W. ; Bos, R.; Vander Mei , H. C. and Busscher, H. J. (2001). Adhesive interactions between voice prosthetic Yeast and bacteria on Silicone rubber in the absence and presence of Saliva . *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79 : PP 337 – 343.
- Montazeri , M. and Hedrick , H. G. (1984). Factors Affecting spore Formation in a *Candida albicans* Strain . *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (6) : 1341 - 134.
- Nadeem , S. G.; Shafiq , A.; Hakim , S. T., Anjum , Y. and Kazm , S. U. (2013). Effect of Growth Media , PH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans* . *J. Med. Microbiol* . 3 : 185 - 192 .
- Nailis , H.; Coenye , T.; Nieuwerburgh , F. V.; Deforce , D. and Nelis , H. (2006). Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real – time PCR. *BMC. Mol. Biol.* 7 : 25.
- Nailis , H.; Kucharikova , S.; Ricicova , M.; Dijck , P. V.; Defovce , D.; Nelis , H. and Coenye , T. (2010). Real - Time PCR expression Profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms : identification of model – dependent and - independent gene expression . *BMC Microbiol.* 10 (1) : 114 .
- National Committee for Clinical Labortary standards . (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed Approved Standard M 27 – A2. NCCLS, Wayne , PA . USA.

- Naz , S.; Siddiqi , R. Ahmed , S.; Rasool , S. A. and Sayeed , S. A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compaunds from *Punica granatum* . *J. Food Sci.* 72 (9) : M341 - 5 .
- Nicholls , S.; Maccallum , D.; Kaffarnik F.; Selway , L.; Peck , S. and Brown , A. (2011). Activiation of the heat shock transcription of facter HSH is essential for the full virulence of the fungal Pathogen *Candida Albicans* . *Fungal Genet. Biol.* PP : 297 - 305 .
- Nett , T. E.; Lepak , A. J.; Marchillo , K. and Andes , D. R. (2009). Time course **global** gene expression analysis of an invivo *Candida* biofilm . *J. infect. Dis.* 200 : 307 -313 .
- Nobile , C. J. and Mitchel , A.P. (2006) . Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation . *Cell Microbiol* . 8 : 1382 - 1391.
- ÓCnnor , L.; Lahiff , S.; Casey , F.; Glennon , M.; Cormican , M. and Maher , M. (2004) . Quantification of ALS₁ gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT – PCR using hyperidisation probes on the Light Cyclcer . *Elsevier , Mol. Cell. Probes* . 19 : 153 - 162 .
- Odds , F. C. (1998). *Candida* and Candidosis . 3rd ed. *England. Tindall . London . U. K.*
- Odds , F. C. (1991). Sabouraud (S) agar . *J. Med. Veterin. Mycol.* 29 : 355 - 359 .
- Odds , F. C. (1994). *Candida* species and Virulence . *Asm. News.* 60 : 313 - 318.
- Oliveira , A. and Cunha , M. L.(2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase - negative staphylococci . *BMC. Res. Notes.* 3 : 260.

- Olapour, S. and Najafzadeh , H. (2010). Evaluation Analgesic, Anti –inflammatory and Antiepileptic Effect of Hydro AL-Coholic Peel extract of *Punica granatum* (Pomegranate). *Asain J. Med. Sci.* 2 (6) : 266 - 270.
- Oliveira , J. R.; Vilela, P. G. F. ; Oliveira , F. E. ; Belato, K. K.; Carvalho ,C. A. T.; Jorge , A. O. C. and Oliveira , L.D.(2013). Antifungal effect of Plant extracts on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin . *Bras. Dent. Sci.* 16(3):
- Omay , C. and Tufenkji , N. (2011). The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin – containing materials . *Appl. Environ. Microbiol.* 77 : 3061 - 3067.
- Paraje , M. G.; Correa , S. G.; Albesa , I. and Sotomayor , C. E. (2009). Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages . *Bioche. Biophys. Res. Commun.* 390 (2) : 263 - 8.
- Pai , Vasudha , Chanu , T. R.; Chakraborty , R. ; Ragu , B.; Lobo , R. and Ballal , M.(2011). Evaluation of the antimicrobial activity of *Punica granatum* Peel against the enteric pathogens: An in vitro study . *Asian J. Plant Sci. Res.* 1 (2) :57 - 62.
- Pelezar , M. J.; chan , E. C. and Krieg , N. R. (1986). Microbiology . 5th ed . *McGraw – Hill Book Co , New York.*
- Perez , C. and Ansini , C. (1994). In vitro antibacterial activity of Argentine folkmedicinal Plants against *Balmonella typhi*. *J. Ethnopharm.* 44 : 41 - 46.

