



جامعة القادسية  
كلية التربية  
قسم علوم الحياة

**توصيف بعض عوامل الضراوة والتعبير الجيني  
لأنزيم Secreted Aspartyl proteinase في المبيضات البيضاء  
المعزولة من داء المبيضات الفموي في مرضى السرطان**

**اطروحة مقدمة**

**لمجلس كلية التربية - جامعة القادسية**

**من قبل**

**زهراء خضير عباس الخفاجي**

**وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة**

**في علوم الحياة / أحياء مجهرية**

**بإشراف**

**أ. ماجد كاظم عبود الشبلي**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا هَا

عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ )

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة الآية (32)

## قرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهد بأننا اطلعنا على الأطروحة الموسومة " توصيف بعض عوامل الضراوة والتعبير الجيني لأنزيم **Secreted Aspartyl proteinase** في المبيضات البيضاء المعزولة من داء المبيضات الفموي في مرضى السرطان"، وقد ناقشنا الطالبة زهراء خضير عباس الخفاجي في محتوياتها، وفيما له علاقة بها، بتاريخ ( 11 / 9 / 2017 ) ووجدناها مقبولة بتقدير (امتياز) لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / احياء مجهرية .

التوقيع

رئيس اللجنة : جاسم محمد كركوت

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة بغداد - كلية الطب

التاريخ : ٢٠١٧ / ٩ / ١١

التوقيع

عضو اللجنة : عبد الامير سمير سعنون

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة القادسية - كلية العلوم

التاريخ : ٢٠١٧ / ٩ / ١١

التوقيع

عضو اللجنة : زياد متعب فجة

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة القادسية - كلية التقانات الاحيائية

التاريخ : ٢٠١٧ / ٩ / ١١

مصادقة عميد كلية التربية

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع

الاسم : خالد جواد العائلي

المرتبة العلمية : استاذ دكتور

العنوان : جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ : ٢٠١٧ / ١٠ / ١١

## قرار المشرف

اشهد أن إعداد هذه الأطروحة الموسومة "توصيف بعض عوامل الضراوة والتعبير الجيني لأنزيم Secreted Aspartyl proteinase في المبيضات البيضاء المعزولة من داء المبيضات الفموي في مرضى سرطان" قد جرى تحت إشرافي في كلية التربية/ جامعة القادسية ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / أحياء مجهرية .

التوقيع:

الاسم : ماجد كاظم عبود الشبلي

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ: 2017/9/19

## قرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناء على التوصيات المقدمة من قبل المشرف، أرحب هذه الأطروحة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: احمد جاسم النائي


المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ:



## قرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة بـ ( توصيف بعض عوامل الضراوة والتعبير الجيني لأنزيم Secreted Aspartyl proteinase في امبيضات ابيضاض المعزولة من داء امبيضات الفموي في مرضى السرطان) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الأطروحة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .



التوقيع :

الاسم : م.د. زكي عباس راضي

التاريخ : ١٩/٨/٢٠١٧

## الإهداء

إلى..... الذي كُلت انامله ليقتدم لي السعادة..... والذي  
إلى..... التي علمتني الصمود مهما تبدلت الظروف..... والتي  
إلى الذين آثروني على أنفسهم.. وأظهروا لي ما هو أجملُ من الحياة..... إخوتي  
إلى..... الأيادي التي سندتني لكي أسير واصل إلى ما أنا عليه حتى كتابة هذه  
السطور..... اساتذتي  
إلى..... الذين كانوا معي على طريق الخير والنجاح.. إلى من عرفتُ كيف أجدهم وعلموني  
أن لا أضيعهم.. أصدقائي.

أهدي الجميع ثمرة جهدي

  
نزهراء

# الشكر والتقدير

الحمد لله والصلاة والسلام على سيد الكائنات والمرسلين وخاتم النبيين وصفوة رب العالمين محمد (صلى الله عليه وسلم) وعلى آل بيته الميامين

وانا انهي هذا الجهد المتواضع لابد من القول ان من دواعي العرفان بالجميل ان اتقدم بشكري وتقديري لأستاذي الفاضل الاستاذ الدكتور ماجد كاظم الشبلي لاقتراحه موضوع البحث والاشراف عليه واغناؤه بالتوصيات والارشادات السديدة والمصادر العلمية القيمة وتوفير المستلزمات العلمية المطلوبة وتذليل كافة المعوقات خلال مدة البحث

كما يدعوني الواجب ان اقدم شكري وتقديري الى الأستاذ المساعد الدكتور أحمد جاسم النائلي رئيس قسم علوم الحياة واساتذة القسم

شكرا وتقدير رئاسة جامعة القادسية وعمادة كلية التربية لتقديم التسهيلات لأعداد هذا البحث.

واقدم فائق التقدير والاحترام للدكتور علاء عبد الرزاق العنبي اختصاصي الأورام في مستشفى الديوانية التعليمي العام في محافظة القادسية الذي ساعدني في جمع العينات وتشخيص الحالات المرضية .

كما اتقدم بالشكر الجزيل لمرضى السرطان والأشخاص الاصحاء لمساهماتهم في دعم البحث خلال جمع البيانات وشكري وتقديري الى الدكتورة بهيجة عبيس حمود الخالدي معاون العميد العلمي في كلية التمريض جامعة القادسية لما قدمته في بعض جوانب الدراسة كما اقدم جزيل شكري وامتناني للأستاذ الدكتور عدنان حمد الحمداني رئيس قسم الاحياء المجهرية- كلية الطب والدكتور احمد عبد الجبار سليمان الفهداوي التدريسي في جامعة الانبار .

ومن اللطف ان اقدم شكري الى السيد حسن حاجم التدريسي في كلية الطب البيطري / جامعة القادسية لما قدمه لي في مجال التشخيص الجزيئي والسيد حسنين عبد الحسين اختصاص نبات /علوم حياة لمساعدتي في تجهيز المستخلص النباتي .

وشكري وامتناني لمنتسبي مستشفى الديوانية التعليمي وبالخصوص كادر شعبة البكتريولوجي ومنهم السيد علي حسين حمود والسيد انس عبيد هاشم محبوبة والشكر الجزيل لكل من ساعدني في انجاز هذا العمل ولم تسنح الفرصة لذكره.

زهراء

## الخلاصة

جمعت 100 عينة ( مسحات قطنية من القرحة الفموية بعد غسله بالماء المقطر 3 مرات و دم وريدي) من المرضى المصابين بالسرطان بعد العلاج الكيماوي او الاشعاعي والذين ظهرت لديهم اصابات فموية بداء المبيضات والمشخصة من قبل الطبيب المختص للمرضى المراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي/شعبة الاورام للمدة من الاول من اذار 2016 ولغاية نهاية اب 2016، كما تم جمع 100 عينة (مسحة فموية ودم وريدي) من اشخاص اصحاء ( لا يعانون من أية امراض مزمنة ) بوصفها مجموعة ضابطة بهدف المقارنة بين المجموعتين من حيث نسبة الخمائر وانواعها وعوامل الضراوة .

كان عدد العزلات التي تم الحصول عليها من المرضى و الاصحاء 94عزلة ، 24عزلة على التوالي . فقد تم تشخيص اربعة انواع تابعة لجنس المبيضات في مرضى السرطان جاء في مقدمتها خميرة *Candida albicans* بعدد 41عزلة يليه النوع *C. dublineinsis* 22 عزلة ، ثم النوع *C. glabrata* 19 عزلة بينما سجل النوع *C. kruse* 12(12%) ، اما في الاصحاء فقد سجلت النتائج نوعين تابعة لجنس المبيضات وهي *C. albicans* و *C. glabrata* وبعده 22 عزلة و 2 عزلة على التوالي.

كما تبين أن هنالك فروق معنوية في معدل اعداد خلايا الدم البيض بين الذكور والاناث المصابين بالسرطان وأيضا ظهرت فروقا معنوية بين المصابين والاصحاء سواء في الذكور او الاناث ، فهناك انخفاض واضح لمعدل خلايا الدم البيض في المصابين (ذكوراً واناثاً) مقارنة مع الاصحاء (ذكوراً واناثاً) ، وأن أكثر حالات الإصابة بداء المبيضات الفموي كانت تعود لمرضى سرطان الحنجرة وبنسبة 18 % وأقلها سرطان الجلد وسرطان المبيض 1 % ، كما اشارت النتائج الى وجود فروقا معنوية في توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب نوع العلاج عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$

بالإضافة الى وجود فروق معنوية في توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب عدد الجرعات عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ، كما ان اعداد ونسب اصابات الذكور كانت أعلى منه في الاناث للإناث مع عدم وجود فروق معنوية بينهما عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ، فيما بينت النتائج وجود فروق معنوية في توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الفئة العمرية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ،

درست بعض عوامل الضراوة للمبيضات البيضاء وهي الالتصاق والاغشية الحيوية و انتاج الانزيم المحلل للبروتين وكانت اعدادها ونسبها في المرضى 35(85.8%) ، 39(45.1%) ، 40(97.5%) على التوالي، بينما في الاصحاء كانت الاعداد والنسب لعوامل الضراوة المدروسة هي 10(45.4%) ، 5(22.7%) ، 13(59%) على التوالي .

تم اختبار تأثير مضاد الامفوترسين B تجاه المبيضات البيضاء وكان له تأثير تثبيطي عليها وسجل اقصى قطر له 40 ملم ، بالإضافة الى اختبار تأثير المستخلص المائي لبذور *Moringa oleifera* على



نمو المبيضات البيضاء فكان للمستخلص تأثير فعال بتركيز 90 % وكذلك في التراكيز 35%، 50%، 75% ولم يعطي أي تأثير في التراكيز 25%، 15% فقد ظهر أن أقصى قطر تثبيطي للتركيز 90% هو 33 ملم، بينما سجلت التراكيز 35%، 50%، 75% أقصى اقطار وهي (4، 16، 20) ملم على التوالي.

تم الكشف عن التعبير الجيني للجينات *SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5, SAP7, ALS1, HWP1*، باستعمال تقنية Real – time pcr لبعض العزلات قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية وكانت النتائج هي ارتفاع معدل التعبير الجيني للمعاملة T2 ولجميع جينات عوامل الضراوة *ALS1, HWP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP1, SAP5, SAP7* بالمقارنة مع المعاملة C وبفروقات معنوية عالية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ .

واستعمل مستخلص بذور *Moringa oleifera* لتقييم تأثيره على التعبير الجيني للجينات *ALS1, HWP1, SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5, SAP7* قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية وكانت النتائج انخفاض معدل انتاج التعبير الجيني للمعاملة T1 لجميع جينات عوامل الضراوة *ALS1, HWP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP1, SAP5, SAP7* بالمقارنة مع المعاملة C وبفروقات معنوية عالية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  وأيضا انخفاض التعبير الجيني في المعاملة T3 لجميع جينات عوامل الضراوة *ALS1, HWP1, SAP4, SAP1, SAP2, SAP3, SAP5, SAP7* بالمقارنة مع المعاملة T2 وبفروقات معنوية عالية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ .

اظهرت هذه الدراسة ان هناك فرقاً في التعبير الجيني ، لجينات عائلة *SAP* المشمولة بالدراسة معدل في التعبير الجيني وبمقدار  $92.244 \pm 15.88358$  يليه الجين *SAP4* وبمعدل  $71.766 \pm 10.42177$  وبعده الجين *SAP3* وبمعدل  $64.828 \pm 3.48543$  ثم الجين *SAP5* وبمعدل مقداره  $37.156 \pm 7.66049$  ثم الجين *SAP2* بمعدل  $24.975 \pm 4.38852$  بينما سجل الجين *SAP7* اقل معدل في التعبير الجيني وهو  $24.850 \pm 2.92079$ .

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
1	الفصل الأول : المقدمة	
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
4	داء المبيضات الفموي	1.2
4	الحالات السريرية للمبيضات الفموي	2.2
5	جنس المبيضات	3.2
7	عوامل الضراوة في المبيضات البيضاء	4.2
10	بعض جينات الامراضية في المبيضات البيضاء	5.2
12	تأثيرات العلاج الكيماوي والإشعاعي على انسجة الفم ومناعة الجسم	6.2
13	العلاقة بين نقص عدد خلايا الدم البيض والعدوى	7.2
14	العدوى المرافقة لمرضى السرطان المثبتين مناعيا	8.2
14	مراحل حدوث العدوى بداء المبيضات الفموي	9.2
15	دفاعات المضيف ضد عدوى المبيضات	10.2
16	طرائق تشخيص خميرة المبيضات	11.2
19	المضادات الفطرية	12.2
20	النباتات الطبية واهميتها في علاج الاصابات الفطرية	13.2
	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	
23	المواد والاجهزة المستخدمة في الدراسة	1.3
23	الأجهزة المختبرية	1.1.3
24	الأدوات المختبرية	2.1.3
24	المضادات الحيوية	3.1.3
25	المواد الكيميائية والبايولوجية	4.1.3
26	الأوساط الزرعية	5.1.3
26	العدة التشخيصية	6.1.3
27	البادئات	7.1.3
28	طرائق العمل	2.3
28	تحضير الاوساط الزرعية	1.2.3
30	الصبغات والمحاليل	2.2.3
30	طرائق التعقيم	3.3
31	جمع العينات	4.3
21	الفحوصات المختبرية للعينات	5.3
32	التشخيص	6.3
34	التحري عن بعض عوامل الضراوة لخميرة <i>C. albicans</i>	7.3
36	حفظ العزلات	8.3
36	تحضير المستخلص المائي لبذور نبات المورينجا اوليفيرا	9.3

36	الكشف النوعي لبعض المواد الفعالة في المستخلص المائي لبذور <i>Moringa oleifera</i>	10.3
37	اختبار الحساسية الدوائية	11.3
38	الفحوصات الجزيئية Molecular testes	12.3
39	فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)	1.12.3
44	التحليل الاحصائي	13.3
	الفصل الرابع النتائج والمناقشة	
45	العزل والتشخيص	1.4
48	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي والاصحاء حسب نوع الخمائر	2.4
50	توزيع المصابين بحسب معدل عدد خلايا الدم البيض وفقاً لنوع الجنس المصاب بالمسبب المرضي	3.4
50	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الجزء المصاب بالسرطان	4.4
51	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب نوع العلاج	5.4
52	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب عدد الجرعات	6.4
52	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الجنس	7.4
53	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الفئة العمرية	8.4
53	بعض عوامل الضراوة في المبيضات البيضاء	9.4
53	التصاق خلايا المبيضات البيضاء بالخلايا الطلانية	1.9.4
55	القدرة على تكوين الاغشية الحيوية في <i>C.albicans</i>	2.9.4
56	نتاج الانزيم الحال للبروتين من قبل <i>C.albicans</i>	3.9.4
57	الكشف النوعي لبعض المركبات الفعالة للمستخلص المائي للبذور <i>Moringa oleifera</i>	10.4
57	نتائج اختبار الحساسية الدوائية	11.4
60	تركيز ونقاوة الحامض النووي الرايبوسومي	11.4
60	التعبير الجيني لجينات عوامل الضراوة <i>SAP7, SAP5, SAP2, SAP1, SAP4, SAP3, HWP1, ALS1</i>	12.4
79	الاستنتاجات	
80	التوصيات	
81	المصادر العربية	
82	مصادر باللغة الانكليزية	
105	الملاحق	
A	الخلاصة باللغة الانكليزية	

## قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1	الأجهزة المختبرية المستخدمة في الدراسة والشركات المُصنِّعة لها	23
2	الأدوات المختبرية المستخدمة في الدراسة والشركات المُصنِّعة لها.	24
3	المضادات الحيوية المستخدمة خلال الدراسة.	24
4	المواد الكيميائية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة والشركات المُصنِّعة لها.	25
5	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة والشركات المُصنِّعة له	26
6	جميع العُدد التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.	26
7	بادئات الدنا (DNA primers) وتسلسل قواعدهما	27
8	عُدة الإنزيم المستخدمة للتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الإستخلاص	41
9	عُدة كاما المستخدمة في عملية تصنيع أَل cDNA synthesis.	41
10	الظروف الحرارية لمرآحل تصنيع أَل cDNA حسب طريقة عمل العُدة	42
11	مكونات مزيج تفاعل qRT-PCR لجينات الهدف	42
12	مكونات مزيج تفاعل qRT-PCR للجين المحافظ	43
13	الظروف الحرارية المُثلى لمرآحل qRT-PCR لجميع المورثات المُقاسة بحسب طريقة عمل العُدة.	43
14	الصفات المظهرية والمجهرية لأنواع المبيضات المعزولة	45
15	نتائج الاختبارات البايوكيميائية والفسلولوجية لأنواع المبيضات المعزولة	45
16	عدد العينات التي اعطت نمو في حالات المرضى والاصحاء	48
17	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي والاصحاء بحسب نوع الخمائر	49
18	توزيع المصابين بحسب معدل عدد خلايا الدم البيض وفقاً لنوع الجنس المصاب بالمسبب المرضي	50
19	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الجزء المصاب بالسرطان	51
20	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب نوع العلاج	52
21	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب عدد الجرع	52
22	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الجنس	53
23	توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الفئة العمرية	53
24	التصاق خلايا المبيضات البيضاء بالخلايا الطلائية	54
25	القدرة على تكوين الاغشية الحيوية في <i>C.albicans</i>	55
26	انتاج الانزيم الحال للبروتين من قبل <i>C.albicans</i>	56
27	الكشف النوعي لبعض المركبات الفعالة للمستخلص المائي لبذور <i>Moringa oleifera</i>	57
28	قياس معدل الاقطار الثيبطية للمضاد الحيوي وتراكيز مستخلص بذور المورينجا تجاه <i>C.albicans</i>	59
29	نقاوة وتركيز الحامض النووي RNA لعزلات <i>C.albicans</i> بإستخدام جهاز أَل Nanodrop	60
30	التعبير الجيني لجين ALS1 بإستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method)	61
31	التعبير الجيني لجين HWP1 بإستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method).	63
32	التعبير الجيني لجين SAPI1 بإستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method).	65

67	التعبير الجيني لجين SAP2 باستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method).	33
69	التعبير الجيني لجين SAP3 باستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method)	34
71	التعبير الجيني لجين SAP4 باستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method).	35
73	التعبير الجيني لجين SAP5 باستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method).	36
75	التعبير الجيني لجين SAP7 باستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta$ CT Livak method)	37

## قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	الرقم
62	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>ALSI</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	1
62	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>ALSI</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	2
64	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>HWPI</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	3
64	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>HWPI</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	4
66	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>SAP1</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	5
66	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>SAP1</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	6
68	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>SAP2</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	7
68	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>SAP2</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	8
70	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>SAP3</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	9
70	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>SAP3</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	10
72	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>SAP4</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	11
72	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>SAP4</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	12
74	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>SAP5</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	13
74	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>SAP5</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	14
76	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>SAP7</i> في خمائر الـ <i>C. albicans</i>	15
76	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين <i>SAP7</i> في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.	16

## قائمة الصور

الصفحة	العنوان	الرقم
22	شجرة وبذور المورينجا	1
46	مستعمرات خميرة <i>C.albicans</i> على وسط SDA	2
46	الشكل البيضوي لخميرة <i>C.albicans</i> تحت المجهر قوة تكبير x40	3
47	تكوين انبوب الانبات في <i>C.albicans</i> بعد 90 دقيقة قوة تكبير x40	4
47	نظام api Candida لتشخيص خميرة <i>C. albicans</i>	5
54	التصاق الـ <i>C.albicans</i> بالخلايا الطلائية للفم	6
55	الاعشبية الحيوية لـ <i>C. albicans</i>	7
58	الإقطار التثبيطية للمستخلص بذور المورينجا والمضاد الحيوي	8

## قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	الرقم
105	الاستمارة الخاصة بجمع المعلومات من المرضى والاصحاء	1
106	القائمة التوضيحية للفحوصات التشخيصية التي تشملها عدة <i>api candida</i> التشخيصية	2
106	البيانات الخاصة بعينات المرضى	3
109	البيانات الخاصة بعينات الاصحاء	4
111	عوامل الضراوة لـ <i>C.albicans</i> المعزولة من مرضى السرطان	5
119	عوامل الضراوة لـ <i>C.albicans</i> المعزولة من الاصحاء	6



**الفصل الأول**

**المقدمة**

**Introduction**

## Introduction

## المقدمة

يعمل الجهاز المناعي لجسم الكائن الحي على الدفاع عنه وطرده الاجسام الغريبة والضارة التي تغزوه مثل الفيروسات والبكتريا والفطريات ناهيك عن عمله في المحافظة على توازن اعداد الاحياء المجهرية الموجودة في الجسم بصورة طبيعية (Normal flora) لكنه في حالات معينة يفشل في المحافظة على آلياته الدفاعية وتتوقف فعالياته في منع العدوى ومن هذه الحالات مثلا الاستعمال المفرط او العشوائي للمضادات الحيوية والاصابة بالأمراض المزمنة والسكري والايذز والسرطان (Otmani, 2007).

ان الجهاز المناعي لمرضى السرطان في حالة ضعف وتدهور بسبب المرض والعلاجات المستعملة وخاصة العلاج الكيميائي والاشعاعي الذي يهدف للقضاء على الخلايا السرطانية والحد من انتشارها داخل الجسم (Antoniadou *et al.*, 2003) الا أن استعمال العلاج لا يخلو من الآثار الجانبية فالعلاج الكيميائي ينتقل عبر الدورة الدموية الى كل اعضاء وانسجة الجسم لحين وصوله الى الهدف واكثر الأنسجة عرضة للضرر هي سريعة النمو و غزيرة الإنتاج و دائمة الاستبدال مثل خلايا نخاع العظمي و الانسجة المكونة للقناة الهضمية (Hancock *et al.*, 2003).

ومن الآثار الجانبية التي من الممكن ان تصيب انسجة الفم اثناء استعمال الجرعات الكيميائية والاشعاعية هي أن الفم يصاب بالجفاف من جراء التأثيرات الكيميائية والإشعاعية على تدفق الغدد اللعابية وخاصة عند استعمال الجرعات في الرأس والرقبة وبهذا قد يصاب الغشاء المخاطي للفم بتقرحات والتهابات ومنها تقرحات اللثة واللسان وباطن الخدين نتيجة لغزو الاحياء المجهرية خصوصا في حالات اهمال نظافة الفم (Stevenson-Moore, 1990) ، بالإضافة ان وجود العصيات اللبنية لها دور هام في صنع التصاق المبيضات البيضاء بالخلايا الطلائية ولذلك فان استعمال المواد الكيميائية والاشعاعية يقتل بعض تلك العصيات وبالتالي يؤدي الى احداث خلل في توازن الأحياء المجهرية الطبيعية في الجسم ومن اثره ايضا زيادة عدد مستعمرات خميرة *C. albicans* وهذه الزيادة في الأعداد قد تغزو التقرحات وتحدث اصابات فطرية للفم التي تعيق مريض السرطان من تناول غذائه وبذلك يضعف جسمه ويتعب وتقل مقاومته للأمراض . (Wisplinghoff *et al.*, 2014)

تعد خميرة *C. albicans* من الفطريات الانتهازية التي تغزو الجسم في حال ضعف الجهاز المناعي ويساعدها على ذلك هو امتلاكها عوامل ضراوة اهمها انتاج انزيمات Secreted aspartyl proteinases (SAP) التي تعد عامل ضراوة رئيسي، وهي من الانزيمات الخارج خلوية والذي يعمل على تحليل الأنسجة مما يؤدي الى سهولة اختراقها والوصول الى باقي انحاء الجسم (DeBernardis *et al.*, 2001)، بالإضافة الى بروتينات like Agglutinin sequence (ALS) الموجودة على سطح خلايا المبيضات البيضاء المسؤولة عن احداث عملية التصاق الخميرة بخلايا المضيف، لاسيما وان ارتباط خميرة *C. albicans* بالخلايا الطلائية يعتبر خطوة أولى في النمو وعمل المستعمرات وإحداث إصابات في الغشاء المخاطي للتجويف الفمي (Murciano *et al.*, 2012).

كما تمتلك هذه الخميرة بروتينات تدعى (Hyphal Wall Protein 1) (HWP1) وهي بروتينات سكريه تساهم في تكوين الاغشية الحيوية Biofilm التي تحمي الخميرة من الخلايا البلعمية بالإضافة الى حجب تأثير المضادات الحيوية وكذلك تساعدها في عملية الالتصاق (Sundstrom *et al.*, 2002)

ان الدراسة الجزيئية لبعض عوامل الضراوة لخميرة *C. albicans* قد يقود الى معرفة و فهم دور تلك العوامل في نشوء داء المبيضات بالإضافة الى اكتشاف طرق للحد من تلك العوامل لذلك اصبح التوجه البحثي في السنوات الاخيرة بهذا الاتجاه (Klotz *et al.*, 2010).

اخذت دراسة النباتات الطبية حيزاً كبيراً في علوم الطب في الآونة الاخيرة لاحتوائها على مركبات كيميائية فعالة ذات اهمية علاجية مما أدى الى استعمالها بصورة مباشرة على الجزء المصاب و يمكن ان تستعمل بصورة غير مباشرة من خلال تنقية المركب الفعال في النبات واستعماله بصورة مفردة في العلاجات الطبية (Talhaliani and Kar, 2000)، لذلك توجهت الدراسات لإيجاد وسائل تخلص المريض من الالام والأمراض بمركبات ذات تأثيرات جانبية اقل، باستعمال النباتات والاعشاب لكون الادوية المستعملة في علاج الاصابات الفطرية تحتوي على اثار جانبية اضافة الى اثارها العلاجية المستعملة من اجلها (Mossa *et al.*, 1997) فقد يعد نبات البان (*Moringa oleifera*) واحد من النباتات التي تحتوي على كميات كبيرة و متنوعة من المواد الكيميائية التي لها القدرة على وقاية وشفاء العديد من الأمراض مثل : هشاشة العظام ، لاحتواء اوراقها على كمية كبيرة من الكالسيوم و علاج ابيضاض الدم لاحتواها على فيتامين (B12) و لها تاريخ طويل

من الاستعمال في الطب التقليدي لما تحويه من خصائص تستعمل بوصفها عاملاً مضاداً للفطريات والبكتيريا وعلاج مرضى السكري والربو والحمى فضلاً عن قيمتها الغذائية العالية (Chun et al.,2001 )

ان لصحة الفم ولاسيما لمرضى السرطان اهمية بالغة ، وحيث ان اصابة الفم بخميرة *C.albicans* يؤدي الى عرقلة البلع والتذوق، وقد يمتنع المريض عن تناول الغذاء، وكذلك قد تنتقل الإصابة الى مجرى الدم وأجزاء الجسم الاخرى .ولقلة وجود الدراسات حول هذا الموضوع استهدفت الدراسة التعرف على دور عوامل الضراوة في إمرضيه هذه الخميرة المعزولة من داء المبيضات الفموي لمرضى السرطان على المستوى الجزيئي من خلال الخطوات الآتية:

1. عزل وتشخيص خميرة *C. albicans* من عينات فموية لمرضى السرطان.
2. الكشف عن التعبير الجيني للجينات ( *HWP1, ALS1* ) باستعمال تقنية Real – time PCR ( *SAP7,SAP5,SAP4,SAP3,SAP2,SAP1,* لبعض العزلات قبل وأثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية مختبرياً.
3. اختبار تأثير المستخلص المائي لبذور *Moringa oleifera* على التعبير الجيني للجينات ( *SAP7,SAP5,SAP4,SAP3,SAP2,SAP1, HWP1 ,ALS1* ) قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلائية.

**الفصل الثاني**

**استعراض المراجع**

**Literatures Review**

## Oral Candidiasis

## 1-2- داء المبيضات الفموي

هو إصابة الأغشية المخاطية للفم والتي تظهر بشكل بقع بيضاء على اللثة واللسان وباطن الخدين واللوزتين ينتج من تكاثر جنس من الخمائر يدعى المبيضات *Candida spp.* أكثرها شيوعاً هو المبيضات البيضاء *C. albicans* والتي تعيش بشكل طبيعي في أجزاء مختلفة من الجسم كالفم والمعدة والجلد والمهبل دون ان تسبب أي إصابة (Manfredi et al., 2013).

ويعد داء المبيضات الفموي من أهم الأمراض المرافقة لمرضى السرطان المعالجين بالعلاج الكيماوي أو الإشعاعي المسببه للضعف المناعي (Kuriyama et al., 2011) بالإضافة الى غياب البكتريا التي تثبط نموها كالعصيات اللبنية التي تثبط الالتصاق المبيضات بالخلايا الطلائية الفطريات سوف تتكاثر وتصبح لها القدرة على احداث اصابات في اجزاء مختلف (Williams and Lewis, 2011).

## 2-2 الحالات السريرية للمبيضات الفموي

### Clinical Cases of oral candidiasis

#### 1- داء المبيضات الفموي الحاد Acute oral candidiasis او ما يعرف ايضا داء المبيضات الحاد

#### ذو الغشاء الكاذب acute oral pseudomembranous candidiasis

وهو عبارة عن طبقة مرترعة قليلاً بيضاء مصفرة على الغشاء المخاطي الفموي ناتجة من النمو المفرط لخلايا الخميرة الممزوجة مع الخلايا الالتهابية، وعند ازلتها تترك منطقة حمراء واحياناً يحدث نزف (Greenber et al., 2008) هذا النوع من الاصابات سريع الحدوث والتطور وينتج عن عزلات ذات ضراوة عالية قادرة على الانتشار في مناطق واسعة من التجويف الفموي مسببة ضرراً بالغاً في بطانة الفم يمكن أن يمتد الى المريء وباقي اجزاء القناة الهضمية (Treister and Bruch, 2010) 2-التهاب

#### Chronic stomatitis

#### الفم المزمن

يظهر بشكل تقرحات حمراء أو بيضاء في الفم وعادة بين الفكوك وتستمر اعراضه مدة شهر او اكثر يحدث عند ضعيفي المناعة والمسنين ويعد التدخين أحد العوامل الخطرة المعروفة للإصابة بخمائر *Candida sp.* وقد تصاب الامعاء بها نتيجة لقلة الوعي الصحي وجفاف الفم وفقير الدم (Kumaraswamy et al., 2012).

#### 3-داء المبيضات النسيجي المزمن chronic hyperplastic candidiasis

تظهر اعراضه بشكل بقع بيضاء او بنية متصلة واحياناً شفافة وتقرحات بأحجام مختلفة على الأغشية المخاطية لباطن الخد وحواف اللسان (Eyerich et al., 2010).

**Angular Cheilitis****4-التهاب زوايا الفم**

يحدث نتيجة انتقال الإصابة الى زوايا الشفة يصاحبها تشقق الشفاه واحمراراً مصحوب بالألم وقد تتحول الى مزمنة في بعض الأحيان ( Park et al.,2011).

**Midline Glossitis****5-التهاب مركز اللسان**

تقرحات حمراء لماعة وملساء في مركز ظهر اللسان يصاحبه ضمور في حليمات اللسان وعادة يكون مؤلماً ( Scully, 2013 ).

**Candida****3.2. جنس المبيضات**

هو جنس من الخمائر اكتشف لأول مرة من قبل Langenbeck في (1839) من قلاع فموي لمريض التيفوئيد (Abbas et al.,2000)، يقع هذا الجنس ضمن الخمائر، التي تضم حوالي (154) نوعاً اذ صنفت بعض سلالات المبيضات حديثاً ضمن الفطريات الكيسية Ascomycetes لقدرتها الى تكوين سبورات كيسية (Lumbsch and Huhndorf , 2007) وتعد المبيضات من الفطريات ثنائية الشكل (Dimorphic fungi) لان لها القابلية على النمو بشكل خميرة Yeast form او بشكل خيوط فطرية Hyphae form على وفق الظروف البيئية التي تتواجد فيها (حرارة، رطوبة، مكونات الاوساط النامية فيها، pH) (Naglik et al.,2011).

تتواجد الـ *Candida spp.* في الاغشية المخاطية والجلد، للأشخاص الاصحاء بنسبة تتراوح ما بين 31-50% وان تواجد الخميرة بهذه النسبة العالية يكون مدعاة لتوخي الحذر من توفير الظروف الملائمة لها، (Resende et al.,2004) ان افتقار الفم للشرط الصحية والاصابة بداء السكري والاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية والاصابة بالاورام الموضعية كلها عوامل تحول الـ *Candida* من كائن متعايش الى كائن ممرض، له قدرة على احداث الاصابة، وقد ثبت ان السلاق الفموي شائع عند مرضى سرطان الرقبة والرأس بعد تعريضهم للإشعاع (Calderone and Clancy, 2012) تنتشر المبيضات انتشاراً واسعاً في البيئة ومن اهم انواعها التي لها اهمية امراضية هي:

**C.glabrata 1.3.2**

تعرف ايضا بـ (*Turoloopsis glabrata*) وهي من الخمائر المسببة للأمراض الانتهازية وتعد في المرتبة الثانية من حيث الضراوة من بعد المبيضات البيضاء تكثر في الافراد ضعيفي المناعة ومرضى السرطان ومرضى تسمم الدم وقصور الكلية وكبار السن (Mohamed .,2012) تظهر على وسط SDA كريمة اللون، ناعمة، ملساء، ومجهرية تكون خلاياها بيضوية متبرعمة ولا تكون غزلاً فطرياً كاذباً في وسط طحين الذرة (Muller et al .,2008)

**C.krusei .2.3.2**

وتعرف ايضا بـ (*Saccharomyces krusei*) تعد من الخمائر المتعايشة في الاغشية المخاطية للاشخاص الاصحاء، اذ تعزل من تجويف الفم والجهاز الهضمي والتناسلي (Singh et al., 2002) يكثر عزلها من الاشخاص المصابين بسرطان الدم ومرضى السكري وعند الاستمرار في استخدام العلاج الكيميائي لفترة طويلة (Westbrook et al., 2007) تكون مستعمراتها على وسط SDA ناعمة ملساء ذات لون رصاصي مصفر وتكون غزلا فطريا كاذبا تتأخذ شكلا شجريا على وسط طحين الذرة وتكون بشكل اعواد الكبريت نحت المجهر (Mastromarino et al., 2013)، تخمر الكلوكوز ويكون نموها زاحفا على جدران الانابيب الزجاجية عند تنميتها في وسط سائل (Hautala et al., 2007).

### ***C.dubiniensis*.3.3.2**

تعد ايضا من الممرضات الانتهازية عزلت من فم مرضى الايدز كما عزلت من مستخدمى المضادات الحياتية بكثرة ومرافقه ايضا لبكتريا تسوس الاسنان وهذه الخميرة مشابه كثيرا للخواص المظهرية والمجهرية لخميرة *C.albicans* وفي تكوين انبوب الانبات والابواغ الكلاميديا ولكنها يختلفان في استغلال الكربوهيدرات وفي النمو الفقير او المعدوم في درجة حرارة 42 م (Gutierrez et al., 2002).

**4.3.2. المبيضات البيضاء *C. albicans*** : يحتوي الفم على ظروف بيئية مناسبة لنمو مستعمرات الخمائر التي ترتفع نسبتها كلما انخفضت الدالة الحامضية لللعاب ، وان الخمائر كثيرة الوجود في الفم وتعد خميرة *C.albicans* الاكثر سيادة لأنواع الخمائر وهي من اهم مسببات الامراض الانتهازية (Sardi et al., 2013).

تعد المبيضات البيضاء من اشباه الخمائر رقيقة الجدران، ويكون شكلها تحت المجهر كروي الى بيضوي قطرها 5 مايكرون موجبة لصبغة كرام أكبر من البكتريا، تتكاثر بالتبرعم وتنمو في درجات حراره تتراوح بين (20-38) م و pH يتراوح بين 2.5-7.5 (Mohamed, 2012)، يعد وسط السابروود دكستروز اكار مضاف له كلورامفينكول او جنتاميسين من الاوساط المفضلة لعزل خميره *C.albicans* ومن صفاتها التشخيصية هو تكوينها لخيوط كاذبة متفرعة ، وخيوط حقيقية مع سيور بلاستولي على طول الخيوط المتكونة عند نموها على وسط اكار خلاصة الذرة لمدة 72 ساعة بدرجة 25 م ، تتصف بكونها ثنائية الشكل (Dimorphic)، فهي تنمو بشكل خميري في الأوساط الزرعية الصلبة الحامضية والحاوية على العضوية والسكرية بوصفها مصدرا من مصادر الكربون، أما النمو بشكل خيوط فيحفز في الأوساط الزرعية ذات الدالة الحامضية المعتدلة pH=6.5 أو أكثر مثل : وسط أكار البطاطا و السابروود دكستروز اكار (Ellis et al., 2007)



## 4.2. عوامل الضراوة في المبيضات البيضاء

### Virulence Factors in *C. albicans*

تعرف الضراوة (Virulence) بأنها مقياس لدرجة الامراضية (Pathogenicity) او لشدة الاضرار التي تحدث في العائل، و لا يتمكن أي مسبب مرضي من تحقيق الاصابة الا اذا كان ضارياً (Virulent)، اذ تعد الضراوة محكومة بجينات تكتسب او تفقد من خلال النمو التطوري وهي عرضة للانتخاب الطبيعي وبناءً على ذلك فإن عوامل الضراوة تكون بشكل تراكيبي خلوية، او انزيمات او سموم وغيرها وهي تسهم في احداث المرض وتلعب دوراً رئيسياً في بقاء المسبب المرضي ( Pfaller and Diekeme, 2007 ) ، وتعود امراضية المبيضات البيضاء الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة المهمة في احداث الاصابة والتي من اهمها ما يأتي :

#### Adhesion

#### 1- الالتصاق

ان عملية التصاق المبيضات البيضاء بسطوح الخلايا الطلائية لموقع الاصابة يعد الخطوة الاولى في احداث الاصابة وكلما كانت قابلية المسبب المرضي على الالتصاق عالية كلما كانت الاصابة اسرع، يحدث الالتصاق نتيجة تكوين طبقة ليفية مكونة من سكريات متعددة خلال طور الثبات تفرز خارج الخلية وتسمى Extracellular polymeric material ، تساعد هذه الطبقة ذات الطبيعة البروتينية على ارتباط الخميرة ببروتينات الاغشية لخلايا المضيف و من ثم تعد من الخطوات الضرورية للإصابة (Glee et al., 2001).

#### Phenotypic switching

#### 2- التغير المظهري

التغير المظهري هو مهم جداً للتكيف الفطري للتغيرات البيئية خلال غزو المضيف والقدرة على اصابة العديد من الانسجة والانتشار داخله، احيانا خلايا *C. albicans* يمكنها ان تغير الخصائص المورفولوجية لسطح خلاياها ومظهر الخلايا والخصائص البيوكيميائية والايض لتصبح اكثر ضراوة واكثر فعالية خلال مرحلة الاصابة ( Calderone and Clancy, 2012 ). مثلا تحول المستعمرات البيضاء الى معتمة (Opag) والمستعمرات الناعمة (Smooth) الى خشنة (Rough) . التغير المظهري هو على الأرجح اشارة الى عمليات واسعة النطاق تنطوي على تغير الكثير من الخصائص الجزيئية والكيموحيوية التي هي مفيدة للفطر من اجل البقاء داخل جسم الكائن المضيف (Karkowska-Kuleta et al., 2009).

## Dimorphism

### 2-التشكل

فالمبييضات البيضاء هي من انواع الخمائر متعدد اشكال ممكن ان تنمو باشكال مختلفة يكون الشكل الخميري البيضوي في المقام الاول والشكل الاخر هو بشكل غزل فطري وهي الاخرى من العوامل المهمة المميزة لخميرة المبييضات اي ان الخمائر توجد بالشكلين المظهرين داخل جسم الانسان تستعمل الشكل الخيطي من اجل اختراق الانسجة والالتصاق بالسطوح وكذلك الخروج من داخل الخلايا البلعمية وقتلها بينما تستعمل الشكل الخميري في تحقيق الانتشار الجهازي ولهذا فان كلا الشكلين المظهرين مطلوبان ويتكاملان في تحقيق الاصابة اذ تستطيع ان تنمو على شكل اعفان Molds وتكون خيوط فطرية عند درجة حرارة (25) م وتتنمو على شكل خمائر Yeast عند درجة حرارة 37 م (Sudbery et al., 2004).

### 3-انتاج الانبوب الجرثومي Germ tube production

تمتلك المبييضات البيضاء القابلية على تكوين انبوب الإنبات وهي صفة تنفرد بها عن بقية الخمائر و هو عبارة عن استطالة خيطية ناشئة من الجدار الخلوي لخلية الخميرة يمكن ان ينشأ من أي منطقة على شكل بروز متطاوّل قابل للترعرع طوله تقريبا 3-4 مرات أكثر من عرضه له دور مهم في إمرضيه الخميرة ، لان له علاقة بقابليتها على الالتصاق ، وغزو انسجة المضيف (Mayer et al., 2013).

### Biofilm formation

### 4- تكوين الأغشية الحيوية

أن معظم الاحياء المجهرية تشكل تجمعات مصفوفة مغلقة أو أغشية حيوية والتي تعرف بـ Biofilm ، وهو يعرف ايضا بالطبقة الخارج خلوية (Eexopolysaccharide EPS) وهذه الطبقة تتشكل عادة من البروتينات الدقيقة الاخرى والكاربوهيدرات والاحماض النووية مثل DNA (Branda et al., 2005). وان تشكل الاغشية الحيوية يعد مشكله وأنها تميل الى تشكيل تجمعات على اجهزة المضيف وتسبب له التهابات مستمرة بالإضافة الى تعفن الدم في حال انها نمت داخل الجسم او على سطح الجسم كاللثة واللسان وهي تعد من عوامل الضراوة المهمة للمبييضات البيضاء وتكون السلالة التي لها القدرة على تكوين الـ Biofilm اقل حساسية للمضادات الحيوية مما يجعلها مقاومة وصعبة العلاج وتحميها من هجوم الخلايا العدلة (Chandra et al., 2001).

### 5- انتاج الانزيمات الحالة للشحوم المفسفرة Phospholipase production

تعمل هذه الانزيمات على هضم الدهون المفسفرة في غشاء الخلية المضيف كما تعمل على تنظيم نمو الخميرة واعادة تشكيل مكونات الغشاء الخلوي ويمكن لهذه الانزيمات ان تفرز خارج الخلية او تبقى في الداخل (Price et al., 1982).

### 6- إنتاج الانزيمات الهاضمة للبروتينات Proteinases Production

تعمل هذه الانزيمات على كسر الاواصر الببتيدية في جزيئة البروتين و عليه ينتج تحلل او هضم الطبقة المخاطية التي تبطن مواقع مختلفة من الجسم وكذلك خلايا الجلد ، كما تعمل على مهاجمة الاضداد وخلايا الدم البيض، مما ينتج عنه تحطيم المكونات البروتينية الداخلة في تركيب الخلايا وبمعنى اخر تحطيم الخلايا وزيادة سرعة غزو النسيج وتوفير العناصر الغذائية اللازمة لنمو الخميرة . (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

### 7- إنتاج السموم Toxins production

تقوم المبيضات البيضاء بإفراز نوعين من السموم وهي سموم ذات الوزن الجزيئي العالي (High molecular weight toxins) والسموم ذات الوزن الجزيئي الواطئ (Low molecular weight toxins) صنفت من قبل (Iwata *et al.*, 1984). بالنسبة للصنف الاول يمثل نوعين الاول منهما يسمى الكانديتوكسين (Candidotoxin CT) وله وزنة الجزيئي 75000 دالتون يتالف من اربع وحدات ثانوية اذا فقد أي منهما فانه يفقد سميته ،تأثيره على الجسم عن طريق تقلص العضلات (Klotz *et al.*, 2010) اما النوع الاخر من السموم فهو الكلايكوبروتين الكانديدي Candidal (glycoprotein) عباره عن بروتين سكري وزنه الجزيئي 50000 دالتون (Iwata *et al.*, 1984) اما الصنف الثاني من السموم هي ذات الوزن الجزيئي الواطئ تشمل ست مركبات سامة تختلف في الوزن الجزيئي والتأثير السام والتركيب الكيماوي ،تركيب هذه السموم هو اما عباره عن Phenylproprate او Lipopolysacchridae او Extracellularpolysaccharide او هي عبارة عن مركبات ايضية وسطية (Iwata and Yamanoto, 1983).

### 8- مقاومتها للمضادات الحيوية Antifungal resistance

وهناك عدة آليات تلجأ اليها الخميرة المقاومة للمضادات الحيوية وهي:

1. تكوين الاغشية الحيوية :تلعب دور كبير في منع وصول المضاد الحيوي الى موقع الهدف (Mah, 2012).
2. امتلاكها أنظمة الدفع من خلال قذف المضاد من داخل الخلية الى الخارج بقوة الدفع الخارجي pump out وهذه الالية تلعب دور مهم في مقاومة مضادات الازول (Morschhauser, 2002).
3. الطفرات الجينية والتكيف الوظيفي : قد تساعد المضادات الفطرية على حدوث طفرات جينية في الفطريات ينتج عنها سلالات تقاوم هذه المضادات فيما بعد ، وعلى صعيد آخر فإن التكيف

الوظيفي يشير غالبا إلى قدرة الفطريات على تغير مساراتها الحيوية الأيضية والإنزيمية لملائمة أي تغير جديد في بيئتها وإن كان الأمر غير ثابت قد تفقده في أجيالها اللاحقة تبعا لنوع الفطر ونوع العامل المؤثر عليها، في أغلب الأحيان فإن المقاومة الناشئة عن التكيف الوظيفي لا تكون لها آليات محددة (Espinel-Ingroff,2008)، فالمبيضات البيضاء تقاوم مضادات الـ Polyene من خلال نقص كميته الأرجوسترول (Ergostrole) في أغشية الخلايا وهي مواقع الهدف لهذه المضادات ويتم عن طريق حدوث طفرات في الجينات التي تشفر لبناء الإنزيمات المساهمة في بناء الأرجوسترول (Kelly *et al.*,1997).

## 5.2. بعض جينات الأمراض في المبيضات البيضاء

تمتلك المبيضات البيضاء العديد من الجينات التي تساهم في إنتاج بروتينات تساهم في أمراضيتها منها:

### 1- جين (ALS) Agglutinin – like sequence

تمتلك المبيضات البيضاء عائلة جينية تدعى بـ ALS Family مكونة من ثمانية أفراد (ALS1-7 و ALS9) ، عزلت لأول مره عام (1995) من خميرة المبيضات البيضاء من قبل Hoyer *et al.*(1995) تُشفر إلى بروتينات سكرية كبيرة تدعى Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked cell surface glycoproteins ، ترتبط جينات ALS بالموقع 1,6 glucan الموجود على جدار المبيضات البيضاء ، (Murciano *et al.* ,2012) التي تم عزلها من حالات سريرييه مختلفة وهي تعد ثاني أكبر عائلة جينية تمتلكها المبيضات البيضاء من بعد عائلة جين الـ SAP ، الوزن الجزيئي لـ ALS1 (600) كيلو دالتون (Hoyer,2001).

### 2- جين (HWP1) Hyphal wall protein 1

تحتوي منطقة البدء الموجودة على الـ DNA على تتابع نيوكلوتيدي طوله (386) قاعدة يدعى Hyphal wall protein control region يمثل المنطقة المسيطره لجين استطالة الجدار HWP1 والمستهدفة من عوامل النسخ وهي ضرورية تحت الظروف المستحثة لتحفيز تكوين بروتينات Hyphal wall protein (HWP1) وهي بروتينات سكرية وسميت ببروتينات استطاله الجدار لكونها وجدت على اسطح الفطريات ثنائية التشكل و تساهم هذه البروتينات في تكوين الاغشية الحيوية و الالتصاق بخلايا المضيف (Fu *et al.*,2002) وان هذا الارتباط مهم لاستعمار المبيضات البيضاء للمضيف (Sundstrom *et al.*,2002) يتكون الجزء الاول في البروتين من احماض بروتينية (acidic protein) والجزء الثاني يتكون من احماض امينية هيدروكسيلية وينتهي الجزء الاخير منها ب 15

حامض اميني بمتواليات متنوعة تتحدد على وفق متواليات الارتباط glycosylphosphatidylinositol الموجودة على خلايا المضيف وتشير الدراسات ان هذه البروتينات بعد تخليقها ترتبط بالموقع 1,6 glucan الموجود على جدار المبيضات البيضاء في الجزء الغني بالحامضين الامينيين / serine threonine ومن المتوقع انه يساهم في تمدد جدار الخلية الخارجي (Janet and Paula, 1998).

### 3-جين SAP (Secreted Aspartyl proteinases)

ينتمي جين SAP الى عائلة جينية مكونة من عشرة جينات التي تفرز من قبل خميرة المبيضات ، علما ان بروتينات SAP لا تفرز من قبل المبيضات البيضاء فقط وانما تفرز من قبل *C. dubliniensis* و *C. tropicalis* و *C. parapsilosis* (Gilfillan et al., 1998) ، وتشير اغلب الدراسات الى ان العزلات الفاقده لجينات SAP تكون قليلة او معدومة الامراضية (Hube, 2000).

تشفر جينات SAP لانزيم اولي يتكون من (60-200) حامض اميني وهو اطول بكثير من الانزيم النهائي الذي ينتج من معالجة الانزيم الاولي ويحتوي الانزيم النهائي على تركيب نموذجي رباعي ثابت يتكون من بقايا حامض الاسبارتك في الموقع الفعال والسستين في الاجزاء الثلاثة الباقية (Chaffin et al., 1998) ،الوزن الجزيئي لجينات SAP family هو 35-50 كيلو دالتون (Felk et al.,2000).وتعد جينات SAP(1-3) متطابقه بنسبة 67 % اما نسبه التطابق للجينات SAP(4-6) هي (89)% بينما يعد جين SAP7 هو الاكثر تباينا، وان نسبة تطابقه هي (20-27)%مع جينات SAP الاخرى (Monod et al.,1994)

يبدأ مسار تخليق بروتينات SAP في النواة يتم نقل mRNA الى السايروبلازم وترجمته الى انزيم اولي (proenzyme) على الشبكة الاندوبلازمية الخشنة ، فيتم ازالة N-terminal-singl peptide في الشبكة الاندوبلازمية الخشنة من قبل Signal Peptidase بعدها ينتقل proenzyme الى جهاز كولجي ( Newport and agabion , 1997 ) وبمجرد فصلة يتم حزم الانزيم في الحويصلات الافرازية ونقلها الى الغشاء البلازمي تبقى معلقة في غشاء الخلية بواسطة ارتباط بروتينات الربط glycosylphosphotidylinositol (GPI) proteins مع التتابع C-terminal الموجود في بروتينات SAP او تنطلق خارج الخلية ( Koelsch et al.,2000 a ) ، تلعب انزيمات Secreted aspartyl الناتجة من التعبير الجيني لجينات SAP دورا اساسيا في امراضية خمائر *Candida spp.* الحاوية عليها اذ انها تعمل على تجهيز المغذيات للخميره وتساعد على اختراق وغزو انسجة المضيف من خلال عملها على تحليل المادة البروتينية الموجودة في الخلايا وخاصة Mucin ، كما انها تساعد على اختراق الجهاز المناعي من قبل المبيضات البيضاء وذلك من خلال تحطيم Immunoglobulin A، كذلك تعمل

بعض انزيمات Sap وخاصة Sap2 على تحطيم طبقة الكرياتين والكولاجين، وكذلك فان انزيمات SAP تساعد خميرة *Candida sp.* على اختراق جهاز الدوران (Klotz et al., 2010).

## 6.2-تأثيرات العلاج الكيماوي والإشعاعي على أنسجة الفم ومناعة الجسم

اولا: تأثيرهما على أنسجة الفم والغشاء المخاطي

### Effects of chemo and radiotherapy on the oral tissues and the mucosa

تختلف التهابات الفم عن التهابات الغشاء المخاطي، وإن استعمل التعبير نفسه لوصف كليهما، وتتنحصر التهابات الأغشية المخاطية (Mucositis) بهذه الأغشية، وتظهر بلون محمر شبيه بتقرحات الحروق، بينما يشمل التهاب الفم (Stomatitis) اللثة والأسنان أيضا، مما يؤدي لانتشار عدوى بأنسجة الفم بالإضافة الى جفاف الفم والذي ينشأ حين تعجز الغدد اللعابية عن إفراز الكميات الكافية والطبيعية من اللعاب، وتشمل الأعراض إضافة إلى الجفاف، الشعور بالحرقنة خصوصا على اللسان الذي تظهر عليه تغيرات واضحة، و تشقق الشفاه، و تجرح أو تشقق زوايا الفم، و صعوبة شرب السوائل (Vissink et al.,2003).

و من المعتاد أن يبدأ إنتاج اللعاب في الانخفاض بشدة خلال مدة أسبوع من بداية جلسات العلاج، و يستمر المعدل بالانخفاض طالما استمرت الجلسات الإشعاعية، و تنشأ مثل هذه التأثيرات بشكل سريع و لا يمكن عكسها، أي أن تأثيرها يدوم خاصة على الغدد المتعرضة مباشرة للإشعاع، و تعتمد شدة الجفاف بطبيعة الحال على جرعة الإشعاع المستعمل و عدد الغدد المعرضة للإشعاع، و من المعتاد بصفة خاصة أن تتضرر الغدد النكفية بدرجة اكبر ( و هي الغدد اللعابية الموجودة بأعلى الجزء الخلفي من الخد)، و من الطبيعي أن يقع العبء على الغدد اللعابية غير المتضررة لتعمل بفاعلية أكبر، لتعويض الكمّ المفقود من اللعاب (Kostler et al.,2001).