- Petri , M. G.; Koning , J. and Moecke , H. P. (1997). Epidemiology of invasive mycosis in ICU patients : a prospective multicenter study in 435 non- neutropenic patients. *Intens. Rare. Med.* 23 : 317 - 25.
- Pinjon , E.; Sullivan , D.; Salkin , I.; Shanley , D. and Coleman , D. (1998). Simple , inexpensive , reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* . *J. Clin. Microbiol.* 36 (7) : 2093 - 2095.
- Pierce , G. C.; Uppuluri , P.; Tummala , S. and . Lopez – Ribot , J. L.(2010). A 96 well Microtiter Plate - based Method for Monitoring Formation and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilm . *J. Vis. Exp.* (44) :e2287.
- Puupponen - Pimia , R.; Nohynek , L.; Alkomi , H. and oksman Caldontey , K. (2004). Bioactive berry compounds novel tools against human Pathogens . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 : 8 - 18.
- Punithavathy , P. M.; Nalina , K. and Menon , T. (2012). Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilm against fluconazole using calorimetric indicator resazurin . *Ind. J. Pathol. Microbiol.* 55 (1) :72 - 4.
- Radulovic , N.; stankov - Tovanovic , V.; Stojanovic , G. Smelcerovic , A.; Spiteller , M. and Asakawa , Y.(2007). Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine Hypericum species from the Balkans. *Food Chen.* 130 (1) :15 - 21 .
- Ramage , G.; Saville , S. P.; Wickes , B. L. and Lopez - Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by

- Farnesol , a Quorum sensing *Molecule* . *APPL. Environ . Microbiol.* 68 (11) : 5459 - 5463.
- Ramage , G. ; Saville , S. P. ; Thomas , D. P. and Lopez . Ribot , J. L. (2005). *Candida* biofilm : an *update* . *Eukaryote. Cell* . 4: 633 - 638.
- Rathinamoorthy , R. and Thilagavathi , G. (2011). Antimicrobial and In vitro Drug Release studies of Microen capsulated *Terminalia chebula* extract finished Fabric . *Int. J. Pharm. Life Sci.* 2 (10) :1147 - 1153.
- Reddy , M. K.; Gupta , S. K.; Jacob M. R.; Khan , S. I. and Ferreira, D. (2007). Antioxidant , antimalarial and antimicrobial activities of tannin - rich fractions , ellagitannins and Phenolic acids from *Punica granatume L.* *Plant . Med.* 73 : 461 - 467.
- Reiss , E.; Shadomy , H. J. and Lyon , G. M. (2012). *Fundamental of Medical Mycology* . *Wiley - Brackwell . Inc. Hobkon , Canada .* : 45 - 47.
- Refai , M.; El- Enbaawy , M. and Hassan , A. (2015). Monograph on *Candida albicans* . 9 : 7 - 11.
- Rouabhia , M. and Chmielewski , W. (2012). Disease associated with Oral Ploy microbial biofilms. *The open Mycol. J.* 6 : 27 - 32.
- Rukayadi , Y. and Hwang , J. K.(2006). In vitro activity of xanthorrhizal against *Streptococcus mutans* biofilms, *Letters Appl . Microbiol .* 42 (4) PP : 400 - 404.
- Sadeghian , A.; Ghorbani , A.; Mohamadi – Nejad , A. and Bakhsandeh , H. (2011). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of Pomegranate fruit skin . *Avicenna J. Phytomed.* 1 (2) : 67 - 73.