اما في مرحلة العلاج الكيماوي فالمضاعفات على الفم تعتمد شدتها على انواع الادوية الكيماوية وجرعتها ومدة العلاج وموضع الاصابة ويرجع سبب المضاعفات الى أن العلاج الكيماوي لا يؤثر فقط على الخلايا السرطانية ويؤدي الى تدميرها والقضاء عليها، ولكنه قد يؤدي الى تدمير الخلايا السليمة في الجسم لأنه لا يستطيع التمييز بين الخلايا السرطانية سريعة النمو وبين خلايا الجسم الاخرى السليمة سريعة النمو ومن تلك الخلايا خلايا الجهاز الهضمي والتي تتضمن الخلايا المبطنة للفم والشفاه مما يؤثر على الاسنان واللثة وبطانة الفم والغدد التي تفرز اللعاب مما يؤدي الى حدوث تقرحات والالتهابات تنتهي بتلف الخلايا بالإضافة لحدوث الجفاف والعدوى (Sheets et al.,2012)

## Bone Marrow Suppression

## ثانيا كبح نخاع العظمي

يُعد كبح نخاع العظمي أحد أهم التأثيرات الجانبية للعلاج الإشعاعي و التي تتفاوت تبعا لموضع المعالجة، و لا يحدث هذا الأثر بشكل تلقائي عند كل من يتلقى العلاج الإشعاعي، بخلاف العلاج الكيماوي ، و إنما يعتمد الأمر على مدى تعرض النخاع للإشعاع بمختلف أجزاء الجسم ، (Berger,2004)

تكمّن فاعلية العلاج الكيماوي والإشعاعي في مقدرتها على التداخل مع مراحل نمو الخلايا السرطانية، مما يعيق وظائفها الحيوية و تدميرها، بالمقابل تؤثر على بعض أنواع الخلايا الطبيعية التي تنمو بسرعة و تتكاثر بغزارة و دائمة الاستبدال، مثل: الخلايا المكونة للدم في النخاع العظمي (Joensuu, 2008)، مما يؤدي إلى حدوث ما يُعرف بكبح نخاع العظمي ( Bone marrow suppression )، و الذي ينجم عن التأثير المدمر للعقاقير الكيماوية على أنسجة و خلايا النخاع العظمي، مما يؤدي إلى قصور في إنتاج الكمّ اللازم من خلايا الدم المختلفة، و انخفاض معدلاتها بالدورة الدموية، مما يؤدي إلى نشوء عدة مخاطر تنجم عن ضعف فاعلية خلايا الدم، لنقص تعدادها، بالإضافة الى ضرورة تعديل الجرعات العلاجية أو إيقافها لحين تعافي النخاع، مما يقلل من فاعلية المعالجة ضد الخلايا الورمية ( Gullatte and Gaddis ,2004).

### 7.2. العلاقة بين نقص عدد خلايا الدم البيض والعدوى

تصبح التهابات الفم أكثر تعقيداً مع نشوء العدوى خصوصا عند ضعف الجهاز المناعي، و استمرار العوز بخلايا الدم البيض لمدة طويلة و ازدياد مخاطر تطور أنواع العدوى المختلفة، اذا تعدد خلايا الدم البيض من العناصر الرئيسية بالجهاز المناعي، فهي تكافح العدوى و تدافع عن الجسم بمهاجمة الأجسام الغريبة، مثل البكتيريا، الفطريات ، الفيروسات ، الجراثيم المختلفة أو أية أجسام غريبة بالجسم، و تقضي عليها بوسائل متعددة، مثل التهامها أو إفراز سموم لتدميرها، و عندما يكون النخاع العظمي مُثبطا نتيجةً للعلاج الإشعاعي أو العلاج الكيماوي، تنخفض قدرته على إنتاج خلايا الدم البيض بالأعداد الطبيعية، مما يُفقد الجسم مناعته (Freifeld and Kaul, 2008).

و يتعرض المريض لخطر انتقال مختلف أنواع العدوى اليه بسهولة، و التي يُمكن لبعضها تهديد حياته في مدةٍ زمنية قصيرة. ومن ذلك ما يحصل من مضاعفات و الالتهابات قد يصبح الفم ملوثا و يسهل حصول العدوى عبر أنسجته المتضررة، حيث تسمح الأنسجة الملتهبة بالفم للفطريات المسببة للمرض

بالدخول إلى الدورة الدموية، وكذلك البكتيريا غير الضارة التي تصبح خطيرةً بدورها في مثل هذه الحالة. ويمكن استخدام العلاج بطبيعة الحال لمنع العدوى بالفطريات ، مثل غسولات الفم التي تحتوي على المضادات الفطرية، إلا أنها تطهر العدوى السطحية فحسب، و لا يمكن امتصاصها و لا تساعد في معالجة عدوى أعمق من ذلك، مثل العدوى بالمريء أو الأمعاء (Maschmeyer and Haas,2008) ، و من المعتاد أن تظهر العدوى بمواضع متعددة من الجسم، و هي تشمل عند مرضى السرطان: الجلد و البشرة، و الفم و الحنجرة، المرء، التجويف البطني و الكبد و المستقيم، الرئتين، المثانة و الكليتين، و الجهاز العصبي المركزي ( الدماغ و الحبل الشوكي )، إضافة إلى مواضع الحقن الوريدي ( Watters *etal.*,2004) .

## 8.2. العدوى المرافقة لمرضى السرطان المثبتين مناعياً

تصنف العدوى حسب نوع الجراثيم المسببة لها، أي البكتيريا و الفيروسات و الطفيليات وحيدة الخلية، و الفطريات ، و تتجم في اغلب الأحوال عن البكتيريا و الفيروسات التي تعيش على سطح الجلد أو في الجهاز الهضمي، و إن كانت أحيانا تتجم عن الأنواع الموجودة بالبيئة المحيطة، و بطبيعة الحال فهذه الجراثيم لا تسبب أية عدوى في الظروف العادية حيث يتمكن الجهاز المناعي من مكافحتها، إلا أنها عند ضعفه نتيجة تلقي علاجات الأورام يمكن أن تنشط و تتسبب في العدوى (Freifeld and Kaul ,2008) .

توجد الفطريات بصورة طبيعية في جسم الإنسان وهي من النبيت الطبيعي فلا تسبب أمراضاً في الحالات الاعتيادية إلا انها تصبح ممرضة عند وجود ضعف مناعي و نشوء العوز بالخلايا المتعادلة، و تشمل الفطريات المسببة للعدوى عند مرضى السرطان منها *Aspergillus sp.* ، *Cryptococcus sp.* ، *Histoplasma sp.* ، *Candida sp.* وغيرها (Harrison *et al.*,2015) .

واكثر هذه الاصابات هي داء المبيضات الفموي والناتج من تواجد خميرة *Candida sp* بصورة طبيعية في الفم

## 9.2. مراحل حدوث العدوى بداء المبيضات الفموي

يمكن تقسيم عملية حدوث الاصابة الى ثلاث مراحل وعلى النحو الاتي :

أ- **الالتصاق Adherence** وهي اول خطوة في عملية احداث الاصابة وكلما كان الالتصاق سريعاً وشديداً كلما كانت الاصابة اسرع واشد ، لأن خلايا المبيضات تلتصق بالأغشية



المخاطية المبطنة للفم أو أي مكان تصل اليه وتعتمد عليه الالتصاق على عدة أمور أهمها ان هنالك مواقع محددة على سطح خلية المبيضات لها الفة خاصة تجاه خلايا المضيف، كما ان لجدار الخلية ومكوناته الدور الكبير في عملية الالتصاق، فضلا عن بعض العوامل الفيزيائية مثل درجة الحرارة والذالة الحامضية التي تلعب دورا في تشجيع او تثبيط عملية الالتصاق (2003, Bendel).

### ب- تكوين انبواب الانبات Germ Tube Formation

يعد دور انبواب الانبات متمما لعملية الالتصاق لأنه يتكون مباشر بعد التصاق خلية المبيضات بخلايا العائل اذ تمر الخلية بفترة نشاط ايصي يؤدي الى انبثاق انبواب الانبات الذي يخترق انسجة العائل ويمتد ويتفرع ، ان تكون وامتداد انبواب الانبات وتطوره يرافقه العديد من الفعاليات التي تؤدي بشكل او باخر الى احداث ضرر في انسجة العائل يأتي هذا الضرر من الضغط الميكانيكي لنمو الخلايا ومن افراز الانزيمات الحالة التي تؤدي الى تلف وتحلل الانسجة وكذلك من السموم التي تفرز اثناء الانبات والتي تلعب دورا في شل دفاعات المضيف واحداث حاله النخر في الانسجة مما يهيئ العائل الى المرحلة اللاحقة (2012, Jacobsen *et al.*).

### ج – الاستعمار Colonization

هي الخطوة النهائية في احداث الاصابة لان انبواب الانبات يستطيل ويتفرع ليكون مستعمرة وفي هذه المرحلة يكون المسبب المرضي قد وصل الى الذروة من حيث الاذى الذي اصاب الانسجة ، اذ تزداد كمية الانزيمات والسموم المنتجة ويزداد طرح لفضلات من قبل الممرض ويزداد الضغط الميكانيكي على الانسجة المجاورة وتبدأ الخميرة بتكوين اجزاءها التكاثرية لاسيما ابواغ مقاومة للظروف القاسية ، ان انتشار داء المبيضات في داخل الجسم رهن بالقدرة المناعية للعائل وبقدرة الخميرة على تغيير شكلها (Phenotypic switching) من خيوط الى خمائر وبالعكس لان الشكل الخميري يستطيع ان ينتقل عبر مجرى الدم ليصيب اماكن جديدة (2012, Gow *et al.*).

## 10.2. دفاعات المضيف ضد عدوى المبيضات

### Host Defenses Against Candida Infections

ان اليات المضيف ضد العدوى الانتهازية للمبيضات هي كالاتي :

1- الطبقة الظهارية في الفم وهي حاجز عام يمنع الكائنات الدقيقة من دخول الانسجة

(1994, El-kabir *et al.*).

- 2- المنافسة بين الكائنات الحية مثل وجود بعض انواع البكتريا التي تثبط الزيادة في نمو المبيضات مثل بكتريا العصيات اللبنية . ( Scully ,2013 ).
- 3- اللعاب يمنع تجمع المبيضات على الطبقة الظهرية لاحتوائه على اجسام مضادة ومكونات انزيمية مثل انزيم lysozyme و lactoperoxidase وان تعطيل أي من هذه الاليات الدفاعية يزيد من احتمالية الاصابة بداء المبيضات الفموي ( Scully ,2013 ) .

## 11.2. طرائق تشخيص خميرة المبيضات

### Methods of diagnosing *Candida* yeast

1. الفحص المباشر باستعمال المجهر يتم فحص المسحة (العينة) المأخوذة بعد معالجتها بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) (10%) وتثبيتها على الشريحة ،حيث يقوم المحلول بتحليل الخلايا الطلائية المرافقة للعينة تاركا خلايا الخميرة مما يسمح برؤية الخيوط الكاذبة والشكل البيضي لخميرة *Candida*، وهي من المميزات المهمة للمبيضات وهذه الطريقة شائعة الاستعمال في المختبرات لسرعتها في اعطاء النتيجة لكنها غير دقيقة ( Kerawala and Newlands ,2010).

2. الزرع **Culture** يتم اخذ قشط من المنطقة المصابة بداء المبيضات ويتم عمل مسح بطريقة التخطيط على طبق زرع حاوي على الوسط المناسب لنموها (سابرود دكستروز اكار ،وسط اكار الدم ،وسط كروم اكار كانديدا ) ويحضان في الحاضنة عند درجة حرارة (37)م لمدة 48 ساعة ،ومن خلال لون وشكل وطريقة نمو المستعمرات يمكن التعرف على المسبب الموجود في منطقة الاصابة ،وان هذه الطريقة اقل استعمالا من الفحص المباشر باستعمال المجهر نظرا لأنها تستغرق وقتا طويلا ،كما انها حساسة جدا ويمكن للعينة ان تتلوث مما يجعلها غير مفيدة في التشخيص ( Purkait ,2011) .

3. تكوين الانبوب الجرثومي **Germ Tube Formation** للتمييز بين الأنواع التابعة لجنس *Candida* spp ،اذ تنتج عزلات *C. albicans* الانبوب الجرثومي عند حضنها مع مصل الانسان بدرجة حرارة (37)م لثلاث ساعات وهي مهمة بوصفها صفة تشخيصية لتمييزها عن باقي انواع المبيضات (Milne ,1996)، كما ذكر (Campbell et al.,1998) ان *C.dublinsiensis* ولها القدرة على انتاج الانبوب الجرثومي .

### 4. تقنية **API- Candida Analytical profil index**

احد طرق التشخيص الحديثة يمكن من خلالها تشخيص الجنس والنوع ويتكون من شريط (10) انابيب تحتوي على (12) اختبار (كيموحيوي) لونية موجودة

داخل حفر، (5) منها تتضمن تمثيل السكريات وهي (كلوكوز، كالكتوز، سكروز، تيلوز، رافينوز) و(7) اختبارات انزيمية وهي ( $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -glucuronidase, urea hydrolysis, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase, galactosidase) يوضع عالق الخميرة في الحفر ثم تقرأ النتائج بعد الحضانة لمدة (18-24) ساعة عند درجة (36) م ويتم التشخيص بعد قراءة النتائج وتحويلها إلى ارقام وحسب تعليمات الشركة المجهزة (Colin et al., 1999)

5. **تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR):** من الطرق المستعملة للتشخيص الدقيق وهي طريقة تعتمد على الحامض النووي DNA تعرف بطريقة البلمرة المستمرة او المتسلسلة (PCR) Polymerase Chain Reaction ونتمكن في هذه الطريقة من تشخيص الفطريات (White et al. 2006) ،تستعمل بنطاق واسع اذ يتم من خلالها تضخيم جزء صغير من DNA يقدر بالميكرو غرام وفك ارتباط شرط الحامض النووي DNA ومن ثم اعادة ارتباطه بأشرطة جديدة وتتم هذه العملية عن طريق التحكم بدرجات الحرارة (Mothershed and Whitney, 2006) تمر بثلاث مراحل وهي

أ- **مرحلة المسخ او التفكك Denaturation** : وتحدث في درجة حرارة بين (94-98) م حيث يبدأ شريط DNA بالانقسام إلى خيطين منفصلين عن بعض وتحدث خلال فترة زمنية بين (1 - 9) دقائق.

ب- **مرحلة الالتصاق Annealing** : وفي هذه المرحلة يبدأ البادئ بالالتصاق على خيط DNA وتتم بدرجة حرارية اقل من مرحلة التفكك (50 – 65) م، وتتم تقريباً خلال (5) ثواني.

ت- **مرحلة التمديد او البناء Elongation**: تعد هذه المرحلة الاخيرة في عملية المسخ وتحدث في درجة (75-80) م، وهذه هي الدرجة الحرارية المناسبة لعمل الانزيم DNA polymerase ، نقوم ببناء خيط الحامض النووي الجديد، هذه المراحل الثلاث تعد دوره واحد يتضاعف الحامض فيها إلى نسختين ، ان اساس عمل الـ PCR هو الاعتماد على الدورة الحرارية التي تستعمل الديناميكا الحرارية من تفاعلات الحمض النووي عن طريق تناوب التسخين والتبريد لعينات الـ PCR بعد تحديد درجات الحرارة (Sharkey et al., 1994) .

اعتمدت هذه التقنية في التشخيص السريري لداء المبيضات بالإضافة الى انواع الفطريات الممرضة الاخرى (Kato, 2001)، وتعد من التقنيات الفعالة في مجال تشخيص الخمائر والاعفان وهي افضل من الطرائق التقليدية فضلا عن مصاحبة العديد من المعوقات في تشخيص العزلات ضمن النوع نفسه واطافة الى انها تستغرق وقتا طويلا (اسبوعا او اكثر) لظهور نتيجتها

(Thomas,2003) بالإضافة الى تشابه سلوك الخمائر في العديد من الصفات المظهرية، وعلى الاوساط الزرعية وصعوبة تمييزها حتى باستعمال الوسط التفرقي كروم اكار (2005) (Mancini and Ossi,).

## 6. تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي

### Real time polymerase chain reaction (RT – PCR)

تقنية علمية حديثة تجمع بين تضخيم عينة الحامض النووي الوراثةي وبين الكشف عن كمية ناتج التضخيم ونوعيته في أنبوبة تفاعل واحدة، الأمر الذي يحمي العينات من التلوث نتيجة فتح أنابيب التفاعل وإغلاقها (Bustin, 2002)، استعملت طريقة أـ (RT–PCR) لأول مرة من قبل Higuchi *et al.* (1993)، ويكون أـ RNA عادةً هو الأساس في تقنية Real time reverse transcriptase ولا يُمكن استعماله كقالب في جهاز أـ (RT–PCR)، لذا فإن أول خطوة هي عملية تحويل قالب أـ RNA إلى cDNA في عملية الاستنساخ العكسي Reverse transcription التي من خلالها يمكن قياس التعبير الجيني Gene expression بواسطة تقنية أـ (RT–PCR) القادرة على ضبط عملية تضخيم أـ DNA في الوقت الحقيقي. وتُنجز هذه العملية بواسطة مواد كيميائية وأدوات خاصة تتكون من صبغة مُشعَّة خاصة ومجسات تتضمن:

1- **صبغة السايبر الخضراء Sybr green I dyes:** وهي أكثر الصبغات شيوعاً في جهاز أـ RT–PCR وترتبط بصورة غير نوعية بشريطي أـ DNA (Yin *et al.*, 2001)، وتكون غير مُشعَّة عندما توضع في محلول عادي لكنها تُضيء وتزيد (1000) مرة عندما ترتبط مع شريط أـ cDNA، كما أن صبغة السايبر الخضراء ترتبط مع نواتج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة المؤديةً إلى زيادة الصبغة المُشعَّة بالتتابع وعندها يمكن تحديدها

2- **صبغة تحلل المجس Hydrolysis probe dyes:** يُستعمل مجس تاكمان Taqman probe ومثاله الجزيئات المضيئة Beacons molecules في هذه الطريقة التي تعتمد على تحلل المجس المرتبط بصبغة ماصة Quencher لتألق صبغة Reporter flouochrome (Gibson *et al.*, 1996)،

3- **تقنية التهجين Hybridization Technique:** يتحسس المجس بالصبغة الواهبة Flouochrome عند النهاية الثالثة ويتحسس آخر بصبغة ثانية مُستقبلة عندما تكون كلا الصبغتين في حيز متقارب (ما يقارب 0 – 1 نيوكليوتيد)، وأن الضوء المنبعث من الصبغة المرسله سوف يثير الصبغة المستقبلة وينتج عنه إنبعاث صبغة التوهج التي يمكن أن تُحدد خلال طور التلدن Annealing phase، وفي أول جزء من طور التهيج في تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة وبعد كل دورة متعاقبة من أـ

PCR سوف يزداد عدد المجسات المهجنة وينتج عن ذلك تألق أكثر، وأن العمليات المشتركة ما بين الاستنساخ العكسي وتفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي فعالة جداً حينما يُراد قياس التعبير الجيني (Dorak and Tervli, 2009)، ولتحليل النتائج بإستعمال RT-PCR تُستعمل طريقتان:

الأولى: قياس الكمية المطلقة Absolute quantitative (طريقة المنحنى القياسي المطلق).

الثانية: الكمية النسبية Relative quantitative (Livak and Schmittgen, 2001).

تعتمد الكمية المطلقة على المقارنة ما بين قيمة Threshold cycle (Ct) لعينات الإختبار مع المنحنى القياسي، ويتم من خلال دورة Threshold Cycle (Ct) معرفة أول إشارة أو إشعاع للصبغة عند ارتباطها مع الأحماض النووية عند تضاعف الـ DNA، وهذه الدورة تقاس عند الطور الأسّي لمنطقة التضخيم ويتضاعف ناتج الـ PCR في كل دورة، وأن الـ cDNA هو المحدد لقياس الكمية المطلقة، أما الكمية النسبية فإنها توصف التغيير في تعبير المورث الهدف بالنسبة للمورث المحافظ Hk gene (House keeping)، ولتحديد التغيير في التعبير الجيني تُستعمل طرائق ثلاث هي:

• الطريقة الأولى:  $\Delta\Delta Ct$  (Livac method).

• الطريقة الثانية:  $\Delta Ct$  method).

• الطريقة الثالثة: (Pfuffl method) (Livak and Schmittgen, 2001).

ومن مزايا هذه التقنية :-

- مراقبة التضخيم بالوقت الحقيقي من خلال شاشة الكمبيوتر .
- عدم وجود معاملات مابعد الاختبار كالترحيل الكهربائي في الاكاروز كما في PCR التقليدي .
- التدوير فيه سريع من نصف ساعة الى ساعتين .
- الحساسية اكثر ب (1000) مرة من PCR التقليدي .
- امكانية حدوث التلوث والتلاعب اقل من PCR التقليدي لأنه يجري داخل انابيب مغلقة

(Rebrikov and Trofimov, 2006) .

وهناك تطبيقات كثيرة لاستعمال RT - PCR في المجالات الطبية مثلاً لتشخيص الـ HIV (Human immunodeficiency virus) (Gibellini *et al.*, 2004) وفي المختبرات لتشخيص الأمراض المستعصية كإنفلونزا الطيور والخنازير (FDA, 2003)

## 12.2-المضادات الفطرية Antifungal

تؤثر المضادات الفطرية في الفطريات بطريقتين فهي إما أن تؤدي إلى تثبيط نموها (Fungistatic)، أو قتلها (Fungicidal)، فالفعالية لهما تكون إما ضيقة المدى (Narrow)

spectrum أو واسعة المدى (Broad spectrum) و على العموم فان فعالية المضادات الفطرية تعتمد على كيفية أدائها لهذه الفعالية وعلى الهدف الخلوي (Cell target) الذي تختاره (الزبيدي، 2000). وإن لمعظم المضادات واحدا أو أكثر من الأعراض الجانبية المتمثلة بالسمية العالية ، محدودية الاستعمال، القابلية على اختراق الأنسجة، لذلك فمن الصعب الحصول على علاج معين ضد نوع معين من الفطريات، وإن السبب في ذلك يعود إلى أن الفطريات حقيقية النواة وذات تركيب وعمليات أيضية مشابهة للخلايا المضيفة وبذلك فهي فضلا عن قابليتها على تحطيم خلايا الفطريات الممرضة للإنسان او الحيوان إلا أنها وفي الوقت نفسه قادرة على تحطيم خلايا المضيف (Wetter, 2004).

هنالك اربعة انواع رئيسية من مضادات الفطريات الممرضة للانسان:

### 1- مجموعة الازول Azoles

تضم مجموعة من المضادات مثل Ketoconazol و Clotrimazol و Fluconazol و Itraconazol تؤثر عن طريق إيقاف عملية تخليق مركبات Ergosterol او Sterol أثناء تكون الغشاء الخلوي اذ ترتبط هذه المضادات مع أنزيم P450 14 $\alpha$ .demethylase مما يمنع هذا الأنزيم من القيام بإزالة مجموعة المثيل من Lanosterol ومن ثم يؤدي الى تراكم 14 $\alpha$ . Methylase في غشاء الخلية بدلاً من Ergosterol مما يؤدي الى نفاذ هذا المركب في الغشاء البلازمي للخلية الفطرية يعقبه حصول تغير في نفاذية الغشاء البلازمي للخلية الفطرية (Groll et al., 1998).

2- مجموعة Echinocandins تعطل عمل الانزيم (1,3 beta-d-glucan synthase) المسؤول عن تصنيع المكونات الاساسية في جدار الفطريات، مثال Micafung (Kerridge, 2009).

3- مجموعة Polyenes تنتج هذه المجموعة من بكتريا *Streptomyces* وتعمل مباشرة على الإتحاد مع Ergosterol او Sterol في الغشاء البلازمي للخلايا الفطرية وأن هذا الإتحاد يولد ثغوراً في الغشاء البلازمي مما يؤدي الى تغير في نفوذه تدريجياً مؤدياً بالتالي الى موت الخلية الفطرية (Murray et al., 1999).

4- مجموعة Allylamines تعطل عمل الانزيم squalene epoxidase الذي يدخل في تكوين الارجوستيرول (Kerridge, 2009).

### 13.2. النباتات الطبية واهميتها في علاج الاصابات الفطرية

على الرغم من وجود اعداد محدودة من المضادات الفطرية لكنها في ازدياد مستمر، ولبعض هذه المضادات واحد أو أكثر من الأعراض الجانبية ، (Brooks et al., 1998) ، فقد توجهت انظار الباحثين الى استخدام النباتات الطبية بوصفها بديلا للعلاجات الكيماوية لما لها من تأثيرات علاجية فعالة وقليله

الضرر على الجسم فالنباتات الطبية تحتوي على مادة كيميائية واحدة او اكثر لها القدرة على معالجة مرض معين او تقلل من شدة الاصابة بالمرض اذا ما أعطيت للمريض بصورتها النقية بعد استخلاصها من المادة النباتية او استعمالها بصورة عشب نباتي طازج او مجفف (هيكل وعمر، 1988).

### 1.13.2- المورينجا اوليفيرا *Moringa oleifera*

الاسم العربي لها هو شجرة البان و شجرة اليسر و شجرة الحياة ،تنمو في العديد من المناطق و يتم استعمالها للوقاية من أمراض عديدة، وكذلك تستعمل كسماد للتربة و لتنقية المياه ،ناهيك عن تدخلها في صناعة المبيدات الحشرية ومبيدات الفطريات وتوصف نوعا من التوابل وكل جزء من هذه الشجرة له فوائد فكل الأوراق والزهور و الزيت والبنور هي عبارة عن مكونات صالحة للأكل ( Anwar and Rashid,2007) .

تنتمي شجرة المورينجا الى العائلة Moringaceae ، المعروفة منذ القدم لكثرة فوائدها الطبية، وتعد نباتات ذات قيمة غذائية عالية وتستعمل في التغذية وعلاج الكثير من الامراض لاحتوائها على العديد من المواد المغذية المفيدة ، وتعد المورينجا اوليفيرا ( *Moringa oleifera* ) من اكثر الانواع انتشارا من الناحية الغذائية والطبية، وهي شجرة برية، موطنها الاصلي في الهند، وتنتشر ايضا في جبال الهيمالايا ،باكستان، تايلاند، الفلبين، جزر المحيط الهادي، منطقة البحر الكاريبي، أفريقيا، الجزيرة العربية، جنوب ووسط أمريكا، المكسيك، هاواي، جميع أنحاء آسيا، وكما زرعت في العديد من المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم (الصورة 1) (Kumar et al .,2010).

وتستعمل المورينجا لقيمتها الغذائية العالية منذ العصور القديمة في العديد من العلاجات كعلاج لكثير من الامراض المختلفة في الطب التقليدي في كل مكوناتها الاوراق، البنور، الساق، الأزهار، الجذور والقرون غير الناضجة، كمنشط للقلب والدورة الدموية والمناعة وخافض للضغط والحرارة والدهون والسكر ومضاد للاكسدة والالتهابات والقرحة والاورام والاكنتاب والصرع والتشنج والجراثيم والفطريات (Dubey et al ., 2013)

فلبنورها اهمية في تنقية المياه من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام فهي تحتوي على مواد فعال مضادة للبكتريا بالإضافة الى انها تحتوي على مادة قاتلة للفطريات fungicidal تدعى ترايكوسبيرمين (Terygospermin) التي تعمل على اتلاف الغشاء الخلوي للفطر نتيجة تداخلها مع طبقة الدهون الثنائية في الاغشية مما يؤدي الى فصل الاغشية الخارجية والداخلية وانتفاخ الخلية بسبب دخول الماء اليها من الفتحات مما يؤدي الى انفجارها وموتها ( Eman et al.,2009 ) بالإضافة الى احتوائها على الصابونين والتانينات والكلايكوسيدات والفلافونيدات والتي اثبت لها تأثير قاتل لخلايا الفطر (Anwar and Rashid,2007)

وهناك العديد من التجارب التي اجريت على نبات المورينجا والتي اثبت ان لها تأثير مضاد للأحياء المجهرية منها دراسة ( Napoleon et al. ( 2009 ) لاختبار التأثير المضاد للمستخلص الكحولي لبذور وازهار واوراق المورينجا على عدة انواع من البكتريا وهي *Pseudomonas aeruginosa* و *Satphylococcus aureus* و *Enterobacter* و *Escherichia coli* وكذلك دراسة (Eilert et al.(1981) للمستخلص المائي لبذور المورينجا على *Satph.aureus* و *Aspergillus sp.*



الصورة 1: شجرة وبذور *Moringa oleifera*



**الفصل الثالث**

**المواد وطرائق**

**العمل**

**Materials and Methods**

## Materials and Methods

## 3- المواد وطرائق العمل

## 1.3 - المواد والاجهزة المستعملة في الدراسة

## 1.1.3 - الأجهزة المختبرية Instruments of laboratory

الجدول 1: الأجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الجهاز		ت
Boeco(Germany)	Light microscope	مجهر ضوئي	1
Hamburg(Germany)	Cell-DYN Ruby	عداد دم	2
Elektro.mag (Turkey)	Incubator	حاضنة	3
Elektro.mag (Turkey)	Electric oven	فرن كهربائي	4
Gallenkamp(England)	Water bath	حمام مائي	5
Bioneer (Korea)	Exispin vortex centrifuge	المازج	
Concord (Lebanon)	Refrigerator	ثلاجة	7
South Koya	Shaking incubater	حاضنة هزاز	8
Gallen Kaamp(England)	Sensitive electronic balance	ميزان الكتروني حساس	9
Germany	Microcentrifuge	جهاز طرد مركزي الدقيق	10
Matini(USA)	PH-meter	مقياس الأس الهيدروجيني	11
Triup (Italy)	Distillator	جهاز التقطير	12
Triup (Italy)	Centrifuge	جهاز الطرد المركزي	13
Triup (Italy)	Autoclave	موصدة	14
China	Micro camera	كاميرة مجهرية	15
South Koya	Digital Camera HD	كاميرا رقمية	16
Bioneer (Korea)	Thermocycler apparatus(PCR)	جهاز الدوار الحراري	17
BioRad (USA)	Miniopticon Real-Time PCR		18
THERMO (U.K)	Nanodrop spectrophotomerter		19
Eppendorf (Germany)	High speed cold centrifuge		20

### 2.1.3- الأدوات المختبرية Equipments

الجدول 2: الأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها.

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الأداة		ت
Jiassco (India)	Cylinder	أسطوانة مدرجة بأحجام مختلفة	1
Himedia (India)	petri dishes	أطباق بتري بلاستيكية	2
Pyrex (England)	Test tubes	أنابيب اختبار	3
Jiassco (India)	Conical flasks	دوارق مخروطية	4
Sterileo. (China)	Syringe	سرنج	5
Superstar (India)	Slides with cover it	شرائح زجاجية مع أغطيتها	6
Supreme (China)	Wooden sticks	عيدان خشبية	7
Pyrex (England)	Screw cap bottles	قناني مُحكمة الغلق	8
Greatglove (Malaysia)	Latex gloves	كفوف	9
Top dragon (Europe)	Pipettes	ماصات بأحجام مختلفة	10
Sigma (Spain)	Milipore filter paper	مرشحات غشائية دقيقة (0.22 – 0.45 µm)	11
Lab – service (Spain)	Sterile swabs	مسحات قطنية معقمة	12
Lab – service (Spain)	Transport swabs	مسحات مع أوساط ناقلة	13
John Bolton (England)	Standard wire loop	الناقل الزرعي القياسي	14
Germier (Germany)	Filter papers	ورق ترشيح	15

### 3.1.3- المضادات الحيوية Antibiotics

الجدول 3: المضادات الحيوية المستعملة خلال الدراسة.

الشركة المصنعة	البلد المصنع	تركيزه	اسم المادة	
Himedia	India	100Unite	Amphotericin-B	الامفوترسين B
شركة الصناعات الدوائية المتطورة	عمان-الاردن	100mg	Chloramphenicol	كلورامفينيكول

## 4.1.3- المواد الكيميائية Chemical Materials

الجدول 4: المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم المادة	ت
BDH (England)	Methylene blue	1 ازرق المثلين
BDH (England)	Aceton	2 اسيتون
BDH (England)	Isopropanol	3 ايزوبروبانول
Oxoid (England)	Peptone	4 ببتون
Fluka (Germany)	Phenol crystals	5 بلورات الفينول
Fluka (Germany)	Tween-80	6 توين-80
BDH (England)	Sulfuric acid	7 حامض الكبريتيك
BDH (England)	Lactic acid	8 حامض اللاكتك
BDH (England)	lead acetate	9 خلات الرصاص $Pb(CH_3COO)_2$
Mast UK	Yeast extract	10 خلاصة الخميرة
Fluka (Germany)	Phosphate buffer solution (PBS)	11 دارئ الفوسفات الملحي
BDH (England)	Dextrose	12 دكستروز
BDH (England)	Sucrose	13 سكروز
BDH (England)	Crystal violet stain	14 صبغة البلورات البنفسجية
Remel USA	AIP -Candida	15 عدة التشخيص الخمائر
BDH (England)	Phenol red	16 فينول احمر
BDH (England)	Galactose	17 كالكتوز
BDH (England)	Alcohol	18 الكحول 95 %
BDH (England)	Chloroform	19 كلوروفورم
Fluka (Germany)	Sodium chloride	20 كلوريد الصوديوم
BDH (England)	Glucose	21 كلوكوز
BDH (England)	Glycerol	22 كليسرول
BDH (England)	Lactose	23 لاكتوز
BDH (England)	Maltose	24 مالتوز
BDH (England)	Normal saline	25 محلول الملح الفسيولوجي
Difco (USA)	Potassium hydroxide	26 هيدروكسيد البوتاسيوم
BDH (England)	Iodine	27 يود
BDH (England)	Potassium iodide	28 يوديد البوتاسيوم
Oxoid (England)	Urea	29 اليوريا

## 5.1.3-الأوساط الزرعية Culture media

الجدول 5: الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها

الشركة المصنعة	اسم الوسط		ت
Difco USA	Chrom agar candida	كروم اكار	1
	Tryptic broth	تريبتك السائل	2
Himedia India	Sabouraud's Dextrose agar (SDA)	سابرود دكستروز اكار	3
Oxide UK	Chrom meal Agar(CAM	اكار طحين الذره	4
	Nutrient agar	الاكار المغذي	5
	Urea Agar	اكار اليوريا	6
حضر في المختبر	Hypertonic Sabouraud s Broth (HSB)	مرق السابرويد السائل الملحي	7
	Milk agar	اكار الحليب	8
	Sugar Fermentation Media (SFM)	وسط تخمر السكريات	9

## Diagnostic kit

## 6.1.3 - العدة التشخيصية

الجدول 6: جميع العدة التي استعملت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ

الشركة وبلد المنشأ	مكوناتها	اسم العدة	ت
Bioneer (Korea)	Trizol Reagent 100ml	<b>Kit AccuZol™ Total RNA Extraction</b>	1
Bioneer (Korea)	Rocket Script Reverse Transcriptase (200 u)	<b>AccuPower® RocktScript RT PreMix</b>	2
	5× Reaction Buffer (1×)		
	DTT (0.25 mM)		
	dNTP (250 µM each)		
Bioneer (Korea)	RNase Inhibitor (1 u)	<b>AccuPower® 2× Greenstar qPCR Master Mix</b>	3
	2× Greenstar Master mix		
	8 Well strips × 12 each		
BioBasic (Canada)	DEPC – D.W. 1.8 ml × 4 tubes	<b>DNase I enzyme set kit</b>	4
	DNase I enzyme		
	10X buffer		
	Free nuclease water		

## 7.1.3-البادئات Primers

تم استعمال البادئات الخاصة بجينات الضراوة لخميرة *C. albicans* وهذه البادئات تم تصميمها لهذه الدراسة باستعمال موقع NCBI GenBank Data و برنامج تصميم البادئات Primer3 plus وقد تم تجهيز هذا البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية كما في الجدول 7:

الجدول 7: بادئات الدنا (DNA primers) وتسلسل قواعدهما

Primer	Sequence		Amplicon
<i>ALS1</i>	F	5'- AGCGGTTCTCATGAATCAGC-3'	133bp
	R	5'-CAGAAGAAACAGCAGGTGATGG-3'	
<i>HWP1</i>	F	5'- TCAGTTCCACTCATGCAACC-3'	102bp
	R	5'- AGCAGCACCGAAAGTCAATC-3'	
<i>SAP1</i>	F	5'-GTTGGTTTTGGTGGTGCTTC-3'	115bp
	R	5'- AATCACCAGCAGCCTCATTG-3'	
<i>SAP2</i>	F	5'- AGATCAGCTGGTTTCGTTGC -3'	108bp
	R	5'-TGGGACAGCTTGTCTTTTGG-3'	
<i>SAP3</i>	F	5'-TCTCCAGGGTTTGTGCTTTG-3'	106bp
	R	5'-CAGTTTGTCTCTTGACGTTGACG-3'	
<i>SAP4</i>	F	5'-GCGGCTCTTTAGTTGATTTGCC-3'	103bp
	R	5'-ACACCAGCGTTGACATTGAC-3'	
<i>SAP5</i>	F	5'-TTCCAAAATGGCGTGGTGAC-3'	83bp
	R	5'-ATTTTGGGAAGTGCGGGAAG-3'	
<i>SAP7</i>	F	5'-TGAAGGCAGTGCACATTTC-3'	133bp
	R	5'-TGAACCACCGGAAAAGATCCC-3'	
<i>Act1</i>	F	5'-TGTGTAAAGCCGGTTTTGCC-3'	136bp
	R	5'-TTGGATTGGGCTTCATCACC-3'	

Genbank code: *ALS1*: XM\_712984.1, *HWP1*: XM\_704869.1, *SAP1*: XM\_712894.1, *SAP2*: XM\_705955.1, *SAP3*: XM\_717970.1, *SAP4*: XM\_712895.1, *SAP5*: XM\_714054.1, *SAP7*: XM\_708473.1, and *Act1*: XM\_717232.1.

## 2.3- طرائق العمل Methods

## 1.2.3- تحضير الاوساط الزرعية Preparation of culture media

استعملت العديد من الاوساط الزرعية في تنمية وعزل وتشخيص وحفظ مزارع الخمائر وقد تم تحضير كل منها بالاعتماد على تعليمات الشركات المنتجة، وهذه الاوساط شملت :

## 1. وسط السابروود دكستروز أكار مع الكلورمفينيكول

**Sabouraud s Dextrose Agar (SDA)with Chloramphenicol**

حضر هذا الوسط بإذابة 65 غم من وسط أكار السابروود الجاهز في 1000 مل من الماء المقطر عقم الوسط بالموصدة برد إلى درجة 45 م ثم أضيف 250 ملغم من المضاد البكتيري الكلورامفينيكول وضبط الأس الهيدروجيني عند 5.6 الغرض منه تنمية الخمائر وتشخيصها وحفظها (Kwon – Chung & Bennett , 1992) .

2. وسط كروم اكار **Chrom agar candida medium**

حضر هذا الوسط بإذابة 47.7 غم من وسط كروم اكار في 1000 مل ماء مقطر وسخن حتى الغليان ولا يحتاج هذا الوسط التعقيم بجهاز المؤصدة واستعمل للتمييز انواع الـ *Candida sp.* (Horvath *etal.*,2003) .

## 3. وسط مرق السابروود السائل الملحي

**Hypertonic Sabouraud s Broth (HSB) medium**

حضر بإذابة 10 غم بيتون و 20 غم من الدكستروز في 1000 مل من الماء المقطر و اضيف له (6.5) غم من كلوريد الصوديوم NaCl رج الوسط وعقم بالموصدة بعد التعقيم اضيف اليه 0.05 غم من مضاد الكلوروميثنيكول ثم وزع في انابيب اختبار معقمة استعمل للتفريق بين *C. albicans* و *C. dubluiniensis* حيث تنمو الـ *C. albicans* بمستعمرات بيضاء اللون ولا تنمو *C. dubluiniensis* عليه (Alves *et al.*,2002) .

4. وسط تخمير السكريات **Sugar Fermentation Media (SFM)** : حضر هذا الوسط بإذابة 10

غم بيتون و 5 غم كلوريد الصوديوم ، 5 غم خلاصة الخميرة ، و 0.018 غم من صبغة الفينول الاحمر في لتر من الماء المقطر ضبط pH الى 7.4 ثم وُزعت المحتويات في أنابيب اختبار وأضيف لكل منها

أنبوبة درهم (Durhams tube) بعدها تركت الانابيب لتبرد بدرجة حراره 45 م عندئذ اضيف 0.5 مل من المحلول السكري (السكروز ، مالتوز ، كلوكوز ، لاكتوز ، كالكثوز) المحضر بتركيز 2 % والمعقم ورق الترشيح الدقيق، استعمل لاختبار قدرة الخمائر على تخمير السكريات ( Rose and Harisson,1969).

### 5. وسط اكار طحين الذرة (Corn Meal Agar Media (CMA)

حُضِرَ بإذابة 17 غم من مسحوق اكار طحين الذرة 1000 مل من الماء المقطر ثم مُزج جيداً و عقم بالموصدة بعدها وزع على أطباق معقمة و استعمل لملاحظة الخيوط الكاذبة و الأبواغ الكلاميدية (Chlamyospore) للمبيضات البيضاء (Koneman and Robert , 1985).

### Milk Agar Media

### 6. وسط اكار الحليب

تم تحضير وسط الاكار المغذي بإضافة 28 غم في لتر ماء مقطر وتعقيمه بالموصدة مدة 20 دقيقة و بالوقت نفسه حضر 10 % من الحليب منزوع الدسم في 90 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل ، عقم بالموصدة لمدة (5) دقائق ، ثم برد الى درجة حرارة 50 م . اضيف وهو في درجة حرارة 50 م الى وسط الأكار المغذي المبرد الى درجة 50 م ، تم مجانسة الخليط برجه جيداً ثم صب في اطاق معقمة وترك ليتصلب، حضنت الاطاق بصورة مقلوبة في الحاضنة مدة 24 ساعة وفي حرارة 37 م . للتأكد من عدم تلوث الاطاق لاختبار قدرة *C. albicans* على تحليل البروتين (Larone ,1993).

### Urea agar medium

### 7. وسط أكار اليوريا

حضر بإذابة 2.5 غم من وسط أكار اليوريا الأساس ( Urea Agar Base ) في 95 مليلتر من الماء المقطر، وعقم الوسط بالموصدة في الظروف الاعتيادية تم تبريده الى درجة 50 م وبعدها أضيف إليه 5 مل من محلول اليوريا المعقم بالترشيح (0.22m) وبتركيز (40%) ، ثم وزع في أنابيب بمقدار 5 مل وبشكل مائل استعمل الوسط للتفريق بين المبيضات وخميرة *Cryptococcus* sp (Macfaddin,2000).

8. وسط **Tryptic soy broth** المضاف له (1%) كلوكوز: حضر الوسط بإذابة 30 غم في لتر من الماء المقطر ثم ضبط pH عند 7 وتم تعقيم الكلوكوز في حمام مائي بدرجة حرارة 63 م لمدة نصف ساعة ثم اضيف المحلول السكري للوسط المحضر المعقم والمبرد بنسبة 1 % يستخدم في اختبار تكوين الأغشية الحيوية (Chandra et al .,2001).



### 2.2.3- الصبغات والمحاليل Stains and Solutions

#### Lactophenol Blue Stain

#### 1. صبغة اللاكتوفينول الزرقاء

حضرت كما أوردها ( Ellis (1994) وذلك بإذابة 20 غم من الفينول البلوري في 20 مل من حامض اللاكتك و 40 مل من الكليسروول و 20 مل من الماء المقطر ثم أضيفت صبغة ازرق المثلين بمقدار 0.075 غم، استعملت هذه الصبغة لتشخيص الخمائر المعزولة.

#### Crystal violet dye

#### 2. صبغة الكريستال البنفسجية

حضرت صبغة الكريستال البنفسجية بتركيز (1%) (Chandra et al., 2001) استخدمت في اختبار الاغشية الحيوية .

#### 3. محاليل السكريات Sugars Solutions

حضرت خمسة محاليل من السكريات (السكروز ، مالتوز ، كلوكوز ، لاكتوز ، كالكثوز) وبتركيز (2) % وذلك بإذابة (2) غم من السكر في ( 100 ) مل من الماء المقطر المعقم وتستخدم في اختبار نخر السكريات ( Baron et al., 1994 ) .

#### Sterilization methods

#### 3.3- طرائق التعقيم

#### Wet hot Sterilization

#### • التعقيم بالحرارة الرطبة

عقمت الأوساط الزرعية بجهاز الموعدة الحرارية ( Autoclave ) بدرجة حرارة (121)م بضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> ولمدة 15 دقيقة. (Benson, 2002)

#### Dry hot Sterilization

#### • التعقيم بالحرارة الجافة

عقمت الزجاجيات المستعملة في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 160 م ولمدة ساعة ونصف. (Benson, 2002)

#### Sterilization by Filtration

#### • التعقيم بالترشيح

تم تعقيم المواد والمحاليل التي تتأثر بالحرارة باستعمال مرشحات دقيقة Millipore filters بقطر 0.22 مايكروميتر (Benson, 2002) .

## 4.3- جمع العينات

**جمعت العينات** للفترة من الاول من اذار 2016 ولغاية نهاية اب 2016 وتضمنت مجموعتين

**المجموعة الاولى:** جمعت 100 عينة ( مسحات قطنية من القرحة الفموية بعد غسله بالماء المقطر 3 مرات و دم وريدي )من المرضى المصابين بالسرطان خلال العلاج الكيماوي او الاشعاعي والذين ظهرت لديهم اصابات فموية بداء المبيضات (Oral candidiasis) والمشخصة من قبل الطبيب المختص (د.علاء عبد الرزاق العنبيكي) للمرضى المراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي/شعبة الاورام

**المجموعة الثانية:** جمعت 100 عينة ( مسحات قطنية من القرحة الفموية بعد غسله بالماء المقطر 3 مرات و دم وريدي )من اشخاص غير مصابين بأمراض مزمنة (عينات السيطرة)

## 5.3- الفحوصات المختبرية للعينات

## 1. تعداد خلايا الدم البيض

فحصت العينة باستعمال جهاز Cell-DYN Ruby واتباع الخطوات الخاصة بالشركة سجلت النتائج .

## 2. المسحات الفموية

## أ- الفحص المجهرى المباشر Direct microscopical Examination

مسح جزء من العينة المأخوذة بالمسحات على شريحة زجاجية وأضيف إليها قطرة من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 10 % ثم غطيت بغطاء الشريحة ومررت على اللهب وذلك بتحريكها فوق اللهب مرتين او ثلاث مع تجنب الغليان وبعدها فحصت بالمجهر تحت القوة X 10 ثم القوة X 40 للتأكد من وجود الخمائر (Koneman and Robert , 1985).

## ب- الفحص غير المباشر

زرعت العينات المأخوذة بالمسحات على وسط السابورد دكستروز اكار بواقع طبقتين حضن الاول بدرجة 37 م والثاني بدرجة 28 م لمدة تتراوح بين (24-48) ساعة (Ellis ,1994).

### 6.3- التثخيص Identification

أ- الخصائص المظهرية **Morphological Characteristics** فُحص المظهر الخارجي للمستعمرات والمتضمن شكل ولون و قطر المستعمرة وارتفاعها بعد أن زرعت على وسط (SDA) (De Hooge *et al.*, 2000 )

ب- الخصائص المجهرية **Microscopic Characteristics** حُضرت شريحة زجاجية من المستعمرات مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي (Normal Saline) ، و غطيت بغطاء الشريحة الزجاجية و فحصت بالمجهر الضوئي بعد صبغها بصبغة الكريستال البنفسجية لملاحظة شكل وحجم الخميرة وتبرعمها (De Hooge *et al.*, 2000).

#### ج-الإختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

##### 1. فحص اليوريا Urease Test

أُجري هذا الاختبار كما ورد في (DeHoog *et al.*, (2000) إذ أخذت أنبوبة اختبار حاوية على وسط اليوريا وباستعمال أبره تلقيح، وأُفحت الانبوبة بالخمائر المراد تشخيصها على ان تكون المستعمرات بعمر 10 أيام وحُضنت بدرجة 30 م° ولمدة 24 ساعة ، وأي تغير في لون الوسط سُجل من يومين الى ثلاثة اسابيع .التحلل التام لليوريا حوّل لون أوسط من الاصفر الى الأحمر أو الوردى الغامق وفي التحلل الجزئي لليوريا تغير لون أوسط من الأصفر الى الوردى الفاتح وعند بقاء لون الوسط اصفر يشير الى عدم قدرة الفطر على تحلل اليوريا واستعمل هذا الاختبار لغرض التفريق بين *Candida* و *Cryptococcus* .

##### 2. اختبار النمو على وسط كروم اكار Growth test on Chrom Agar

تم هذا الاختبار بأخذ جزء من مستعمرة الخميرة النامية على وسط SDA لمدة 24 ساعة وزرعت على وسط كروم اكار وحضنت لمدة (24-48) ساعة بدرجة حرارة 37 م° حيث ظهرت خميرة *C. albicans* بلون أخضر و *C. glabrata* و ردي فاتح الى كريمي بينما *C.krusei* و ردي غامق اما *C.dublinsiensis* اخضر مزرق داكن (Horvath *et al.*,2003) .

##### 3. اختبار تكوين الأنبوب الجرثومي Germ tube Forming test لإجراء هذا الاختبار عُلق

مستعمرة نقية من الخميرة في إنبوب إختبار حاوي على 0.5 مل من مصل الإنسان، حُضِنَ المزيج بدرجة حرارة 37 م° لمدة لا تزيد عن 3 ساعات أُخذت بعد ذلك قطرة من العالق

ووضعت على شريحة زجاجية وفُحصت مجهرياً لمشاهدة أنبوب الإنبات وهذا الفحص مميز للنوع *C. albicans* إذ نلاحظ بروز الأنبوب الجرثومي من إحدى جوانب الخلية بشكل تبرعم بطول (3 – 4) مرات من طول الخلية نفسها (Ellis et al.,2007).

#### 4. اختبار التشكل الثنائي Dimorphic Test

تم التحري عن قابلية خميرة *C. albicans* قيد الدراسة على تكوين الشكل الخيطي و الخميري من خلال تلقيح الخميرة على طبقتين يحتويان على وسط SDA حضن الاول بدرجة 37 م° والثاني حضن بدرجة 25 م° لمدة (24-48) ساعة فحصت العينات تحت المجهر بقوة تكبير X (40) ( Ellis 1994).

#### 5. القابلية على تكوين الابواغ الكلاميدية Chlamydospores Forming test

تم التحري عن قابلية عزلات خميرة *C. albicans* قيد الدراسة على انتاج الابواغ الكلاميدية وذلك عن طريق استعمال وسط طحين الذرة (Corn Meal Agar) حيث تم اخذ لقاح قليل من مستعمرة الخميرة بواسطة ابرة معقمة وخطط على سطح الوسط في الطبق وحضن لفترة (3-5) يوم بدرجة 25 م° وتم اخذ لقاح من المستعمرة وعلقت في صبغة اللاكتوفينول على شريحة زجاجية وفحصت باستعمال المجهر الضوئي للتحري عن وجود الابواغ الكلاميدية او عدم وجودها (Kangoga et al.,2011).

#### 6. اختبار قدرة الخميرة على النمو في درجة حرارة 45 م°

يستخدم للتمييز بين الخمائر التي تظهر متقاربة على وسط SDA مع لون خميرة *C. albicans* وتم الاختبار بالاعتماد على ماورد في (Pinjon et al.,1998) وذلك بتتمية الخمائر على وسط SDA في درجة 45 م° لمدة (48-72) ساعة عند ظهور النمو دلالة على وجود خميره *C. albicans*.

#### 7. اختبار مرق السابروود الملحي Hypertonic Sabouraud s Broth (HSB) test

لقد وصف هذا الاختبار من قبل (Alves et al.,2002) ، وذلك بعزل مستعمرة من وسط SDA بعد 48 ساعة من الحضن حيث تم وضع هذه المستمرة مع 5 مل من الماء المقطر في انابيب اختبار واخذ 2 مل من هذا الخليط واضيف الى انابيب اختبار حاوية على 5 مل من وسط السابروود الملحي المعقم حضنت الانابيب لمدة (96) ساعة بدرجة حرارة (30) م° وبعدها فحصت

الانابيب فكانت عكورة في انبوبة الاختبار دلالة على انها *C. albicans* وعدم وجود العكوره دلالة على عدم وجودها.

### 8. القابلية في تخمير السكريات Sugar Fermentation

تم على وفق ماجاء به (Lodder 1974) وذلك بأضافة 2 مل من وسط تخمر السكريات الى انابيب اختبار حاوية على انبوب درهم (Durham tube) بوضع مقلوب واضيفت لها 2 مل من محلول السكر الخزين للسكريات(سكروز، كلوكوز ، مالتوز ، لاكتوز، كالكتوز ) واضيفت قطرات من احمر الفينول (Phenol red) الى حين تغير لون الوسط الى الاحمر ثم لقت الانابيب بعالق الخميرة وحضنت بحرارة 30 م° وتمت متابعة النتائج كل يوم ولمدة 10 ايام وملاحظة تغير اللون الاحمر الى الاصفر وتكون الغاز في انابيب درهم.

**9-التشخيص بنظام API - Candida system** : استعملت عدة تشخيص جاهدة في التشخيص الكيموحيوي للتأكد من الأنواع المعزولة على وفق تعليمات الشركة المجهزة اذ يتكون النظام من شريط (strip) يحتوي على 10 حفر صغيرة تحتوي 10 منها على مواد أساس (Dehydrated Substrate) لتحديد نمط استهلاك الخميرة لهذه المواد.

### 7.3- التحري عن بعض عوامل الضراوة لخميرة *C. albicans*

#### 1. اختبار القدرة على الالتصاق Adherene Ability Test

##### أ- تحضير عالق الخلايا الطلانية لتجربة الالتصاق

تم الحصول على الخلايا الطلانية المبطنة للتجفيف الفمي من اشخاص غير مصابين بامراض مزمنة بواسطة مسحة قطنية معقمة بعد غسل الفم بمحلول الملحي الفسلجي المعقم ثلاث مرات ثم مررت المسحة على بطانة الخد الطلانية عدة مرات لرفع أكبر عدد من الخلايا الطلانية ثم نقعت المسحات في محلول دارى الفوسفات الملحي PBS (pH=7) لمدة 10 دقائق مع المزج بهدوء لفصل الخلايا من المسحة وجمعها في المحلول الدارى مع النبذ المركزي بسرعة (3000) دورة / دقيقة لمدة (5) دقائق غسلت الخلايا بمحلول PBS ثلاث مرات وعلق الراسب بمحلول PBS واستعملت في قياس قدرة انواع المبيضات على الالتصاق بها(Chritchaly and Douglas.,1987)

**Adherence ability****ب- اختبار القدرة على الالتصاق**

اعتمدت طريقة (Chritchaly and Douglas (1987) وكما يلي :

- مزج 0.5 مل من عالق خلايا المبيضات مع 0.5 مل من عالق الخلايا الطلائية في انبوبة معقمة
- حضن المزيج في حاضنة هزاز بسرعة 40 دورة /دقيقة اهتزاز بطيء في درجة 37 م لمدة ساعة واحدة وكررت العملية وبالطريقة نفسها عند 24 م لمدة ساعة واحدة
- عرض المزيج بعد ذلك الى النبذ المركزي وبسرعة (1000) دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق
- اهلل الرائق وعلق الراسب ب PBS للتخلص من خلايا الخميرة غير الملتصقة
- اخذ قطرة من الخلايا المعلقة وفرشت على شريحة زجاجية نظيفة ،جففت وثبتت بالذهب وصبغت بصبغة البلورات البنفسجية (Crystal violet) وفحصت بالمجهر الضوئي لمشاهدة الخلايا الملتصقة .