- Saija , A.; Scalese , M.; Lanza , M. ; Marzaullo. D.; Bonina , F, and Castelli , f. (1995). Flavonoids as antioxidant against : importance of their interaction with biomembranes . free Radic. *Biol. Med.* 19 : 481 - 486.
- Samaranayake , L. P.; Keungleung , W. and Jin , L. (1986). Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000. 49 :39-59.
- Samaranayake. L. P. (1991). Superficial oral- fungal infections . *Curr. Opin. Dent.* 1 : 415 - 422.
- Sarabhai , S.; Sharma , P. and Capalash , N. (2013). Ellagic acid derivatives from Terminal chebula Retz . Downregulate the expression of quorum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAOI virulence . *PLos ONE.* 8 : e534441.
- Saxena , N.; Maheshwari , D.; Dadhich , D. and Singh , S. (2014). Elevation of Congo Red Ager for detection of biofilm Production By various clinical *Candida* isolates .*J. Evol. Med. Dent. Sci.* 3 (59) : 13234 - 13238.
- Scalbert , A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Chem.* 30 : 3875 - 3883.
- Sahoofs , A.; Odd, F. C.; Colebunders , R.; Ieven , M. and Goossens , H. (1997). Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolation and identification of *Candida* *J. Clin . Microbiol. Infect . Dis.* 16 (4) :296 - 300.
- Scully , C.; Ei - Kabir , M. and Samaranayake , L. P.(1994). *Candida* and oral Candidiasis : a review , Critical Reviews in : *Oral Biol. and Mid.* 5 (2) : 125 - 157.

- Scaller , M.; Borelli , C.; Korting , H. C. and Hube , B. (2005).
Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans* .
Mycoses. 48 : 365 - 377.
- Seeram , N. P.; Adams , L. S.; Henning , S. M.; Niu , Y.; Nair, M. G.
and Heber , D. (2005). In Vitro antiproliferative apoptotic and
antioxidant activities of Punicalagin , ellagic acid and a total
Pomegranate tannin extract are enhanced in combination
with other polyphenols as found in Pomegranate juice . *J.*
Nutr. Biochem. 16 : 360 - 367.
- Seneviratne , C. J.; Jin , L. and Samaranayake , L. P.(2008).
Biofilm life style of *Candida* mini view . *Oral Dis*. 14 :
582 - 90.
- Shchepin, R.; Hornby , J. M.; Burger , E.; Niessen , T. ; Dussault ,
P. and Nickerson , K. W. (2003). Quorum Sensing in
Candida albicans Probing farnesol's mode of action with
40 natural and Synthetic farnesol analogs – *Chem. Biol*. 10 :
743- 750 .
- Sher , A.(2009). Antimicrobial activity of natural Products from
medicinal plants . *Gomal J. Med. Sci*. 7 (1) : 72 - 78.
- Sharma, M. and Prasad , R. (2011). The quorum - Sensing
molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by
ABC multidrug transporters and synergizes with drug in
Candida albicans. *Antimicrob . Agents chemother*. 55
: 4834 - 4843 .
- Singla , S.; Gupta R.; Puri , A. ; Singh , V. and Roy , S.(2013).
Comparison of anti candidal activity of *Punica granatum* (
Pomegranate) and *Lawsonia inermis* (Henna leaves) : An in
vitro study . *Int. J. Dent . Res*. 1 (1) : 8 - 13.

- Slutsky , B.; Buffo , J. and Soll , R. D. (1985). High frequency switching of colony morphology in *Candia albicans* . *Science*. 230 : 666 - 669.
- Sobel , J. D.; Muller , G. and Buckley , H. R.(1924). Critical Role of Germ Tube formation in the Pathogenesis of Candidal Vaginitis . *Infect . Immunol.* 44 (3) : 576 - 580.
- Sudbery , P.; Gow , N. and Berman , J. (2004). The Distinct Morphogenic States of *Candida albicans* . *Microbiol .* 12 (7) : 317 - 324.
- Sundstrom , P.(2006). *Candida albicans* Hypha Formation and Virulence , In : Heitman , J. ed Mol. Prin . fun. Path . Amer. Soc. *Microbiol. Wash. DC.* : 45 - 47.
- Stoodley , P; Sauer , K.; Davies , D. G. and Costerton , J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187 - 209.
- Taylor , J. W.(2006). Evolution of Human – Pathogenic Fungi : Phylogenies and Species , in : Heitman , J.; Fillery, S. G. and Edwards , JE. Jr (eds.) , Molecular Principles of fungal Pathogenesis . *ASM Press , Wahington , DC.* : 113 - 132.
- Taff , H. T.; Mitchell , K. F.; Edward , J. A. and Andes , D. R.(2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance . *Future Micobiol.* 8 : 1325 - 1337.
- Tokunaga , M.; Kusamichi , and Koike , H. (1986). Ultra- Structure of outermost layer of Cell wall in *Candida albicans* observed by rapid – freezing technique . *J. Electron Microsc.* (Tokyo) . 35 : 237 - 246.