**ت- اختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Test**

للتحري عن تكوين الأغشية الحيوية للخميرة *C.albicans* اعتمدت على زيادة إنتاج السكريات المتعددة الخارجي ( Exopolysaccharide ) كما يأتي:

تم اعتماد طريقة الباحث (Chandra et al. (2001) لاختبار قدرة الخميرة على تكوين الاغشية الحيوية اذ نقل جزء من مستعمرات الخميرة بواسطة الناقل الى انابيب اختبار زجاجية حاوية على وسط Tryptic soy broth المضاف له 1% كلوكوز وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ، بعد انتهاء فترة الحضن سكبت العينات وتم غسل الانابيب بمحلول الفوسفات الملحي المنظم Phosphate (buffer saline) ثم جففت وبعدها صبغت بصبغة الكريستال البنفسجية ( Crystal violet ) بتركيز 1% لمدة ثلاث دقائق ثم سكبت الصبغة الزائدة وغسلت بالماء المقطر الخالي من ايونات العسرة وبعدها تركت الانابيب لتجف بشكل مقلوب لملاحظة الاغشية الحيوية على الجدران الداخلية وقعر الانابيب بشكل طبقة بنفسجية .

**3-اختبار انتاج البروتيز Proteinase Test**

لقح وسط اكار الحليب بنقل مستعمرة فتية بعمر (18-42) ساعة بلقاح على شكل بقع ،على وسط الحليب ، حضنت الاطباق في درجة حرارة 35 م لمدة (24- 48) ساعة وتقرأ النتيجة الموجبه من خلال تكون منطقة شفافة حول منطقة التلقيح دليل على ايجابية الاختبار ( Al - Dabagh , 2015 ).

### 8.3- حفظ العزلات Isolates Keeping

زرعت عزلات *C. albicans* في قناني خاصة سعة 20 مل ملأت بوسط السابروود دكستروز أكار بشكل مائل، وضعت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° ، ولمدة شهرين بعدها تم إعادة زرعها على وسط السابروود دكستروز أكار في طبق بتري ، واعدت العملية مرة أخرى (Kwon – Chung & Bennett, 1992)

### 9.3- تحضير المستخلص المائي لبذور نبات المورينجا اوليفيرا

أخذ (500)غم من قرنات نبات *Moringa oleifera*، وتمت إزالة اغلفة القرنة وتم تحويلها بالطريقة اليدوية إلى مسحوقٍ ناعمٍ باستعمال المدقة، والنتيجة عن تلك العملية تم استخلاصه مائياً وبشكلٍ مباشرٍ على وفق طريقة (Price (2000) التي تنص على أخذ وزن 100 غم من مسحوق البذور ويسخن بـ 500 مل من الماء المقطر في حمام مائي عند درجة حرارة 70 م° لمدة 15 دقيقة ومن ثم ترشيحه باوراق الترشيح ووضع الراشح في الثلاجة حتى يتجمد لتكتمل عند ذلك عملية الاستخلاص بعدها وضع المستخلص في وعاء نظيف لحين الاستعمال ، تم إعداد التراكيز المختلفة منه وهي (15، 25، 35، 50، 75، 90) % بعدها عقت التراكيز باستعمال اوراق الترشيح الدقيقة Millipore filter paper (0.45) مايكرون .

### 10.3- الكشف النوعي لبعض المواد الفعالة في المستخلص المائي لبذور *Moringa oleifera*

تم اجراء مجموعة من الكشوفات النوعية وذلك لمعرفة المركبات الفعالة الموجودة في المستخلص والتي تعطي فعالية مضادة لخميرة المبيصات :

#### أ- الكشف عن القلويدات Alkaloidis Detection

تم الكشف عن القلويدات باستعمال كاشف وانكر (Wangner reagent) كما جاء في (Fahmy(1933) واتباع الخطوات التالية :

1. حضر باذابة 1.3 غم من اليود مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر
2. اضيف عدة قطرات من الكاشف الى مل من المستخلص المائي في انبوبة اختبار
3. عند تكون الراسب بني دليل على وجود القلويدات

**ب- الكشف عن التانينات Tannins Detection**

تم الكشف عن التانينات باستعمال كاشف خلات الرصاص Lead acetate test

1. حضر المحلول بإذابة 1 غم من خلات الرصاص في 100 مل من الماء المقطر
2. اضيفت عدة قطرات من الكاشف الى انبوبة اختبار تحوي 0.5 مل من المستخلص
3. يدل ظهور راسب ابيض هلامي القوام على وجود التانينات (Shihata,1951).

**ج-الكشف عن الصابونيات Detection of Saponins**

تم الكشف عن الصابونيات باستعمال طريقة الرغوة الكثيفة وذلك بوضع المحلول المائي في انبوبة اختبار وتم رجها بشدة ، وظهر رغوة كثيفة تبقى لفترة طويلة هي نتيجة موجبة للكشف (شامي، 1982).

**د-الكشف عن الفلافونيدات Detection of Flavonoids**

تم الكشف باستعمال حامض الكبريتيك المركز

1. حضر بإذابة 1 مل من المستخلص في 1 مل من حامض الكبريتيك المركز
2. ظهور اللون الاصفر الداكن دليل على ايجابية الكشف (AL-Khazragi ,1991).

**11.3- اختبار الحساسية الدوائية Antifungal Sensitivity****• تحضير عالق الخميرة**

تم تحضير اللقاح الفطري بالاعتماد على ما أورده Mc Ginnis,(1980) وذلك بنقل جزء من المستعمرات النامية على وسط SDA بعد تنشيطها وذلك باستعمال ابرة معقمة ووضعها في انبوبة محكمة الغلق (Vial) حاوية على 5 مل من المحلول الفسلجي (Normal saline) ورج المحلول جيدا ثم حسبت اعداد الخلايا الفطرية باستعمال شريحة عد الخلايا Hemocytometer للحصول على تركيز  $10^{10}$  خلية /مل .

**• اختبار الحساسية الدوائية بالاعتماد على طريقة الانتشار بالحفر**

1. اخذ 0.2 مل من عالق الخميره ونشر على سطح وسط (SDA) المحضر سابقا في إطباق بتري باستعمال ناشر بشكل حرف (L-Spreader) تركت الأطباق بعد تلقحها لمدة 30 دقيقة ،



2. عملت حفر 5 ملم في الوسط الملقح بواسطة ثاقب الفلين .
3. أضيف 0.1 مل من تراكيز المستخلص المحضرة سابقا الى كل حفرة بواسطة ماصة دقيقة (Micro pipette) بالإضافة الى استعمال قرص من مضاد Amphotericin B لغرض المقارنة مع المستخلص ، وحفره اضيف لها 0.1 مل ماء مقطر كسيطرة ، وبثلاث مكررات لكل معاملة وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة .
4. قيس قطر منطقة تثبيط النمو حول الحفر وقرص المضاد الحيوي بوحدة المليمتر (Prize et al.,1990).

### 12.3- الفحوصات الجزيئية Molecular testes

#### اولا : تحضير عالق الخميرة

حضر عالق الخميرة بالاعتماد على طريقة Clayton et al.(2004) وكما يلي:

1. نقل جزء من المستعمرات النامية على وسط SDA باستعمال ابرة معقمة ووضعها في انبوبة حاوية على وسط SDA السائل وحضنت بدرجة 37 م لمدة 48 ساعة لغرض التنشيط
2. عرض المزيج الى النبذ المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 3000 دورة /دقيقة
3. اخذ الراسب وغسل 3 مرات باستعمال دارئ الفوسفات الملحي PBS والنبذ بجهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 3000 دورة /دقيقة للتخلص من بقايا الوسط والحصول على خلايا نقية

#### ثانيا تحضير عالق الخلايا الطلائية

تم تحضير عالق الخلايا الطلائية كما في الفقرة 3-7

صُممت التجربة بتحضير أربع معاملات هي:

1. المعاملة الأولى (T1): مزج 0.5 مل من عالق الخميرة مع 0.1 مل مستخلص بذور *Moringa oleifera* بتركيز 25 % في انابيب ابندروف.
2. المعاملة الثانية (T2): مزج 0.5 مل من عالق الخميرة مع 0.5 مل من عالق الخلايا الطلائية للفم في انابيب ابندروف .
3. المعاملة الثالثة (T3): مزج 0.5 مل من عالق الخميرة مع 0.5 مل من عالق الخلايا الطلائية واطيف لهما 0.1 مل من مستخلص بذور *Moringa oleifera* بتركيز 25 % في انابيب ابندروف.

4. مجموعة السيطرة (C): وضعت 0.5 مل من عالق خلايا الخميرة في انابيب ابندروف حُصِنَت جميع المعاملات في درجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة ، وكُرِّرت المعاملات خمس مرات بعد ذلك أُكملت خطوات الـ qRT-PCR .

### 1.12.3- فحص تفاعل سلسلة البلمره في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)

#### Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR)

تم اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس المستويات الكمية للحامض النووي المرسل (mRNA) لدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجينات SAP7, SAP5, SAP4, SAP3, SAP2, SAP1, HWP1, ALS1 وكذلك استعمال جين الـ Act1 كجين منظم قياسي لحساب التعبير الجيني، وقد تم اجراء هذا الفحص للمعاملات الاربعة T1,T2,T3,C حسب طريقة Tavanti *et al.*,(2004) كما في الخطوات التالية:

#### اولا: استخلاص الاحماض النووية الكلي Total RNA extraction

تم استخلاص الحامض النووي Total RNA وذلك باستعمال عدة الـ Trizol kit المجهز من قبل شركة Bioneer الكورية ولقد تم العمل به حسب تعليمات الشركة المصنعة وكما في الخطوات التالية:

- 1-رُجَّ عالق المعاملات بجهاز المازج ثم أُخِذَ منه 1 مل ووضع في إنبوبة إبندروف.
- 2-وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين.
- 3- أهْمِلَ الطافي وأخذ الراسب تم اضيف 1 مل من محلول الـ Trizol ومزجت جيدة لمدة دقيقتين.
- 4- اضيف 200 مايكرو ليتر من مادة الـ Chloroform لكل عينه من العينات مع الرج لمدة 15 دقيقة بواسطة جهاز Vortex .
- 5- حضن الخليط في الثلج لمدة 10 دقيقة
- 6- وضع العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقيقة بسرعة 12000دوره/دقيقة.
- 7- نقل الطبقة العليا (الشفافة) الى انبويه ابندروف جديده بواسطة micropipette ونضيف اليها كميته متساوية من كحول isopropanol وقلبت الأنبوبة 4-5 مرات باليد.

- 8- حضن العينات بدرجة حراره -20 مْ لمدة 10 دقيقه .
- 9- وضع العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دوره\دقيقه لمدة(10) دقيقه ثم تخلصنا من الطافي واخذنا الراسب .
- 10- اضيف للراسب (1) مل من الكحول الايثلي بتركيز 80 % ورج رجا مستمرا بجهاز vortex ثم وضع الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعه (12000)دوره\دقيقه لمدة 5 دقيقه وتم التخلص من الطافي واخذ الراسب.
- 11-جفف المترسب بتركه بدرجه حراره الغرفة (55-60) مْ ولمدة 10 دقيقه بعد ذلك حفظ الحامض النووي RNA المستخلص في درجه حراره -70 مْ.

#### ثانيا: قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الريبوسومي

تم الكشف عن الحامض النووي RNA المستخلص وذلك من خلال استعمال جهاز خاص Nanodrop spectrophotometer وذلك من تحديد تركيز الحامض النووي الريبوسومي ng\µl RNA و قياس نقاوة الحامض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة (260/280 nm) على النحو التالي :

- 1- تم تشغيل جهاز Nanodrop وتم اختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع RNA.
- 2- تصفير الجهاز وذلك بوضع 2 مايكروليتر من (Free nuclease water) باستعمال ماصة دقيقة معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير ثم تم القيام بتنظيف الركيزة باستعمال أوراق تنشيف لقياس العينات.
- 3- الضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـ RNA وذلك باستعمال 1 ميكروليتر من كل عينة من الـ RNA المستخلص ومن ثم نقوم بتنظيف ركيزة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.
- 4- حددت نقاوة عينات ال RNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين 260/280 nm حيث ان الحامض النووي RNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي 1.8.

## DNase I Treatment

## ثالثا: المعاملة بانزيم

تم معاملة مستخلص الحامض النووي الريبوسومي RNA باستعمال DNase I treatment وذلك لتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الاستخلاص وذلك بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم كما في الجدول الآتي:

الجدول 8: عدة الإنزيم المستعملة للتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الإستخلاص

Mix	Volume
Total RNA 100ng/ul	10ml
DNase I enzyme	1 ml
10X buffer	4 ml
DEPC water	5 ml
Total	20 ml

بعد ذلك تم حضن المزيج في الحاضنة بدرجة حرارة 37م لمدة 30 دقيقة، وبعدها اضيف 1 ميكروليتر من مادة الـ EDTA وحضنت ايضا بالحمام المائي بدرجة حرارة 65م لمدة 10دقائق وذلك لتنشيط فعل الانزيم.

رابعا: طريقة تصنيع الـ **cdNA synthesis** تم استعمال طريقة تصنيع الحامض النووي cDNA المكمل لـ DNA من عينات الحامض النووي الـ RNA المستخلص باستعمال عدة Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وكما في الجدول الاتي:

الجدول 9: عدة كما المستعملة في عملية تصنيع الـ **cdNA synthesis**.

RT master mix	Volume
Total RNA 100ng/ ml	10μL
Random Hexamer primer 10pmol	1μL
DEPC water	9μL
Total	20μL

بعد ذلك تم اضافة مكونات مزيج RT master mix التي ذكرت في جدول 9 الى انابيب عدة cDNA synthesis والحاوية على انزيم الاستنساخ العكسي ( Reverse transcription ) ومن ثم وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المازج (Vortex centrifuge) بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 3 دقائق، بعد ذلك تم نقل الأنابيب الى جهاز الدوار الحراري ( Thermocycler ) وتم تطبيق الظروف الحرارية لعملية تصنيع ال cDNA حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول الاتي:

**الجدول 10: الظروف الحرارية لمراحل تصنيع ال cDNA حسب طريقة عمل العدة**

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

بعد ذلك نقلت العينات الحفظ بدرجة -20 م° لحين استعمالها في فحص Real-time PCR .

### خامسا: فحص Quantitative Real-Time PCR (qRT PCR)

تم اجراء فحص ال qPCR لعينات الـ cDNA لمجاميع التجربة باستعمال عدة Accupower 2x Green Star qPCR kit المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية، لإجراء هذا الفحص والحاوي على صبغة السايبر الخضراء والتي تتفاعل مع الجينات المتضخمة في جهاز الـ Real-Time PCR كما يأتي:

أ- تحضير مزيج تفاعل qPCR لجينات الهدف *SAP2, SAP7, SAP5, SAP4, SAP3, SAP1, HWPI, ALS1,*

**الجدول 11: مكونات مزيج تفاعل qRT-PCR لجينات الهدف**

qPCR master mix		Volume
cDNA template		2.5µL
Primers (10pmol)	Forward primer	1.25 µL
	Reverse Primer	1.25 µL
2x green star master mix		25
DEPC water		20 µL
Total		50 µL

ب-تحضير مزيج تفاعل qPCR جين المحافظ القياسي *Act1* genes

الجدول 12: مكونات مزيج تفاعل qRT-PCR للجين المحافظ

qPCR master mix		Volume
cDNA template		2.5µL
Primers (10pmol)	Forward primer	1.25 µL
	Reverse Primer	1.25 µL
2x green star master mix		25
DEPC water		20 µL
Total		50 µL

بعد ذلك تم اضافة المكونات التي ذكرت في الجداول اعلاه الى انابيب qPCR الخاصة ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 3 دقائق. وبعدها نقلت الى جهاز MiniOpticon Real-Time PCR وتم تطبيق الظروف الحرارية qPCR Thermocycler conditions لكل الجينات حسب طريقة عمل العدة وكما في الجدول 13:

جدول 13: الظروف الحرارية المثلى لمراحل qRT-PCR لجميع المورثات المقاسة بحسب طريقة عمل

العدة

qPCR step	Temperature	Time	Repeat cycle
Initial Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	45
Annealing\Extension Detection(scan)	58 °C	30 sec	
Melting	60-95°C	0.5 sec	1

## سادسا: طريقة تحليل بيانات Real-Time PCR data analysis

تم تحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلر في الوقت الحقيقي الكمي باستعمال طريقة livak method والتي وضعت من قبل (2001) Livak and Schmittgen والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية (Relative Quantitive) من خلال عملية تصحيح ومعادله الجينات الهدف مع عينات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بايولوجي وان كل عينه من عينات الهدف تصح مع عينة السيطرة لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي وكما في المعادلات التالية :

$$1- \Delta CT (\text{test}) = CT (\text{target, test}) - CT (\text{ref, test})$$

$$2- \Delta CT (\text{control}) = CT (\text{target, control}) - CT (\text{ref, control})$$

$$3- \Delta \Delta CT = \Delta CT (\text{test}) - \Delta CT (\text{control})$$

$$4- \text{Gene expression Ratio} = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

### 13.3- التحليل الاحصائي Statistical analysis

تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام مربع كاي ( $\chi^2$ ) Ch-square عند مستوى احتمالية  $P < 0.01$

(الراوي، 1995)

# الفصل الرابع

## النتائج والمناقشة

## Results and Discussion



## 1.4-العزل والتشخيص Isolation and identification

تم عزل وتشخيص اربعة انواع تابعة لجنس المبيضات خلال هذه الدراسة بالاعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية والبايوكيميائية التي ابدتها هذه الانواع ، ان بعض الصفات المدروسة استخدمت لتمييز المبيضات عن الخمائر الاخرى مثل اختبار تحلل اليوريا وصبغة الكريستال البنفسجية وشكل المستعمرات ولونها ودرجة الحرارة الملائمة للنمو في حين ان هنالك صفات اعتمدت للتمييز انواع المبيضات بعضها عن البعض الاخر مثل تكوين انبوب الانبات خلال 3 ساعة الذي يميز النوعين *C.albicans* و *C.dublinsiensis* عن باقي انواع المبيضات وكذلك اختبار تخمر السكريات و فضلا عن الألوان التي تظهر على وسط Chrom agar Candida كما في الجدول 14، و15 وكانت مطابقة تماما لما ورد في كل من Ellis et al.,(2007) و Horvath et al.(2003) ، صور 2،3،4

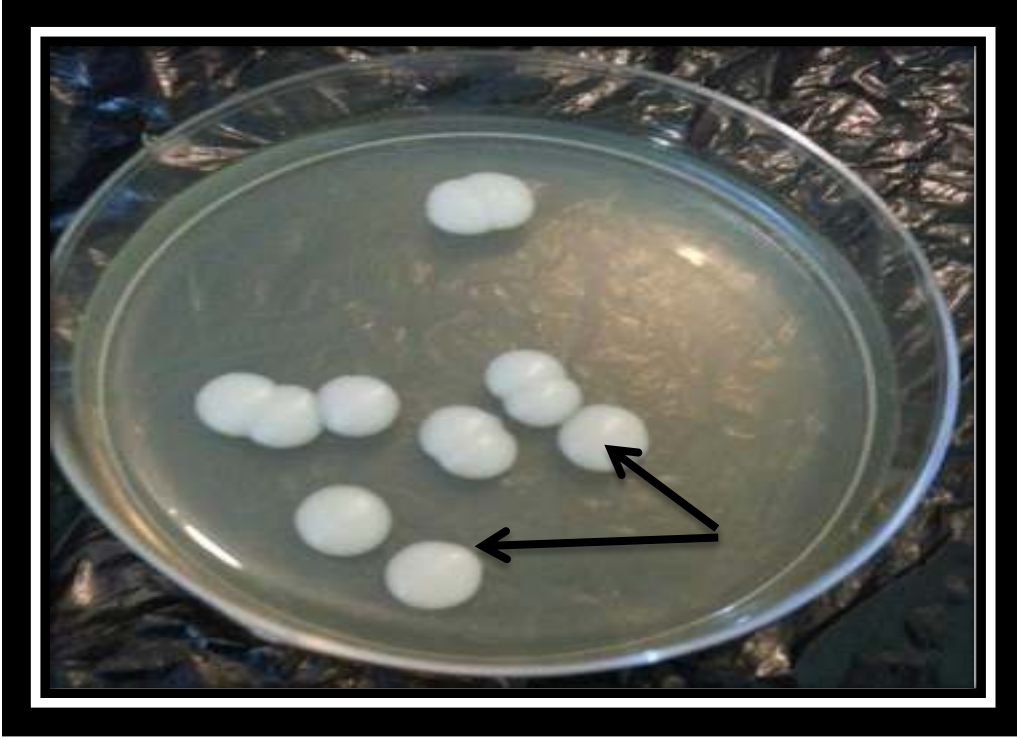
الجدول 14: الصفات المظهرية والمجهرية لأنواع المبيضات المعزولة

الانواع	الصفات المجهرية	صفات المستعمرات Chrom agar
<i>C. albicans</i>	موجبة لصبغة كرام كروية او شبه كروية متبرعمة مع ابواغ بلاستولية وتكون Germ tube في مصد دم الانسان	اخضر مضيء
<i>C. glabrata</i>	موجبة للصبغة كرام بأعداد كبيرة و بيضوية الشكل متبرعمة مع ابواغ بلاستولية	كريمي
<i>C.krusei</i>	موجبة لصبغة كرام ،صغيرة متطاولة الى بيضوية الشكل متبرعمة	وردي غامق
<i>C.dublinsiensis</i>	موجبة لصبغة كرام كروية او شبه كروية متبرعمة مع ابواغ بلاستولية وتكون Germ tube في مصد دم الانسان	اخضر مزرق داكن

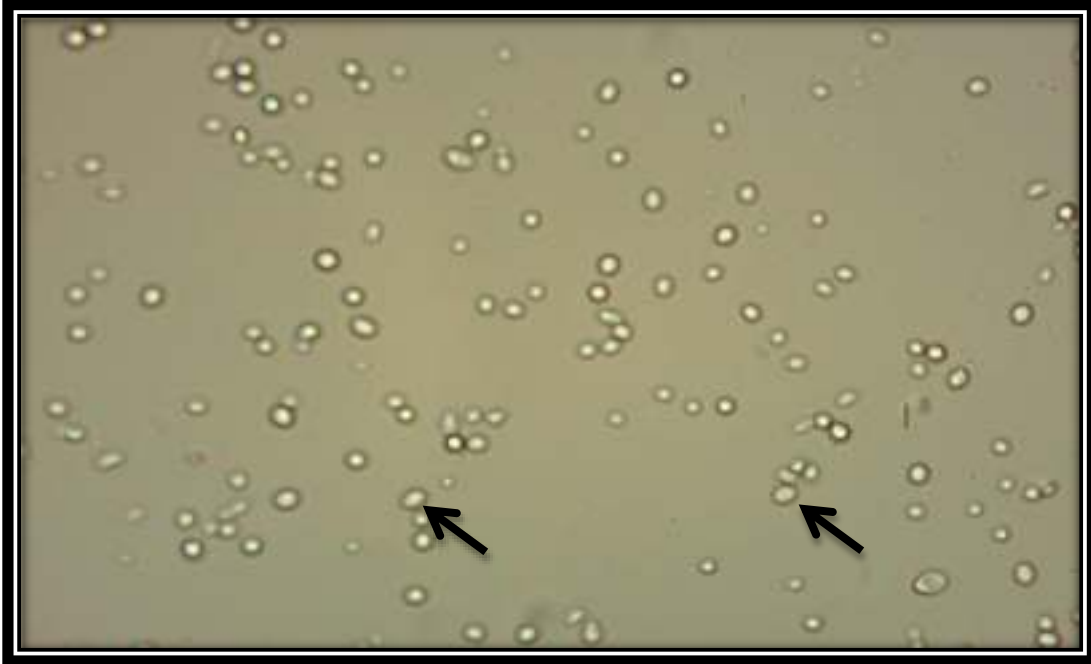
الجدول 15: نتائج الاختبارات البايوكيميائية والفسولوجية لانواع المبيضات المعزولة

الانواع				الصفات المدروسة
<i>C. dublinsiensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C. albicans</i>	
+	+	+	+	Growth in the 37 C
-	-	-	-	Urase
+	+	+	+	Dimorphic
+	-	-	+	Chlamydo spores
-	-	-	+	Growth in the 45
+	+	+	+	سكروز
+	+	+	+	كلوكوز
-	-	-	-	لاكتوز
-	-	+	+	مالتوز
-	+	-	+	كالكتوز

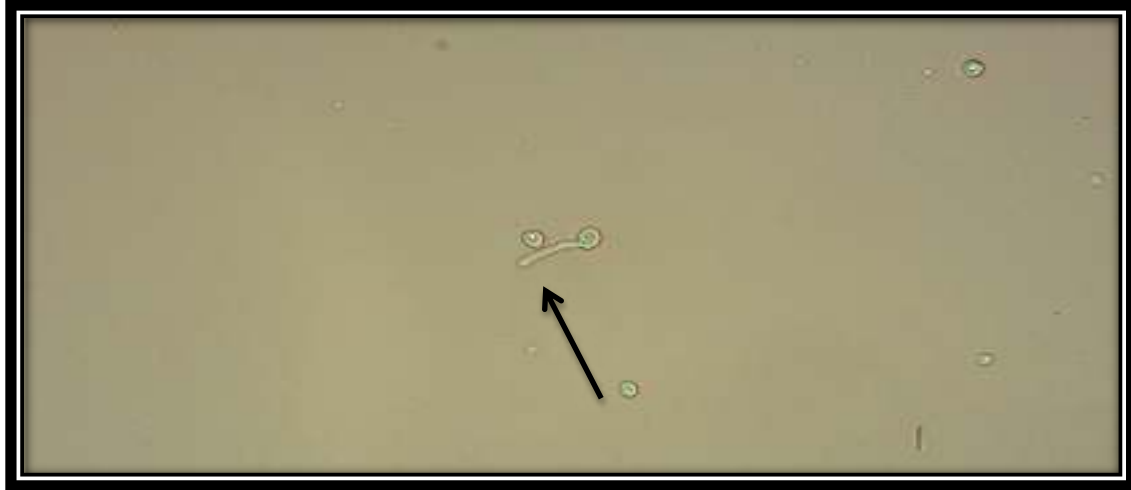
تخمر السكريات



صورة 2: مستعمرات خميرة *C. albicans* على وسط SDA بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة



صورة 3: الشكل البيضوي لخميرة *C. albicans* تحت المجهر قوة تكبير 40x



الصورة 4: تكوين انبوب الانبات في *C.albicans* بعد 90 دقيقة قوة تكبير x40

وقد تم التأكد من الانواع المعزولة باستعمال العدة التشخيصية الخاصة بالمبيضات (API- Candida system) ، ان استعمال هذا النوع من لتشخيص مفضل لكونه سريع ودقيق الا انه مكلف وحساس جدا للتلوث الذي قد يحدث صورة 5 وكما في الملحق (2).



الصورة 5: نظام *api Candida* لتشخيص خميرة *C. albicans*

ففي هذه الدراسة شخص الطبيب المختص 100 حالة لمرضى السرطان مصاب بداء المبيضات الفموي اعتمادا على التشخيص الأولي لكن عند اجراء الفحص المباشر للعينات المأخوذة من المريض تقلص العدد الى 96 حالة في حين اصبح العدد 94 عند الاعتماد على الزرع المختبري كذلك الحال بالنسبة للمجموعة الضابطة عند الفحص المجهرى كانت نسبة تواجد الخميره هي 29% انخفضت الى 24% عند الاعتماد على عملية الزرع ويوضح الجدول 16 ايضا ان هنالك فروق معنويه بالعزل بين المرضى والاصحاء عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$

ان التشخيص السريري لا يعطي دقة كبيرة مالم يدعم بأنواع التشخيص الاخرى لعدة اسباب اهمها ان هذا التشخيص يعتمد على خبره الاطباء واجتهادهم وكذلك لوجود امراض تتشابه مع داء المبيضات في الاعراض كما هو الحال في التهاب الفم البكتيري والفيروسي ،وان تدعيم الفحص السريري بالفحص المباشر اعطى نتيجة ادق اذ ان هذا الفحص يعتمد على وجود خلايا الخميرة المرضية او الخيط الفطري

الكاذب او أي جزء من المسبب المرضي لذلك يعد اكثر دقة من الفحص السريري (AL-Amery,2005) وعندما اجري الفحص بزرع العينات كانت النتائج ادق اذ يعد هذا الفحص من ادق الفحوصات ففي الفحص المباشر احيانا تكون الخلايا قد اضمحلت او تحللت نتيجة لمقاومة الجسم او نتيجة لأخذ العلاج (Kassab, 2002).

الجدول 16 عدد العينات التي اعطت نمو بالاعتماد على الزرع المختبري في حالات المرضى والاصحاء

الحالة	عدد العينات التي اعطت نمو(%)	عدد العينات التي لم تعطي نمو(%)
عينات المرضى (100)	94(94%)	6(6%)
عينات الاصحاء(100)	24(24%)	76(76%)

$$X^2 \text{ Cal.} = 6.2 \quad X^2 \text{ tab} = 3.1 \quad P \leq 0.01$$

ان هذه النتائج مقارنة لنتائج de Sousa *et al.* (2016) حيث كانت نسبة اصابة مرضى السرطان بداء المبيضات الفموي هي 85% بينما 59% من الاصحاء ظهر لديهم عزلات المبيضات رغم عدم وجود علامات او اعراض تدل على وجودها ، فالمبيضات هي من انواع الفطريات المتعايشة في تجويف الفم وقد تتحول الى ممرضة عند ضعيفي المناعة وتسبب التهابات في الغشاء المخاطي للفم واللسان فهي من الفطريات الانتهازية (Basson,2000) وان مرضى السرطان هم من الاشخاص ضعيفي المناعة والمعرضين وبنسبة كبيرة للالتهابات في الاغشية المخاطية والجلد ومجرى الدم عن طريق الفطريات ،نتيجة لجرعات العلاج الكيماوي والاشعاعي التي تؤثر على الخلايا العدلة وكذلك على الاغشية المخاطية مما يسهل غزوها للجسم (Stevenson-Moore,1990) .

#### 2.4- توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي والاصحاء حسب نوع الخمائر

يشير الجدول (17) الى عدد العزلات والنسبة المئوية لانواع الخمائر في مرضى السرطان والاصحاء وان هنالك فروق معنوية الاصحاء والمرضى في العزلات عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ، فجاءت خميرة *C. albicans* بالمرتبة الاولى في كلتا الحالتين ففي مرضى السرطان كانت نسبة الظهور هي 41% من مجموع العينات ان هذه النتيجة تتفق مع الكثير من نتائج الدراسات ومنها (Mokaddas *et al.* (2011) و (de Sousa *et al.* (2016) الذين اشاروا الى ان هذا النوع يشكل اعلى نسبة من اصابات المبيضات الفموية في مرضى السرطان لكونها من الفطريات الانتهازية التي تستغل ضعف مناعة الجسم، ولامتلكها عدداً من عوامل الضراوة كالاتصاق وتكوين الأغشية الحيوية وافراز انزيمات التحلل والتحول من هيئه الى هيئه اخرى وكذلك افرازها للسموم (Machado *et al.*,2011).

جاء النوع *C. dublineinsis* بالمرتبة الثانية وبنسبه 22% وقد سجلت بوصفها مسبباً مرضياً لداء المبيضات الفموي لمرضى السرطان من قبل (Abdelghani *et al.*, 2001) وهي من الانواع المكونة لفلورا الطبيعية في تجويف الفم ولكن بنسبة قليلة مقارنة بالمبيضات الاخرى، و تم عزلها ايضا من تجويف فم مرضى المصابين بفايروس نقص المناعة ،ومن المرضى المصابين بسرطان الدم اللمفاوي نتيجة لنقص الخلايا العدلة وجفاف الاغشية المخاطية (Meis *et al.*, 1999).

اما بالنسبة للنوع *C. glabrata* فجاء بالمرتبة الثالثة بنسبة 19% إذ لا تتفق هذه النتيجة مع ما ذكره (Redding *et al.*, 2002) بانها ثاني مسببات داء المبيضات الفموي عند مرضى السرطان بعد *C. albicans*، و يرجع وجود هذا النوع الى طبيعة نمو هذا وانتشاره كذلك يملك عوامل ضراوة مما يؤهله لاحداث الاصابة وان تواجدها يعتمد على القدرة المناعية للعائل وضراوة الممرض، بينما النوع *C. krusei* فقد سجل المرتبة الرابعة وبنسبة 12% بوصفها مسبب لداء المبيضات الفموي لمرضى السرطان وهي مقاربة لما ذكره (Belazi *et al.*, 2004) ان هذا النوع يمتاز بقدرته على احداث الاصابة لكن بنسب اقل من الانواع السابقة بسبب انتاجه لعدد من الانزيمات المحللة وبعض المواد ذات الطبيعة السمية (Yang, 2003)، اما في الاصحاء فكانت هنالك نسبة لتواجد الخمائر ولكنها اقل من المرضى، رغم عدم ظهور أي علامات او اعراض تدل على وجودها وايضا عدم اصابتهم باي امراض مزمنة إذ كانت *C. albicans* بالمرتبة الاولى وبنسبه 22% تليها *C. glabrata* وبنسبه 2% وهي مقاربة لدراسة (Dambroso *et al.*, 2009) الذي عزل *C. albicans* و *C. glabrata* من الاصحاء وان سبب وجودها في الاصحاء لانها تعد من النبيت الطبيعي للجسم.

#### الجدول 17: توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي والاصحاء بحسب نوع الخمائر

الخمائر	المصابين بمرض السرطان الذين ظهر لديهم نمو للخمائر (%)	الاصحاء الذين ظهر لديهم نمو (%)
<i>C. albicans</i>	41(41%)	22(22%)
<i>C. dublineinsis</i>	22(22%)	0
<i>C. glabrata</i>	19(19%)	2(2%)
<i>C. krusei</i>	12(12%)	0
No growth	6(6%)	76(76%)
المجموع الكلي	100	100

$$X^2 \text{ Cal.} = 5.330 \quad X^2 \text{ tab} = 2.20 \quad P \leq 0.01$$

### 3.4- توزيع المصابين بحسب معدل عدد خلايا الدم البيض وفقاً لنوع الجنس المصاب بالمسبب المرضي

يشير الجدول (18) الى وجود فروق معنوية في معدل خلايا الدم البيض بين الذكور والاناث المصابين بالسرطان، كما نلاحظ ان هنالك فروق معنوية بين المصابين والاصحاء سواء في الذكور او الاناث، وثمة انخفاض واضح لمعدل خلايا الدم البيض في المصابين مقارنة مع الاصحاء، نتيجة استعمال العلاج الكيماوي او الاشعاعي الذي يعمل على خفض معدل خلايا الدم البيضاء في مصل الدم من خلال تأثيره على الخلايا في طور التشكل في نقي العظم مما يؤدي الى تثبيط انتاجها (Beveridge et al.,1998) وان هذا الانخفاض يشير الى ضعف المناعة لدى المصابين مما ادى الى حدوث الامراض الانتهازية ومنها داء المبيضات الفموي .

### الجدول 18: توزيع المصابين بحسب معدل عدد خلايا الدم البيض وفقاً لنوع الجنس المصاب بالمسبب المرضي

غير المصابين بمرض السرطان		المصابين بمرض السرطان		الخمائر
(10 <sup>3</sup> خلية/مل)		(10 <sup>3</sup> خلية/مل)		
إناث(54)	ذكور(46)	إناث(43)	ذكور(57)	
9.08	8.74	2.15	2.21	<i>C. albicans</i>
9.12	9.13	1.79	1.64	<i>C. glabrata</i>
9.22	9.13	1.78	1.88	<i>C. dublineinsis</i>
9.22	9.13	1.58	1.83	<i>C. krusei</i>
9.22	9.13	1.86	1.3	No growth

$$X^2 \text{ Cal.} = 1.04 \quad X^2 \text{ tab} = 2.04 \quad P \leq 0.01$$

$$X^2 \text{ Cal.} = 7.301 \quad X^2 \text{ tab} = 4.081 \quad P \leq 0.01$$

### 4.4- توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الجزء المصاب بالسرطان

يتضح من الجدول (19) بان اكثر عدد حالات الاصابة بداء المبيضات الفموي كانت تعود لمرضى سرطان الحنجرة وبنسبة (18)% واقلها سرطان الجلد وسرطان المبيض (1) % لكلاهما وهي مقاربة لما ذكره (Naima, 2007)، ويعود السبب في ذلك الى انه كلما كانت الاصابة بالسرطان قريبة على الراس والعنق كلما زاد احتمال اصابه الفم بداء المبيضات لتعرضهما للعلاج الكيماوي والاشعاعي.

الجدول 19: توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الجزء المصاب بالسرطان

الجزء المصاب بالسرطان	عدد حالات الإصابة (%)
الحنجرة	17(18%)
الرئة	16(17%)
الثدي	15(15.9%)
نخاع العظم	10(10.6%)
المريء	8(8.5%)
الدم	7(7.4%)
الغدة اللعابية	5(5.3%)
الكلى	3(3.1%)
المعدة	3(3.1%)
الغدة الصم	2(2.1%)
القولون	2(2.1%)
المثانة	2(2.1%)
عنق الرحم	2(2.1%)
الجلد	1(1%)
المبيض	1(1%)
المجموع	94

## 5.4- توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب نوع العلاج

يشير الجدول (20) الى وجود فروق معنوية في توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب نوع العلاج عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  فقد سجلت الحالات المعالجة بالعلاج الكيماوي نسبة 97.8 % من حالات الإصابة بداء المبيضات الفموي ، لما للعلاج الكيماوي من اثار جانبية تؤثر على مناعة مريض السرطان، وهي كبح نخاع العظمي وقلة الخلايا العدلة بالإضافة الى جفاف الاغشية المخاطية المبطنة للفم والجهاز الهضمي مما يؤدي الى نشوء تقرحات تسهل لفطريات الانتهازية استعمارها واستغلال ضعف المناعة لدى مريض السرطان (Bellm et al., 2000)، بينما الاشخاص المعالجين بالعلاج الاشعاعي كانت نسبة اصابهم بداء المبيضات الفموي 2.1% لان العلاج الاشعاعي عند استعماله في منطقتي الراس والعنق يؤدي الى خلل في الغدة اللعابية وخفض معدل تدفق اللعاب بالإضافة الى تغيير تركيبة اللعاب وزيادة لزوجته وقله سيلانه لترطيب الفم، مما يؤدي الى جفافه و اتلاف خلايا الاغشية المخاطية الامر الذي يقود الى ضمور في الغشاء المخاطي و حدوث تشقق وحرقة في اجزاء الفم، مما يسمح للعدوى من الانتشار به خصوصا المبيضات (Thaweboon et al., 2008؛ Vissin et al., 2003)

## الجدول 20: توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب نوع العلاج

نوع العلاج	عدد الحالات المصابة (%)
العلاج الكيميائي	92 (97.8%)
العلاج الإشعاعي	2 (2.1%)
المجموع	94

$$X^2 \text{ Cal.} = 4.115 \quad X^2 \text{ tab} = 2.1 \quad P \leq 0.01$$

## 6.4- توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب عدد الجرعة

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية في توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب عدد الجرعة عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، وأن أقل نسبة إصابة بداء المبيضات الفموي سجلت لعدد الجرعات (1-5) وبنسبة 6.3% يليه عدد الجرعات (6-12) وبنسبة 31.9% بينما سجلت عدد الجرعات (أكثر من 12) أكبر عدد للمصابين بداء المبيضات الفموي وبنسبة 61.58% دلالة على أنه كلما زادت عدد العلاج ضعفت مناعة المريض فهو يتداخل مع مراحل نشوء الخلايا المناعية وكذلك يؤثر على التجديد الذاتي للخلايا الطلائية مما يسبب في تعطيل الحواجز التي تحمي الجسم من الغزو الميكروبي ومن ثم زيادة الاصابات الانتهازية ومنها داء المبيضات الفموي وهذا يتفق مع ما ذكره (Elting et al., 2003) الجدول

21

## الجدول 21: توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب عدد الجرعة

عدد الجرعة	عدد الحالات المصابة %
5—1	6 (6.3%)
12—6	30 (31.9%)
أكثر من 12	58 (61.7%)
المجموع	94

$$X^2 \text{ Cal.} = 3.441 \quad X^2 \text{ tab} = 1.56 \quad P \leq 0.01$$

## 7.4 - توزيع المصابين بداء المبيضات الفموي حسب الجنس

يبين الجدول (22) أن أعداد ونسب إصابات الذكور كانت أعلى منها في الإناث إذ كانت 54 (57.4%) للذكور مقابل 40 (42.5%) للإناث مع عدم وجود فروق معنوية بينهما عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، قد يرجع السبب في ذلك إلى أنهم أكثر عرضة للعوامل التي تساعد على حدوث الإصابة كالتدخين ووجود الغبار والعمل والأعمال الشاقة وفي تماس مباشر مع العوامل البيئية الخارجية كالأبواب التي تحملها الرياح وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره (Leak et al., 2000)



## الجدول 22: توزيع المصابين بداء المبييضات الفموي حسب الجنس

الجنس	عدد حالات الإصابة
ذكر	54 (57.4%)
انثى	40 (42.5%)
المجموع	94

$$X^2 \text{ Cal.} = 2.111 \quad X^2 \text{ tab} = 3.01 \quad P \leq 0.01$$

## 8.4- توزيع المصابين بداء المبييضات الفموي حسب الفئة العمرية

تبين النتائج الخاصة في توزيع المصابين بداء المبييضات الفموي حسب الفئة العمرية وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، وان الفئة العمرية ( $>50$ ) هي اكثر عرضة للإصابة بداء المبييضات الفموي 51 (47.9%) ونلاحظ تناقص عدد المصابين كلما قل العمر وصولاً الى الفئة (20-30) التي سجلت عدد الاصابات 4 (4.2%)، يعود السبب في زيادة الاصابة في كبار السن لانها الفئة الاكثر عدداً من الفئات الاخرى المعرضة للسرطان وكذلك نتيجة لضعف الجهاز المناعي عندهم اضافة لتأثيرات الادوية المضادة للسرطان وهي مقارنة لما ذكره Wanda and Gonsalves (2008)، للذان ذكرا ان كبار السن اكثر عرضة للإصابة لخطر الإصابة بالأمراض الانتهازية، ويعود ذلك الى قلة النشاط والحركة وخمول الدورة الدموية وضعف المناعة والأمراض المزمنة وضعف انتاج الخلايا المناعية، وبشكل عام ضعف العمليات الايضية البنائية.

## الجدول 23: توزيع المصابين بداء المبييضات الفموي حسب الفئة العمرية

الفئة العمرية (سنة)	عدد حالات الإصابة (%)
20—30	4 (4.2%)
21-40	10 (10.6%)
41-50	29 (30.8%)
> 50	51 (47.9%)
المجموع	94

$$X^2 \text{ Cal.} = 4.010 \quad X^2 \text{ tab} = 2.20 \quad P \leq 0.01$$

9.4- بعض عوامل الضراوة في *Candida albicans*

## 1.9.4- التصاق خلايا المبييضات البيضاء بالخلايا الطلائية

يبين الجدول 24 النسب المئوية لالتصاق المبييضات البيضاء بالخلايا الطلائية، اذ نلاحظ ان عدد عينات المرضى التي اعطت نتيجة موجبة هي 35 (85.8%)، بينما كانت عدد العينات السالبة لاختبار

الالتصاق هي 6(14.6%)، أما عدد العينات التي اعطت نتيجة موجبة للالتصاق في الاصحاء هي 10 ( 45.4% ) بينما السالبة للفحص كان عددها 12(54.5%) وبهذا نلاحظ زيادة نسبة الالتصاق في العينات المرضية مقارنة مع عينات الاصحاء مع وجود فروق معنوية بينهما عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، وهذا ما أكدته العديد من الدراسات من ان المبيضات البيضاء الممرضة لها القابلية على الالتصاق أكثر من غير الممرضة (Mahdi and AL – Hamdani, 1998)، و يعود السبب لحدوث زيادة اعداد الخميرة ولضعف مناعة العائل وتحول الخميرة الى ممرضه بصورة 6.

#### الجدول 24:التصاق خلايا المبيضات البيضاء بالخلايا الطلانية

عدد الحالات السالبة لفحص الالتصاق	عدد الحالات الموجبة لفحص الالتصاق	الحالة
6(14.6%)	35(85.8%)	<i>C. albicans</i> من المرضى (41)
12(54.5%)	10(45.4%)	<i>C. albicans</i> من الاصحاء (22)

$$X^2 \text{ Cal.} = 3.001 \quad X^2 \text{ tab} = 1.40 \quad P \leq 0.01$$



#### الصورة 6: التصاق الـ *C. albicans* بالخلايا الطلانية للفم

ان الاختلاف في قابلية الالتصاق قد تعود الى الاختلاف ما بين السلالات، و اظهرت دراسات اخرى ان عملية الالتصاق تعتمد على الفة خلايا الخميرة للماء، فاذا كانت الخلايا ذات الفة قليلة للماء يكون الالتصاق اكبر من الخلايا التي تمتلك الفة عاليه للماء او قد يعود سبب الى عدم قدرة بعض العينات على الالتصاق لقلة نشاط جين الالتصاق ALS، الذي يعد من التراكيب الاساسية في جينوم الكانديدا كما ذكره (Green et al., 2008).

2.9.4- القدرة على تكوين الاغشية الحيوية في *C.albicans*

يشير الجدول ( 25 ) النسب المئوية لاختبار قدرة المبيضات البيضاء على تكوين الاغشية الحيوية اذ نلاحظ ان عدد عينات المرضى التي اعطت نتيجة موجبة هي 39(95.1%)بينما كانت عدد العينات السالبة لاختبار الاغشية الحيوية هي 2(4.8%)، اما عدد العينات التي اعطت نتيجة موجبة لتكوين الاغشية في الاصحاء هي 5(22.7%)بينما السالبة للفحص كان عددها 17(77.2%)وبهذا نلاحظ اختلاف في قدرة عزلات الخميرة على انتاج الاغشية الحيوية بين العينات المرضية والاصحاء فهناك زيادة في نسبه تكوين الاغشية في العينات المرضية مقارنة مع الاصحاء بالاضافة الى وجود فروق معنوية بينهما عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ، وهي مقاربة لما ذكره (Brighent et al .(2014).

بعض المبيضات البيضاء ليست لها القدرة على تكوين الاغشية ،بسبب اختلاف السلالات في انتاج السكريات المتعدد الخارجية (Polysaccharide) الذي يدخل في تكوين الاغشية الحيوية والذي يعكس انخفاض التعبير الجيني للجين المسؤول عن تكوين الاغشية الحيوية HWP1 او نتيجة لحدوث طفرات فيه(Nobile et al .,2006) ،تؤدي الاغشية الحيوية دورا مهماً في ضراوة المبيضات البيضاء من خلال مقاومة عملية البلعمة من قبل الخلايا الالتهامية بالاضافة الى مقاومة المضادات الحيوية وهذا يتفق مع ما ذكره (Chandra et al. (2001. صورة (7)

الجدول 25:القدرة على تكوين الاغشية الحيوية في *C.albicans*

الحالة	عدد الموجبة لفحص تكوين الاغشية الحيوية	عدد السالبة لفحص تكوين الاغشية الحيوية
<i>C. albicans</i> من المرضى (41)	39(95.1%)	2(4.8%)
<i>C. albicans</i> من الاصحاء (22)	5(22.7%)	17(77.2%)

$$X^2 \text{ Cal.} = 2.01 \quad X^2 \text{ tab} = 1.04 \quad P \leq 0.01$$



الصورة 7: الاغشية الحيوية لـ *C. albicans*

#### 3.9.4- انتاج الانزيم المحلل للبروتين من قبل *C.albicans*

يبين الجدول ( 26 ) النسب المئوية لإنتاج *C.albicans* الانزيم المحلل للبروتين اذ نلاحظ ان عدد عينات المرضى التي اعطت نتيجة موجبة هي 40 (97.5%) بينما كانت عدد العينات السالبة للاختبار هي 1(2.4%) ، اما عدد العينات التي اعطت نتيجة موجبة للاختبار في الاصحاء هي 13(59%) بينما السالبة للفحص كان عددها 9(40.9%) وبهذا نلاحظ زيادة نسبه انتاج الانزيم المحلل للبروتين في العينات المرضية مقارنة مع الاصحاء مع وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ، تتفق هذه النتائج مع ما ذكره ( Calderone and Fonzi ( 2001 ) ، وقد يعود السبب لعدم انتاج انزيم المحلل للبروتين الى الاختلاف ما بين سلالات النوع او الى قلة نشاط او خمول جين SAP المسؤول عن عملية انتاج الانزيم المحلل للبروتين والذي يعد من التراكيب الاساسية في جينيوم الكانديدا كما ذكره Julian et al.(2003).

الجدول 26: انتاج الانزيم المحلل للبروتين من قبل *C.albicans*

عدد الحالات السالبة لانتاج انزيم تحلل البروتين	عدد الحالات الموجبة الموجبة لانتاج انزيم تحلل البروتين	الحالة
1(2.4%)	40 (97.5%)	<i>C. albicans</i> من المرضى (41)
9(40.9%)	13(59%)	<i>C. albicans</i> من الاصحاء (22)

$$X^2 \text{ Cal.} = 2.61 \quad X^2 \text{ tab} = 1.04 \quad P \leq 0.01$$

#### 10.4-الكشف النوعي لبعض المركبات الفعالة للمستخلص المائي للبذور *Moringa oleifera*

يوضح الجدول (27) نتائج الكشف النوعية للمواد الفعالة في المستخلص المائي لبذور المورينجا والذي اشار الى وجود الصابونين والفلافونويدات والتانينات ولكن لاوجود للقلويدات، واتفقت هذه النتائج مع (Sahar et al.,2014) وان السبب قد يعود الى ان الصابونين والفلافونيدات والتانينات لها القدرة على الذوبان في الماء لذا يمكن الحصول عليها بطريقة الاستخلاص المائي، اما القلويدات فهي مركبات غير قطبية لاتذوب بالماء (Kebreab et al.,2005).

#### جدول27: الكشف النوعي لبعض المركبات الفعالة للمستخلص المائي لبذور *Moringa oleifera*

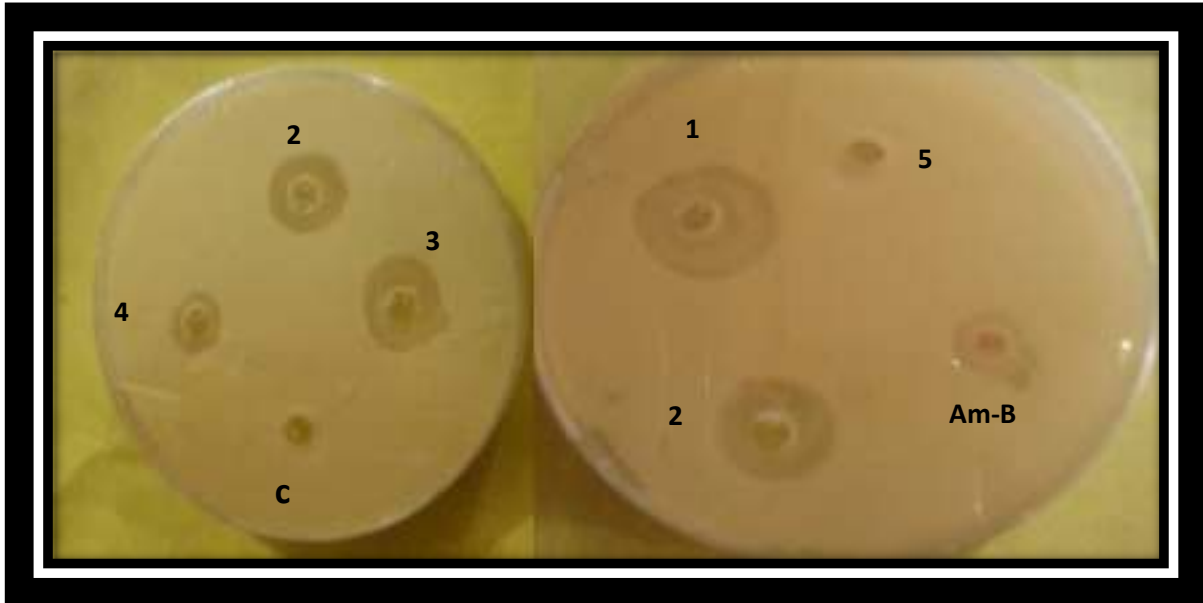
التانينات	القلويدات	الفلافونيدات	الصابونين	المادة
+	-	+	+	المستخلص المائي للبذور <i>Moringa oleifera</i>

#### 11.4-نتائج اختبار الحساسية الدوائية

تشير نتائج الجدول (28) الى وجود تأثير تثبيطي لمضاد الامفوترسين تجاه المبيضات البيضاء حيث سجل اقصى قطر تثبيطي له هو (40) ملم ويعود تأثيره الى تداخله مع عملية بناء الستيرول والاركستيرول الذي يدخل في تركيب غشاء الخلية ومن ثم تتكون فتحات في الغشاء مما يسبب خللاً في نضوحيته ومن بعد تموت الخلية. إن هذا المضاد فعال جدا تجاه مدى واسع من الفطريات وان التراكيز القليلة منه كافية لقتل الفطريات الا انه قليل الاستعمال بسبب سميته لخلايا العائل حيث يرتبط هذا المضاد بشكل ضعيف مع الكوليسترول المركب الرئيسي الذي يدخل في تكوين الاغشية الخلوية للبائن وهذا التداخل يوضح سميته ولاسيما عند استعماله لفترات طويلة وبجرعات عالية وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره (Brook et al.,1998).