- Tsang , P. W.; Bandara , H. M. H. N. and Fonf , W. P. (2012). Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and Hyphal Development .*PLOS ONE* . 7 (11) : e50866 .
- Vasconcelos , L.; Sampaio , M.; Sampaio , F. and Hingino , J. (2003). Use of *Punica granatum Linn* as antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis . *Mycoses* . 46 : 192 - 196.
- Vasconcelos , L. C.; Sampaio , F. C.; Sampaio. M. C.; Pereiramdo, S.; Hingino , J. S. and Peixoto , M. H. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum Linn* (Pomegranate) gel against *S. mutans* , *S. mitis* and *C.albicans*. *Brazil. Den. J.* 17 (3) : 223 - 227.
- Vincent , J. L.; Anaissie , E. and Brining , H.(1998). Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care . *Intens . Scie J. Antimicrob. Chemother.* 51 : 1297 - 300. 65 - 70.
- Voravu thikunchai , S.; Lortheeranumat , A.; Jeeju , W.; Srivirak , T.; Phongpaichit , S. and Supawita , T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157 : H 7. *J. Ethnopharm* . 94 : 49 - 54.
- Wang , L. ; Weller , C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants . *Trends in Food Sci. Technol.* 17 (6) : 300 - 312.
- Webb , M. R. and Eleber , S. E. (2004). Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and Similar compounds : Structural determinates of activity. *Biochem, J.* 384 : 527 - 541.

- Williams , D. M.; Kuriyama , T.; Silva , S.; Malic , S. and Lewis , M. A. (2011). *Candida* biofilm and oral Candidosis Treatment and Prevention . *Periodontol* . 2000. 55 : 250-256.
- Xavier , J. B.; white , D. C. and Almeida , J. S. (2003). Automated biofilm morphologh quantification from confocal laser scanning microscopy imaging , water *Sci and Technol* . 47 (5) : PP 31 - 37.
- Xie , Z.; Thompson , A.; kashleva , H. and Dongari – Bagtzoglou (2011). Aquantitative real - time PCR assay for mature *C.albicans* biofilms . *BMC. Microbiol*. 11 : 93.
- Ya , C.; Gaffney , S.H.; Lilley , T.H. and Haslam , E. (1988) . Carbohydrate – Polyphenol complexation In : Hemingway , R.W. and karchesy , J.J. ed . Chemistry and significance of Condensed tannins . Plenum Press . *New York , N. Y.*; 553 .
- Yang , Y.L. (2003) . Virulence Factors of *Candida* species . *J. Microbiol. Immunol . infect.* 36 (4) : 223 – 228 .
- Yeater , K. M.; Chandra , J.; Mukherejee , P.K.; Zhao , X.; Rodriguez – Zas, S.L. ; Kwast , K. E.; Ghannoum , M.A. and Hoyer , L.L.(2007). Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm *development* . *Microbiol* . 153 : 2373 – 2385 .
- Yordanov , M.; Dimitrova , P.; Patkar , S.; Saso , L. and Ivanovska , N.(2008). Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection . *Candidian J. Microbiol* . 54 : 435 – 440 .
- Yu , L.; Lee , K.K.; Sheth , H . B.; Lane - Bell , P.; Srivastava ,G.; Hindsgaul, O.;Paranchy , W.; Hodges , R.S. and Irrinn , R.T.(