كما اظهرت نتائج اختبار الحساسية للمستخلص بذور المورينجا تجاه المبيضات البيضاء واتضح ان لها تأثير فعال بتركيز 90 % وكذلك في التراكيز (75,50,35)% ولم يعط أي تأثير في التراكيزين (25،15)% وقد يعزى سبب عدم الحساسية لهذه التراكيز الى انها غير كافية لاحداث التأثير المطلوب والذي قد يرجع الى انخفاض المواد الفعالة في هذه التراكيز اذ وجد ان حساسية المبيضات البيضاء تزداد بزيادة التركيز ففي التركيز 90 % للمستخلص كانت *C.albicans* حساسه له وقد ظهر ان اقصى قطر تثبيطي له هو (33)ملم بينما سجلت التراكيز(75,50,35)% اقصى اقطار وهي (20,16,4) ملم على التوالي وهذه النتائج مقارنة لما ذكروا (Abdulmoneim et al. (2011) ان المستخلص المائي

لبذور المورينجا لم تسجل أي تأثير تثبيطي لنمو *C. albicans* في التراكيز (5,10,20)% ولكنها تثبتت نموها في التركيز (40%) بقطر 11 ملم، والسبب قد يعود لاحتواء المستخلص مواداً تعمل على تثبيط أو قتل خلايا الخميرة كالصابونين الموجودة في المستخلص المائي المستعمل في الدراسة الذي له تأثير مضاد للفطريات اذ يشكل معقد مع السترولوات الموجودة في الغشاء الحيوي للخميرة وهذا يسبب اضرار في غشاء الخلية وهذا يسبب انهيارا لغشاء الخلية ومن ثم انهيار الخلية نفسها (Elisa et al.,2007) او قد يعود السبب لوجود الفلافونويدات في المستخلص وان تأثيرها ضد الفطريات ناتج عن قدرتها على تكوين معقد مع بروتينات الجدار الخلوي والبروتينات الذائبة الداخل خلوية لجسم الخلية الفطرية، فضلاً عن قدرتها على تحطيم الغشاء الخلوي لخلية الخميرة وهذا يتفق مع ما ذكره (Cowan,1999)، بالإضافة الى وجود التانينات التي لها تأثير سام على الخمائر من خلال تضيق النبيبات الدقيقة في جدار الخلية مما يمنع مرور المواد من وإلى الخلايا (Osho and Adelani, 2012) بالإضافة الى فعاليته في تثبيط الانزيمات الخارج خلوية وتثبيط الفسفرة التاكسدية ومن ثم حرمان الخلية من العناصر الاساسية لنموها كما ذكره Augustin (1991). صورة (8)



صورة 8: الاقطار التثبيطية للمستخلص لبذور المورينجا والمضاد الحيوي الامفوترسين B

1. القطر التثبيطي لمستخلص المائي لبذور المورينجا 20 ملم بتركيز 90%
  2. القطر التثبيطي لمستخلص المائي لبذور المورينجا 11 ملم بتركيز 75%
  3. القطر التثبيطي لمستخلص المائي لبذور المورينجا 10 ملم بتركيز 50%
  4. القطر التثبيطي لمستخلص المائي لبذور المورينجا 2 ملم بتركيز 35%
  5. القطر التثبيطي لمستخلص المائي لبذور المورينجا 0 ملم بتركيز 25%
- C- الماء مقطر القطر التثبيطي 0 ملم . Am - B - الامفوترسين B القطر التثبيطي 1 ملم

الجدول 28 : قياس معدل الاقطار الثبيطية للمضاد الحيوي وتراكيز مستخلص بذور المورينجا تجاه 41 عزلة من *C.albicans*

Control	قطر التثبيط (ملم)	تراكيز المستخلص						رقم العزلة
		قطر التثبيط (ملم)						
Distilled water	(Amphotericin B)	90 %	75%	50%	35%	25%	15%	
0	10	17	10	10	1	0	0	1
0	12	25	11	6	0	0	0	2
0	18	13	10	3	2	0	0	3
0	15	20	15	15	4	0	0	4
0	20	30	5	5	0	0	0	5
0	37	30	7	7	0	0	0	6
0	22	20	5	5	0	0	0	7
0	0	1	0	0	0	0	0	8
0	10	12	12	9	0	0	0	9
0	22	22	12	12	0	0	0	10
0	23	30	15	12	0	0	0	11
0	30	31	20	16	0	0	0	12
0	1	1	0	0	0	0	0	13
0	20	31	1	1	0	0	0	14
0	16	22	5	5	0	0	0	15
0	40	12	1	1	0	0	0	16
0	20	22	7	6	0	0	0	17
0	25	19	8	8	2	0	0	18
0	22	17	12	9	1	0	0	19
0	20	23	12	8	1	0	0	20
0	25	33	8	6	1	0	0	21
0	16	20	7	7	2	0	0	22
0	10	21	1	1	0	0	0	23
0	22	26	2	2	0	0	0	24
0	25	19	2	2	0	0	0	25
0	20	16	5	4	0	0	0	26
0	12	25	3	3	0	0	0	27
0	10	22	1	1	0	0	0	28
0	10	20	9	6	0	0	0	29
0	16	20	9	4	0	0	0	30
0	11	15	8	6	0	0	0	31
0	12	17	9	8	0	0	0	32
0	20	16	12	10	0	0	0	33
0	15	18	12	12	0	0	0	34
0	23	10	10	1	0	0	0	35
0	22	12	8	8	0	0	0	36
0	5	5	2	1	1	0	0	37
0	3	1	1	0	0	0	0	38
0	1	0	0	0	0	0	0	39
0	22	19	0	8	0	0	0	40
0	16	10	0	0	0	0	0	40

**11.4- تركيز ونقاوة الحامض النووي الرايبوسومي** : تم قياس نقاوة وتركيز الحامض النووي RNA المستخلص باستعمال جهاز آل Nanodrop وعلى طولين موجيين (260 و 280) نانومتر للعلزلات المدروسة التي أعطت تركيزاً عالياً من الحامض النووي RNA وكانت ذات تركيز مثالي لإكمال عملية Quantitive reverse transcriptase real- time PCR وكما موضح في جدول (29).

الجدول 29: نقاوة وتركيز الحامض النووي RNA لمعاملات التجربة

Mean ± SD	تركيز RNA الكلي (نانوغرام)	Mean ± SD	درجة النقاوة (نانومتر)	العينات
42.4480±3.24007	38.9	1.4660±.04946	1.45	T1
	31.3		1.32	T1
	40.8		1.56	T1
	16.9		1.41	T1
	40.8		1.59	T1
80.1330± 18.13875	127	1.6260± .11843	1.72	T2
	124		1.86	T2
	113.3		1.83	T2
	95.7		1.49	T2
	77.8		1.23	T2
62.3280 ±8.23503	125.1	1.5960±.27574	1.45	T3
	76.8		1.76	T3
	62		1.26	T3
	50.7		1.54	T3
	52.7		1.97	T3
70.1560±12.86088	79.3	1.5100± .09808	1.34	C
	34.3		1.43	C
	45.3		1.84	C
	58		1.32	C
	46		1.62	C

**12.4. التعبير الجيني لجينات عوامل الضراوة *SAP2, SAP1, HWP1, ALS1***

***SAP7, SAP5, SAP4, SAP3* باستعمال تفاعل سلسلة انزيم البلمرة في الوقت**

**الحقيقي الكمي qRT- PCR باستعمال طريقة العد النسبي**

اظهرت نتائج التعبير الجيني لكل الجينات المستعملة في الدراسة ، وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في المعاملات بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وكما يلي

اولا: التعبير الجيني لجين *ALS1* باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين *ALS1* قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلانية



تشير النتائج الموضحة في الجدول (30) والشكلان (1) و(2) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  $26.109 \pm 2.54915$  في المعاملة T2 وبفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع المجموعة C التي كانت قيمتها  $1.006 \pm 0.12498$ .

2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين *ALS1* قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول (30) والشكل (1) الى ان التعبير الجيني لجين *ALS1* كان في المجموعة C ذو قيمة  $1.006 \pm 0.12498$  بينما انخفضت القيمة الى  $0.063 \pm 0.01137$  في المعاملة T1 و بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير الجيني لها  $26.109 \pm 2.54915$  مرتفعة بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير الجيني وبمقدار  $11.428 \pm 4.14409$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ .

الجدول 30: التعبير الجيني لجين *ALS1* باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

Treatment Isolation	CT ( <i>ALS1</i> gene)	CT ( <i>actin</i> )	$\Delta$ CT (Test)	$\Delta$ CT (Control)	$\Delta\Delta$ CT	Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	Mean $\pm$ Std. Error
T1	35.38	35.26	0.12	-3.97	4.09	0.059	0.063 $\pm$ 0.01137
T1	34.63	34.61	0.02	-3.97	3.99	0.063	
T1	35.49	35.15	0.34	-3.97	4.31	0.050	
T1	34.83	35.17	-0.34	-3.97	3.63	0.081	
T1	34.82	34.74	0.08	-3.97	4.05	0.060	
T2	26.51	35.28	-8.77	-3.97	-4.79	27.743	26.109 $\pm$ 2.54915
T2	27.04	35.53	-8.49	-3.97	-4.52	22.882	
T2	26.45	35.29	-8.84	-3.97	-4.87	29.219	
T2	26.77	35.46	-8.69	-3.97	-4.72	26.371	
T2	27.18	35.76	-8.58	-3.97	-4.60	24.329	
T3	27.91	35.71	-7.80	-3.97	-3.83	14.210	11.428 $\pm$ 4.14409
T3	28.18	35.42	-7.24	-3.97	-3.26	9.610	
T3	27.63	35.58	-7.95	-3.97	-3.98	15.767	
T3	28.11	35.70	-7.59	-3.97	-3.62	12.296	
T3	28.03	34.40	-6.37	-3.97	-2.39	5.258	
C	31.26	35.31	-4.05	-3.97	-0.08	1.057	1.006 $\pm$ 0.12498
C	31.83	35.56	-3.73	-3.97	0.24	0.847	
C	31.11	35.15	-4.04	-3.97	-0.07	1.049	
C	30.67	34.51	-3.84	-3.97	0.13	0.916	
C	31.19	35.38	-4.19	-3.97	-0.22	1.163	
Mean C	31.212	35.18	-3.97				

T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract , T2 *C.albicans* + Epithelial Cell , T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) *actin* gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

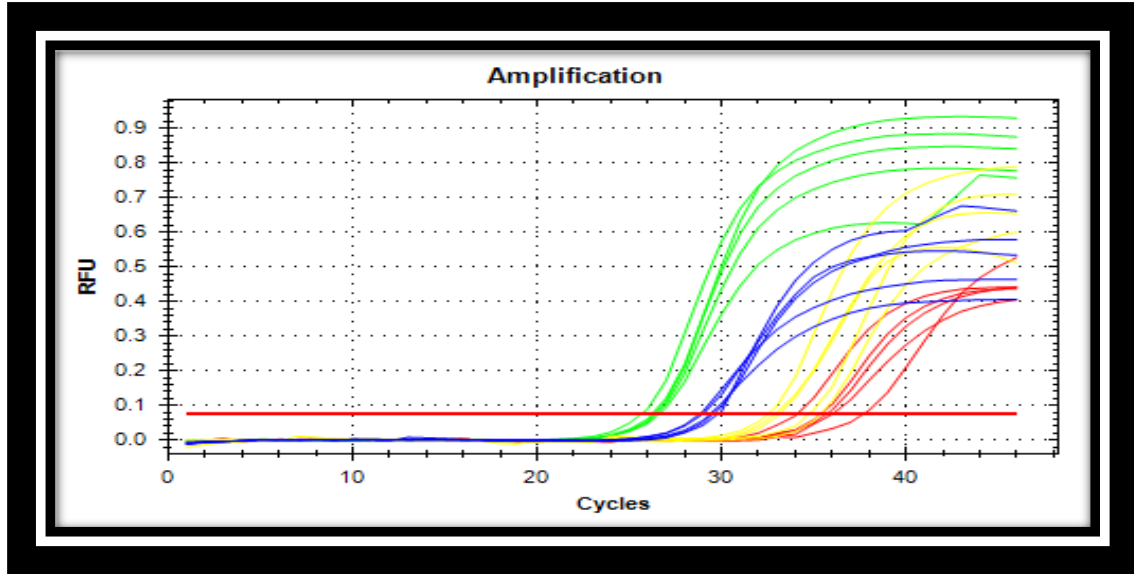
$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

Second, the  $\Delta$  CT of the test isolates were normalized to the  $\Delta$  CT of the Control:

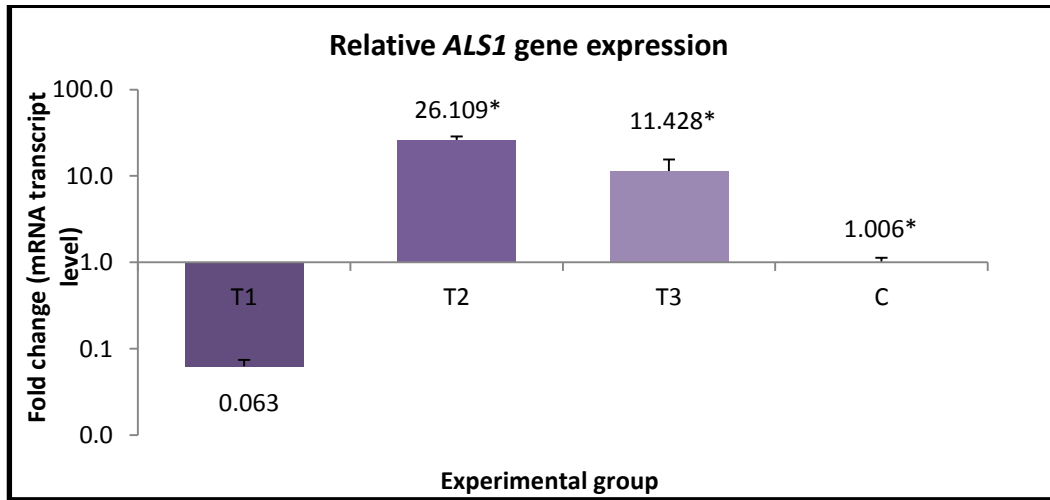
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator})$$

Fold Change of relative gene expression was by following equation = ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): Normalized expression ratio



الشكل 1: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *ALS1* في خمائر الـ *C. albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

- 1- المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C).
- 2- المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1.
- 3- المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C. albicans* مع الخلايا الطلانية T2.
- 4- المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلانية T3



الشكل 2: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين *ALS1* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

\* = تشير إلى وجود فرق معنوي بإختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ .

ثانياً: التعبير الجيني لجين *HWPI* باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين *HWPI* قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلانية: تشير النتائج الموضحة في الجدول (31) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  $18.309 \pm 1.7892$  في المعاملة T2 وبفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع المجموعة C التي كانت قيمتها  $1.126 \pm 0.55867$

2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين *HWP1* قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول (31) الى ان التعبير الجيني لجين *HWP1* كان في المجموعة C ذو قيمة  $1.126 \pm 0.55867$  بينما انخفضت القيمة الى  $0.068 \pm 0.01914$  في المعاملة T1 و بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير الجيني لها  $18.309 \pm 1.7892$  مرتفعة بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير الجيني وبمقدار  $7.425 \pm 2.59554$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ . شكل (3)، (4).

الجدول 31: التعبير الجيني لجين *HWP1* باستعمال طريقة  $(2^{-\Delta\Delta CT} \text{ Livak method})$ .

Treatment Isolation	CT ( <i>HWP1</i> gene)	CT ( <i>actin</i> )	$\Delta$ CT (Test)	$\Delta$ CT ( Control)	$\Delta\Delta$ CT	Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	Mean $\pm$ Std.Error
T1	34.50	35.26	-0.76	-4.15	3.39	0.095	0.068 $\pm$ 0.01914
T1	34.48	34.61	-0.13	-4.15	4.02	0.062	
T1	34.78	35.15	-0.37	-4.15	3.78	0.073	
T1	34.90	35.17	-0.27	-4.15	3.88	0.068	
T1	35.15	34.74	0.41	-4.15	4.56	0.042	
T2	26.95	35.28	-8.33	-4.15	-4.17	18.052	18.309 $\pm$ 1.7892
T2	27.07	35.53	-8.46	-4.15	-4.31	19.782	
T2	27.15	35.29	-8.14	-4.15	-3.99	15.877	
T2	27.18	35.46	-8.28	-4.15	-4.13	17.520	
T2	27.26	35.76	-8.50	-4.15	-4.34	20.317	
T3	28.23	35.71	-7.48	-4.15	-3.33	10.048	7.425 $\pm$ 2.59554
T3	28.37	35.42	-7.05	-4.15	-2.89	7.436	
T3	28.44	35.58	-7.14	-4.15	-2.99	7.938	
T3	28.45	35.70	-7.25	-4.15	-3.10	8.575	
T3	28.60	34.40	-5.80	-4.15	-1.64	3.126	
C	30.34	35.31	-4.97	-4.15	-0.82	1.765	1.126 $\pm$ 0.55867
C	30.74	35.56	-4.82	-4.15	-0.67	1.591	
C	31.44	35.15	-3.71	-4.15	0.44	0.737	
C	31.55	34.51	-2.96	-4.15	1.19	0.439	
C	31.09	35.38	-4.29	-4.15	-0.14	1.101	
Mean C	31.032	35.18	-4.15				

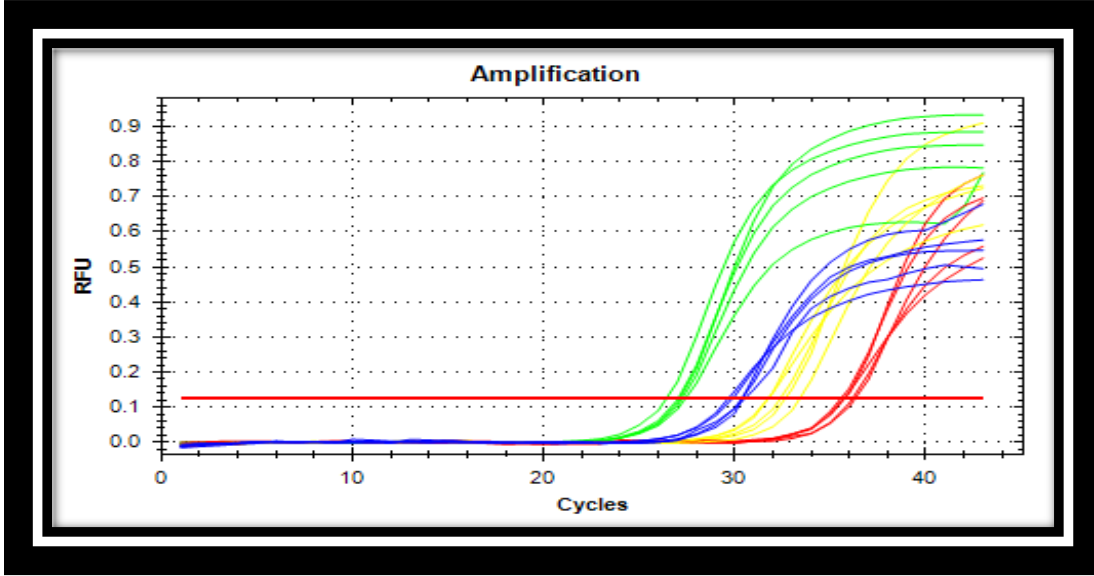
T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract ,T2 *C.albicans* + Epithelial Cell ,T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) *actin* gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

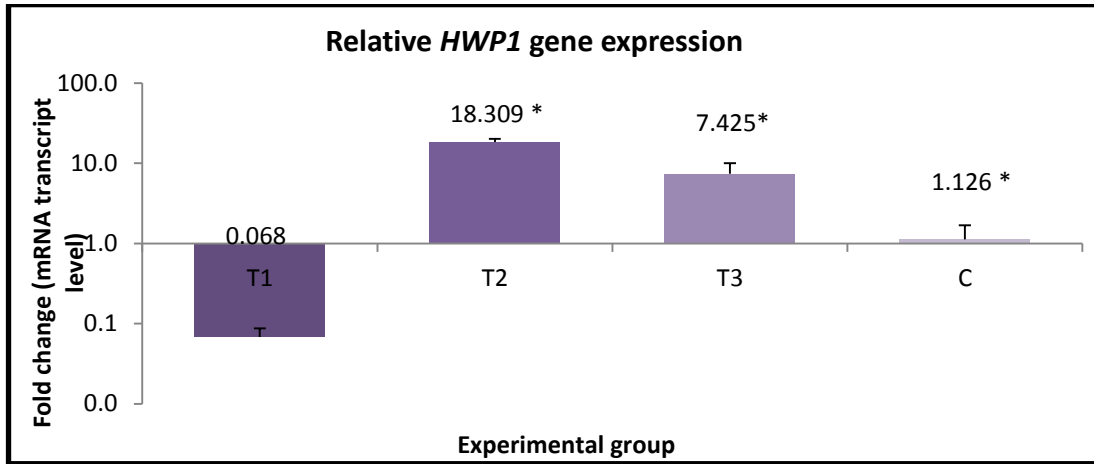
Second, the  $\Delta$  CT of the test isolates were normalized to the  $\Delta$  CT of the Control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator}) , \text{Fold Change of relative gene expression was by following equation } = (2^{-\Delta\Delta CT}) : \text{Normalized expression ratio}$$



الشكل 3: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *HWP1* في خمائر الـ *C. albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

1. المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C).
2. المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1.
3. المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C. albicans* مع الخلايا الطلائية T2.
4. المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلائية T3.



الشكل 4: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين *HWP1* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة

\* = تشير إلى وجود فرق معنوي بإختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ .

رابعاً: التعبير الجيني لجين *SAPI* باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين *SAPI* قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية تشير النتائج الموضحة في الجدول (32) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  $92.244 \pm 15.88358$  في المعاملة T2 وبفرق

معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع المجموعة C التي كانت قيمتها  $1.029 \pm 0.25447$

2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين *SAP1* قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول (32) الى ان التعبير الجيني لجين *SAP1* كان في المجموعة C، ذو قيمة  $1.029 \pm 0.25447$  بينما انخفضت القيمة الى  $0.156 \pm 0.06321$  في المعاملة T1 و بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير الجيني لها  $92.244 \pm 15.88358$  مرتفع بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير الجيني وبمقدار  $29.933 \pm 6.16945$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ . شكل (5)، (6).

الجدول 32: التعبير الجيني لجين *SAP1* باستعمال طريقة  $(2^{-\Delta\Delta CT} \text{ Livak method})$ .

Treatment Isolation	CT ( <i>SAP1</i> gene)	CT ( <i>actin</i> )	$\Delta$ CT (Test)	$\Delta$ CT (Control)	$\Delta\Delta$ CT	Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	Mean + Std.Error
T1	35.10	35.26	-0.16	-3.14	2.99	0.126	0.156± 0.06321
T1	34.18	34.61	-0.43	-3.14	2.71	0.153	
T1	34.39	35.15	-0.76	-3.14	2.38	0.192	
T1	34.09	35.17	-1.08	-3.14	2.06	0.239	
T1	35.38	34.74	0.64	-3.14	3.78	0.073	
T2	25.61	35.28	-9.67	-3.14	-6.52	91.904	92.244±15.88358
T2	25.51	35.53	-10.02	-3.14	-6.87	117.305	
T2	25.63	35.29	-9.66	-3.14	-6.52	91.572	
T2	26.12	35.46	-9.34	-3.14	-6.20	73.461	
T2	26.17	35.76	-9.59	-3.14	-6.44	86.978	
T3	27.32	35.71	-8.39	-3.14	-5.25	37.971	29.933 ± 6.16945
T3	27.32	35.42	-8.10	-3.14	-4.95	30.965	
T3	27.45	35.58	-8.13	-3.14	-4.99	31.709	
T3	27.75	35.70	-7.95	-3.14	-4.81	28.016	
T3	26.86	34.40	-7.54	-3.14	-4.39	21.003	
C	32.02	35.31	-3.29	-3.14	-0.15	1.108	1.029 ± 0.25447
C	32.02	35.56	-3.54	-3.14	-0.40	1.317	
C	32.04	35.15	-3.11	-3.14	0.03	0.978	
C	32.04	34.51	-2.47	-3.14	0.67	0.629	
C	32.08	35.38	-3.30	-3.14	-0.16	1.114	
Mean C	32.04	35.18	-3.14				

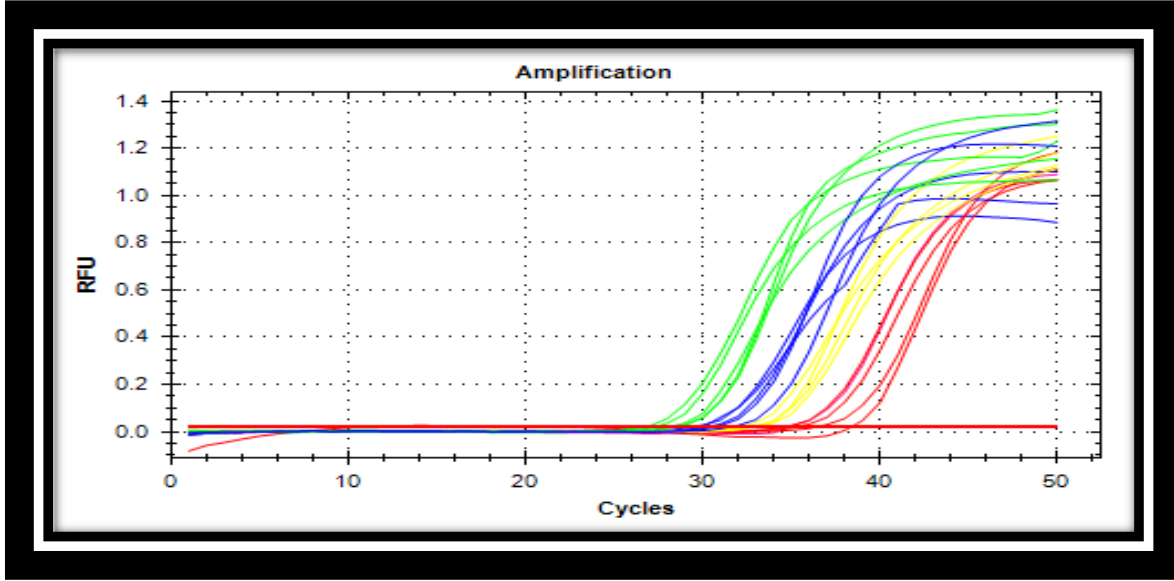
T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract ,T2 *C.albicans* + Epithelial Cell ,T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) *actin* gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

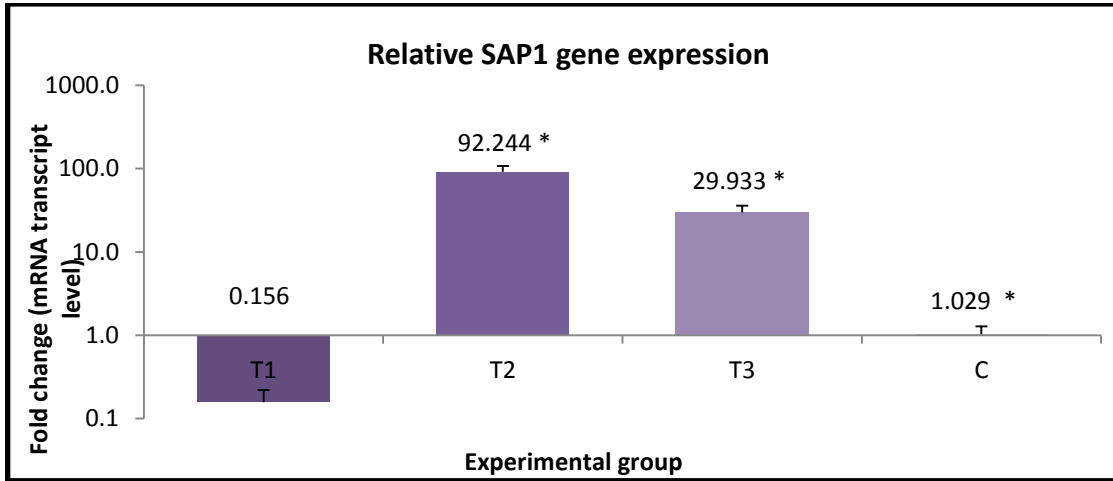
Second, the  $\Delta$  CT of the test isolates were normalized to the  $\Delta$  CT of the Control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator}) , \text{Fold Change of relative gene expression was by following equation} = (2^{-\Delta\Delta CT}) : \text{Normalized expression ratio}$$



الشكل 5: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *SAP1* في خمائر الـ *albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

1. المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C).
2. المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C.albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1.
3. المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C.albicans* مع الخلايا الطلانية T2.
4. المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C.albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلانية T3.