- 1994). Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin . *Infect . Immunol .* 62 : 2834 – 2842 .
- Zhao , X.; Oh , S. H.; Jajko , R. ; Diekema , D. J.; Pfaller , M. A.; Pujol , C.; Soll , D. R. and Hoyer , L.L. (2007) . Analysis of *ALS₅* and *ALS₆* allelic variability in a geographically diverse collection of *Candida albicans* isolates . *Fungal Genet . Biol.* 44 : 1298 - 1209.
- Zhou , X. and L. , Y. (2015). Atlas of oral microbiology. *Elsevier Inc. in : Oral ucosal (FunGi)*: 104 - 107.
- Zuluaga , A.; DeBedout , C. Restrepo . C. A.; Parra , H. H.; Arteaga, M. A. and Restrepo , A. (2012). Suceptibility to fluconazole and voriconazole of *Candida species* isolated from intensive care units Patients in Medellin , Colombia (2001 - 2007). *Rev. Iberoam. Micol.* (27) : 125 - 9.

Summary

In the current study , it was highlighted to find out the inhibitory effect of the alcoholic extract of pomegranate peels against ***Candida albicans*** and assess the effectiveness of this extract in the viability of biofilm formation of the Yeast ***C.albicans*** by knowing the level of gene expression of Agglutinine – like sequence 1 (*ALS₁*) gene by qRT- PCR Technique . 62 Samples were collected and diagnosed by biochemical tests . 31 (50 %) belongs to ***C.albicans*** type , 12 (19.35 %) belongs to ***C.dubliniensis*** , 11 (17.74 %) belongs to ***C.tropicalis*** type and 8 (12.90 %) belongs to b ***C.krusei*** type . The ability of Yeast *C.albicans* to produce Biofilm was detected by Congo Red Agar method (CRA) and the Concentration (12.5 , 25 , 50 , 100 , 150) mg/ ml of the alcoholic extract of pomegranate Peels were tested on the Yeast ***C.albicans*** by well diffusion method and micro dilution method . Through using the qRT – PCR Technology, the level of gene expression of (*ALS₁*) gene was measured to know the inhibitory effect of extract on the biofilm.

Results showed that 16 (51.6%) of Yeast ***C.albicans*** able to from Biofilm included { 6 (37.5 %) formed strong biofilm and 10 (62.5 %) formed in termedinte biofilm , while 15 (62.5 %) did not from biofilm . Also the results showed that concentration 150 mg/ml gave the highest inhibitory Zone (22 mm) , while the concentration 12.5 mg /ml gave less inhibitory zone (9 mm) and the minimum inhibitory concentration (MIC) was calculated it was (12.5) mg/ml for Yeast cells , while the (MIC) against *Candida* biofilm was (25 mg / ml) when the gene expression of the (*ALS₁*)

Summary

gene was calculated. } on the other hand , the levels of Chang fold of ALS_1 gene were (0.640 , 0.394 , 0.220 , 0.21) for the concentration (25 , 50 , 100 , 150) mg / ml respectively while the concentration 12.5 mg/ml did not show a clear influence when compared with control at the prospect $p \leq 0.05$.

From the current study , We concluded the high efficiency of alcoholic extract of Pomegranate Peels on the Biofilm of Yeast ***C.albicans*** through its effect on (ALS_1) gene , suggesting the possibility of its use as a treatment for patients with Candidiasis because of its effect against the pathogenesis Virulence factors which play a critical role in pathogenicity and making it more resistant for antifungal .

Republic Of Iraq
Ministry of Higher Education
And Scientific Research
Kerbala University
Education College for Pure Science
Biology Department



The effect of alcoholic extract of *Punica granatum* peels
on the gene expression of the gene *ALS₁* of the yeast
Candida albicans which forming biofilm and isolated
from mouth area

A Thesis Submitted by

Aysar Ashour Khalaf

B. Sc. Biology / University of Kerbala 2011

A Thesis submitted to the College of Education Pure Science of
Krabala University as partial fulfillment of the requirement for the
Degree of Master in Biology – Zoology

Supervised by

Assist Prof. Dr. Hiyame Abdul Ridha Al-Awade

2016 AD

1437H