الشكل 6: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين *SAP1* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة

خامسا: نتائج التعبير الجيني لجين *SAP2* باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين *SAP2* قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلانية: تشير النتائج الموضحة في الجدول (33) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  $24.975 \pm 4.38852$  في المعاملة T2 وبفرق

معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع المعاملة C التي كانت قيمتها  $1.020 \pm 0.237$ .

2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين SAP2 قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول (33) الى ان التعبير الجيني لجين SAP2 كان في المجموعة C ذو قيمة  $1.020 \pm 0.237$  بينما انخفضت القيمة الى  $0.160 \pm 0.0365$  في المعاملة T1 و بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير الجيني لها  $24.975 \pm 4.38852$  مرتفعة بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير الجيني وبمقدار  $7.443 \pm 1.44415$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  شكل (7)، (8).

### الجدول 33: التعبير الجيني لجين SAP2 باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak method)

Treatment Isolation	CT (SAP2 gene)	CT (actin)	$\Delta$ CT (Test)	$\Delta$ CT (Control)	$\Delta\Delta$ CT	Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	Mean + Std.Error
T1	34.12	35.26	-1.14	-3.37	2.23	0.213	$0.160 \pm 0.03652$
T1	34.12	34.61	-0.49	-3.37	2.88	0.136	
T1	34.37	35.15	-0.78	-3.37	2.59	0.166	
T1	34.37	35.17	-0.80	-3.37	2.57	0.168	
T1	34.47	34.74	-0.27	-3.37	3.10	0.117	
T2	27.62	35.28	-7.66	-3.37	-4.28	19.482	$24.975 \pm 4.38852$
T2	27.53	35.53	-8.00	-3.37	-4.63	24.695	
T2	27.25	35.29	-8.04	-3.37	-4.67	25.437	
T2	27.53	35.46	-7.93	-3.37	-4.56	23.603	
T2	27.40	35.76	-8.36	-3.37	-4.98	31.660	
T3	29.06	35.71	-6.65	-3.37	-3.28	9.706	$7.443 \pm 1.44415$
T3	29.23	35.42	-6.19	-3.37	-2.81	7.035	
T3	29.23	35.58	-6.35	-3.37	-2.98	7.883	
T3	29.60	35.70	-6.10	-3.37	-2.73	6.635	
T3	28.45	34.40	-5.95	-3.37	-2.57	5.957	
C	31.88	35.31	-3.43	-3.37	-0.06	1.042	$1.020 \pm 0.237$
C	32.22	35.56	-3.34	-3.37	0.03	0.979	
C	32.16	35.15	-2.99	-3.37	0.38	0.768	
C	31.28	34.51	-3.23	-3.37	0.14	0.909	
C	31.52	35.38	-3.86	-3.37	-0.49	1.403	
Mean C	31.812	35.18	-3.37				

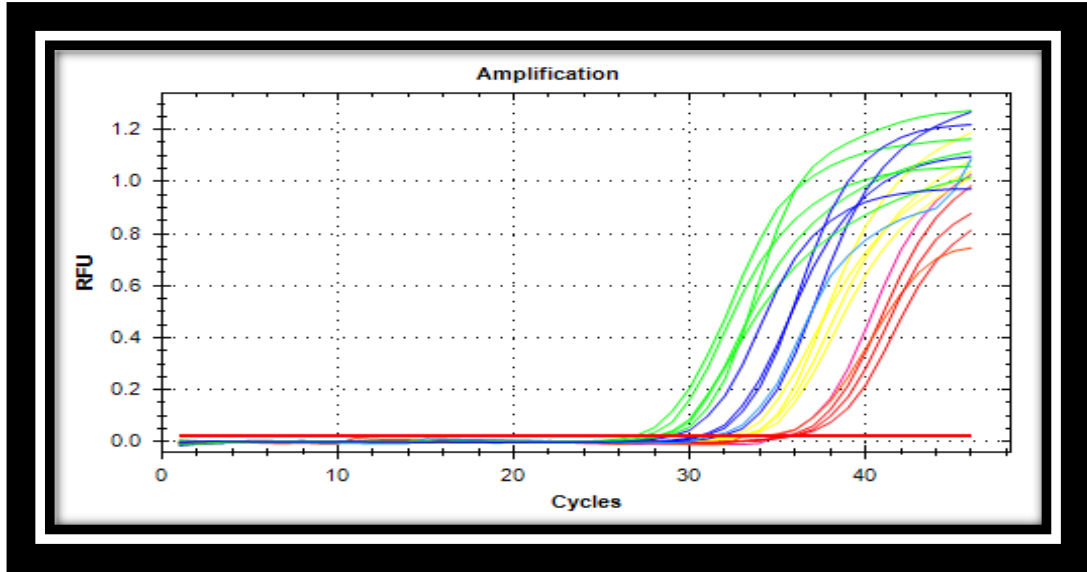
T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract , T2 *C.albicans* + Epithelial Cell , T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) *actin* gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

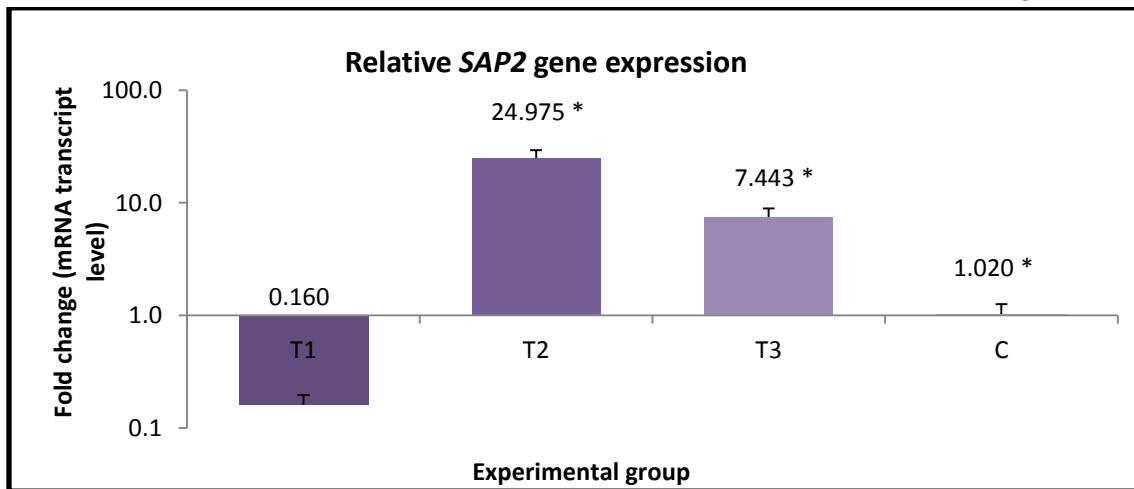
Second, the  $\Delta CT$  of the test isolates were normalized to the  $\Delta CT$  of the Control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator}) , \text{Fold Change of relative gene expression was by following equation } = (2^{-\Delta\Delta CT}): \text{Normalized expression ratio}$$



الشكل 7: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *SAP2* في خمائر الـ *C. albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

1. المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C) .
2. المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1 .
3. المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C. albicans* مع الخلايا الطلانية T2 .
4. المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلانية T3



الشكل 8: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين *SAP2* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

سادسا: نتائج التعبير الجيني لجين *SAP3* باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين *SAP3* قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلانية :  
تشير النتائج الموضحة في الجدول (34) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  
في المعاملة T2 وبفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع  
المعاملة C التي كانت قيمته  $1.016 \pm 0.19948$



2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين SAP3 قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول ( 34 ) الى ان التعبير الجيني لجين SAP3 كان في المجموعة C ذو قيمة  $1.016 \pm 0.19948$  ، بينما انخفضت القيمة الى  $0.127 \pm 0.04952$  في المعاملة T1 و بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير الجيني لها  $64.828 \pm 3.48543$  مرتفعة بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير الجيني وبمقدار  $14.900 \pm 2.14067$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  . شكل (9) و(10).

الجدول 34: التعبير الجيني لجين SAP3 استعمال طريقة (2<sup>-ΔΔ CT</sup> Livak method)

Treatment Isolation	CT (SAP3 gene)	CT (actin)	Δ CT (Test)	Δ CT (Control)	ΔΔ CT	Fold Change (2 <sup>-ΔΔ CT</sup> )	Mean + Std.Error
T1	35.22	35.26	-0.04	-3.04	3.00	0.125	0.127 ± 0.04952
T1	34.24	34.61	-0.37	-3.04	2.67	0.158	
T1	34.54	35.15	-0.61	-3.04	2.43	0.186	
T1	35.33	35.17	0.16	-3.04	3.20	0.109	
T1	35.87	34.74	1.13	-3.04	4.17	0.056	
T2	26.11	35.28	-9.17	-3.04	-6.13	69.941	64.828 ± 3.48543
T2	26.51	35.53	-9.02	-3.04	-5.98	63.124	
T2	26.33	35.29	-8.96	-3.04	-5.92	60.667	
T2	26.42	35.46	-9.04	-3.04	-6.00	64.218	
T2	26.67	35.76	-9.09	-3.04	-6.05	66.192	
T3	28.50	35.71	-7.21	-3.04	-4.17	18.036	14.900 ± 2.14067
T3	28.56	35.42	-6.86	-3.04	-3.82	14.109	
T3	28.62	35.58	-6.96	-3.04	-3.92	15.167	
T3	28.75	35.70	-6.95	-3.04	-3.91	15.076	
T3	27.76	34.40	-6.64	-3.04	-3.60	12.113	
C	32.02	35.31	-3.29	-3.04	-0.25	1.192	1.016 ± 0.19948
C	32.22	35.56	-3.34	-3.04	-0.30	1.234	
C	32.46	35.15	-2.69	-3.04	0.35	0.787	
C	31.45	34.51	-3.06	-3.04	-0.03	1.019	
C	32.58	35.38	-2.80	-3.04	0.24	0.848	
Mean C	32.146	35.18	-3.04				

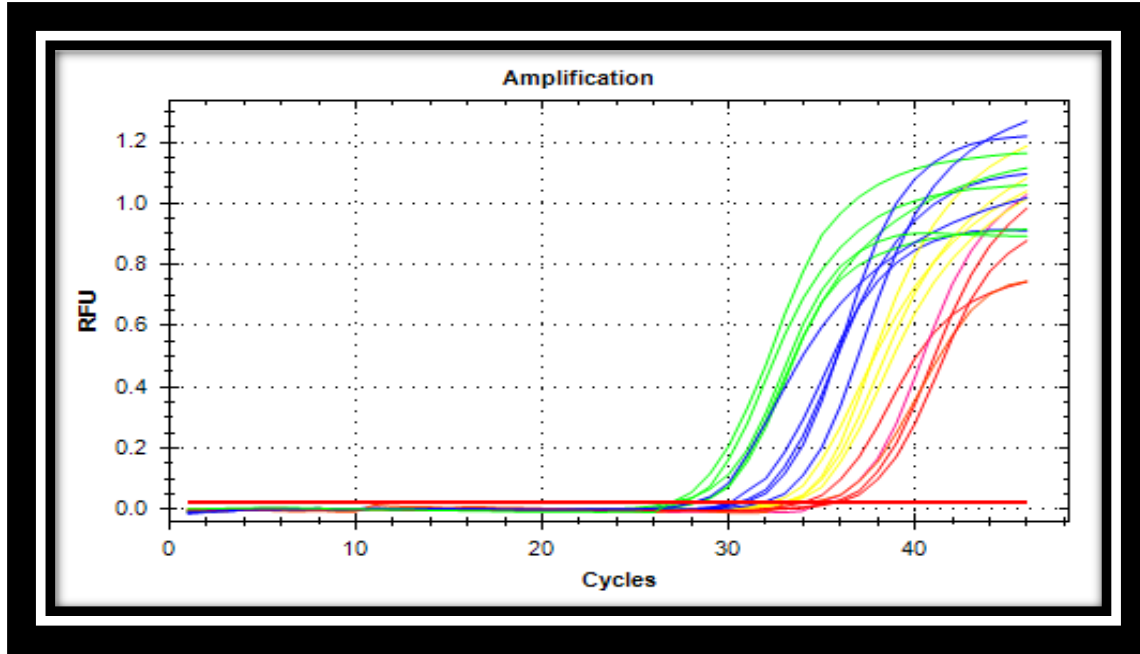
T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract , T2 *C.albicans* + Epithelial Cell , T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number (2<sup>-ΔΔ CT</sup> Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) actin gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

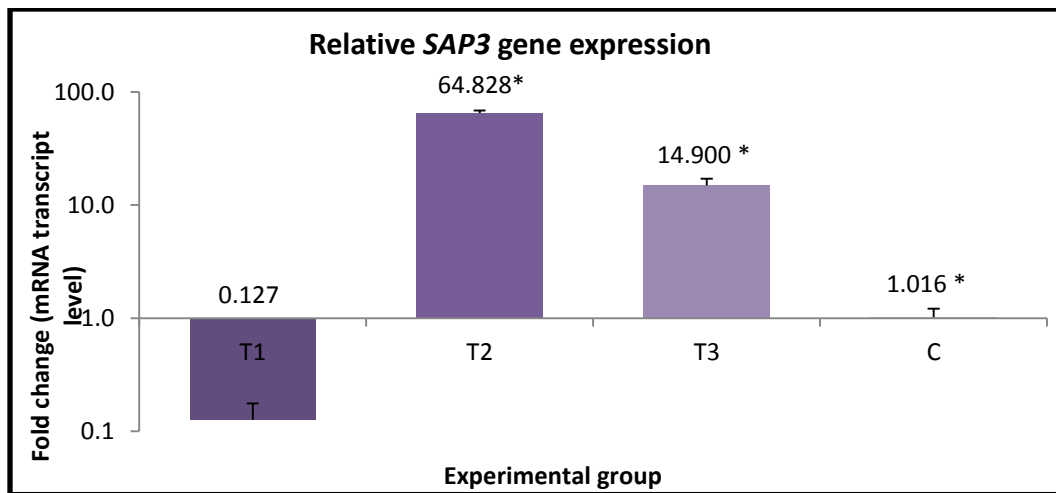
Second, the Δ CT of the test isolates were normalized to the Δ CT of the Control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator}) , \text{Fold Change of relative gene expression was by following equation} = (2^{-\Delta\Delta CT}) : \text{Normalized expression ratio}$$



الشكل 9: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين SAP 3 في خمائر الـ *C. albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

1. المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C).
2. المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1.
3. المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C. albicans* مع الخلايا الطلانية T2.
4. المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلانية T3.



الشكل 10: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين SAP 3 في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة

\* = تشير إلى وجود فرق معنوي بإختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ .

سابعاً: التعبير الجيني لجين SAP4 باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين SAP4 قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلانية: تشير النتائج الموضحة في الجدول (35) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  $71.766 \pm 10.42177$  في المعاملة T2 وبفرق

معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع المجموعة C التي كانت قيمتها  $(1.069 \pm 0.38236)$

2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين SAP4 قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول ( 35 ) الى ان التعبير الجيني لجين SAP4 كان في المجموعة C ذو قيمة  $1.069 \pm 0.38236$  بينما انخفضت القيمة الى  $0.104 \pm 0.02304$  في المعاملة T1 و بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير الجيني لها  $71.766 \pm 10.42177$  مرتفعة بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير الجيني وبمقدار  $19.872 \pm 6.06794$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ . شكل (11) (12).

الجدول 35: التعبير الجيني لجين SAP4 باستعمال طريقة  $(2^{-\Delta\Delta CT} \text{ Livak method})$ .

Treatment Isolation	CT (SAP4 gene)	CT (actin)	$\Delta CT$ (Test)	$\Delta CT$ (Control)	$\Delta\Delta CT$	Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	Mean + Std.Error
T1	35.16	35.26	-0.10	-2.90	2.80	0.143	0.104 ± 0.02304
T1	35.28	34.61	0.67	-2.90	3.57	0.084	
T1	35.52	35.15	0.37	-2.90	3.27	0.104	
T1	35.70	35.17	0.53	-2.90	3.43	0.093	
T1	35.24	34.74	0.50	-2.90	3.40	0.095	
T2	26.51	35.28	-8.77	-2.90	-5.87	58.326	71.766 ± 10.42177
T2	26.32	35.53	-9.21	-2.90	-6.31	79.238	
T2	26.32	35.29	-8.97	-2.90	-6.07	67.221	
T2	26.45	35.46	-9.01	-2.90	-6.11	69.210	
T2	26.45	35.76	-9.31	-2.90	-6.41	84.835	
T3	28.20	35.71	-7.51	-2.90	-4.61	24.434	19.872 ± 6.06794
T3	28.21	35.42	-7.21	-2.90	-4.31	19.788	
T3	28.22	35.58	-7.36	-2.90	-4.46	22.021	
T3	28.24	35.70	-7.46	-2.90	-4.56	23.624	
T3	28.25	34.40	-6.15	-2.90	-3.25	9.491	
C	31.88	35.31	-3.43	-2.90	-0.53	1.446	1.069 ± 0.38236
C	32.21	35.56	-3.35	-2.90	-0.45	1.368	
C	32.31	35.15	-2.84	-2.90	0.06	0.960	
C	32.66	34.51	-1.85	-2.90	1.05	0.485	
C	32.36	35.38	-3.02	-2.90	-0.12	1.087	
Mean C	32.284	35.18	-2.90				

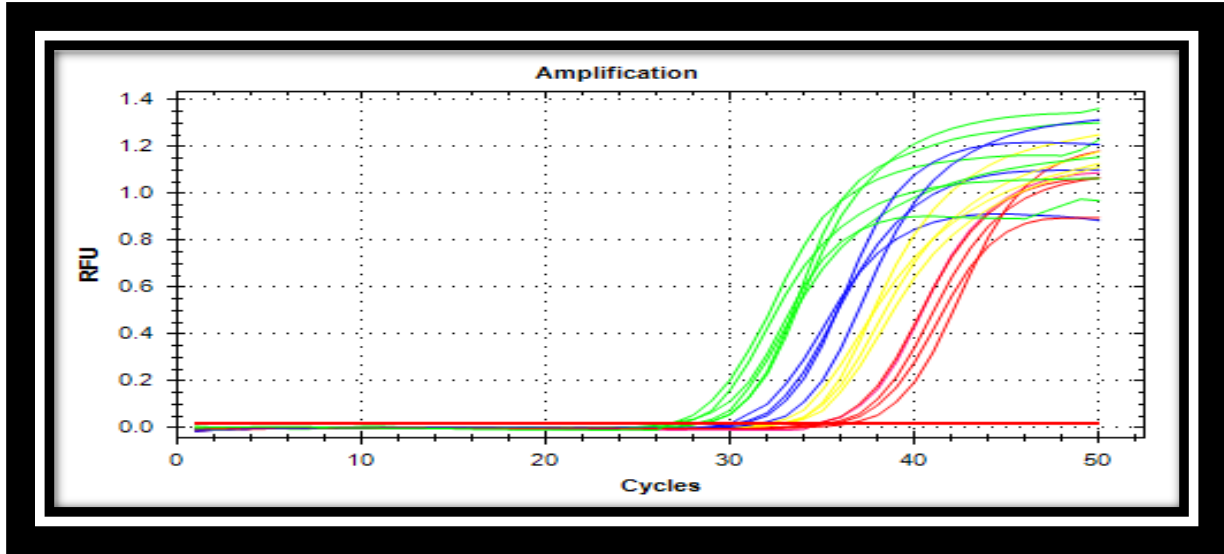
T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract , T2 *C.albicans* + Epithelial Cell , T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number (2- $\Delta\Delta CT$  Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) actin gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

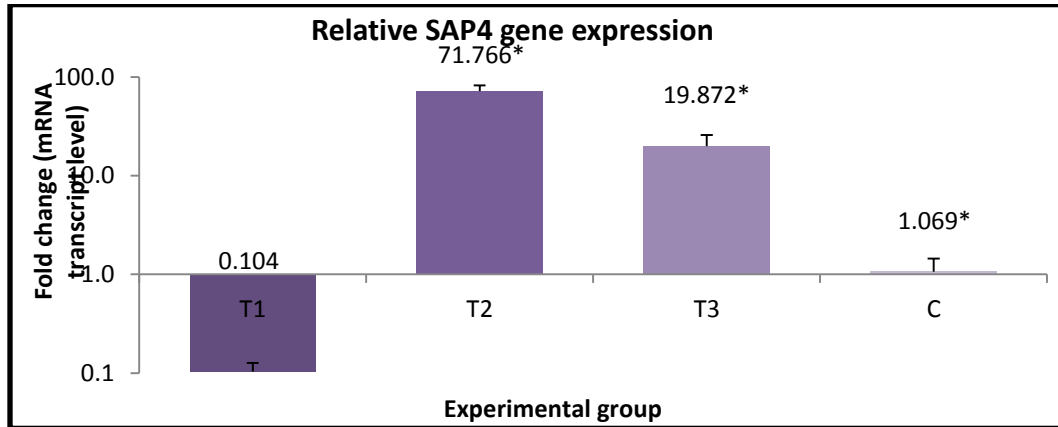
Second, the  $\Delta CT$  of the test isolates were normalized to the  $\Delta CT$  of the Control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator}) , \text{Fold Change of relative gene expression was by following equation } = (2^{-\Delta\Delta CT}): \text{Normalized expression ratio}$$



الشكل 11: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *SAP4* في خمائر الـ *C. albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

1. المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C).
2. المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1.
3. المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C. albicans* مع الخلايا الطلائية T2.
4. المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلائية T3.



الشكل 12: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين *SAP4* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة

\* = تشير إلى وجود فرق معنوي بإختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ .

ثامناً: نتائج التعبير الجيني لجين *SAP5* باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين *SAP5* قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلائية تشير النتائج الموضحة

في الجدول ( 36 ) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  $37.156 \pm 7.66049$  في المعاملة T2

وبفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع المجموعة C التي كانت قيمتها

$$1.040 \pm 0.32229$$

2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين SAP5 قبل واثناء إصابة الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول (36) الى ان التعبير الجيني لجين SAP5 كان في المجموعة C ذو قيمة  $1.040 \pm 0.3229$  بينما انخفضت القيمة الى  $0.074 \pm 0.01542$  في المعاملة T1 و بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير الجيني لها  $37.156 \pm 7.66049$  مرتفعة بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير الجيني وبمقدار  $19.565 \pm 8.82162$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  شكل (13) (14).

### 3. جدول 36 : التعبير الجيني لجين SAP5 باستعمال طريقة (2<sup>-ΔΔ CT</sup> Livak method)

Treatment Isolation	CT (SAP5 gene)	CT (actin)	Δ CT (Test)	Δ CT (Control)	ΔΔ CT	Fold Change (2 <sup>-ΔΔ CT</sup> )	Mean + Std.Error
T1	35.26	35.26	0.00	-3.38	3.38	0.096	0.074 ± 0.01542
T1	35.42	34.61	0.81	-3.38	4.19	0.055	
T1	35.52	35.15	0.37	-3.38	3.75	0.074	
T1	35.45	35.17	0.28	-3.38	3.66	0.079	
T1	35.31	34.74	0.57	-3.38	3.95	0.065	
T2	27.13	35.28	-8.15	-3.38	-4.77	27.210	37.156 ± 7.66049
T2	26.72	35.53	-8.81	-3.38	-5.43	43.055	
T2	26.52	35.29	-8.77	-3.38	-5.39	41.957	
T2	27.15	35.46	-8.31	-3.38	-4.93	30.546	
T2	26.95	35.76	-8.81	-3.38	-5.43	43.010	
T3	27.25	35.71	-8.46	-3.38	-5.08	33.844	19.565 ± 8.82162
T3	28.11	35.42	-7.31	-3.38	-3.93	15.206	
T3	27.72	35.58	-7.86	-3.38	-4.48	22.329	
T3	28.64	35.70	-7.06	-3.38	-3.68	12.836	
T3	27.25	34.40	-7.15	-3.38	-3.77	13.609	
C	31.44	35.31	-3.87	-3.38	-0.49	1.406	1.040 ± 0.32229
C	31.75	35.56	-3.81	-3.38	-0.43	1.349	
C	31.89	35.15	-3.26	-3.38	0.12	0.921	
C	31.72	34.51	-2.79	-3.38	0.59	0.667	
C	32.22	35.38	-3.16	-3.38	0.22	0.859	
Mean C	31.804	35.18	-3.38				

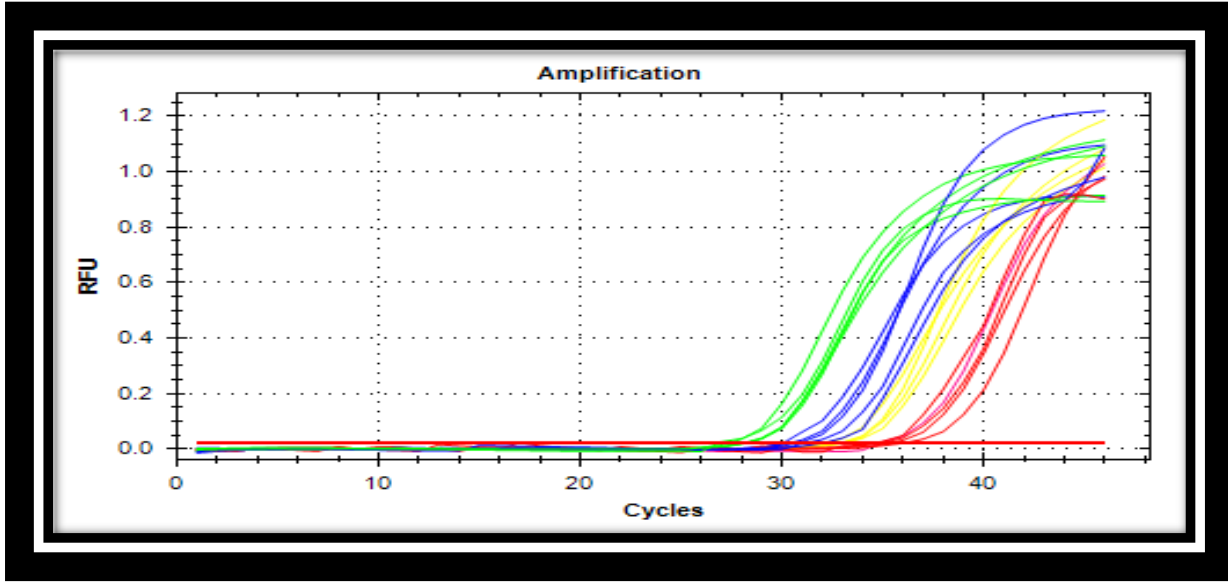
T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract ,T2 *C.albicans* + Epithelial Cell ,T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number (2<sup>-ΔΔ CT</sup> Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) actin gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

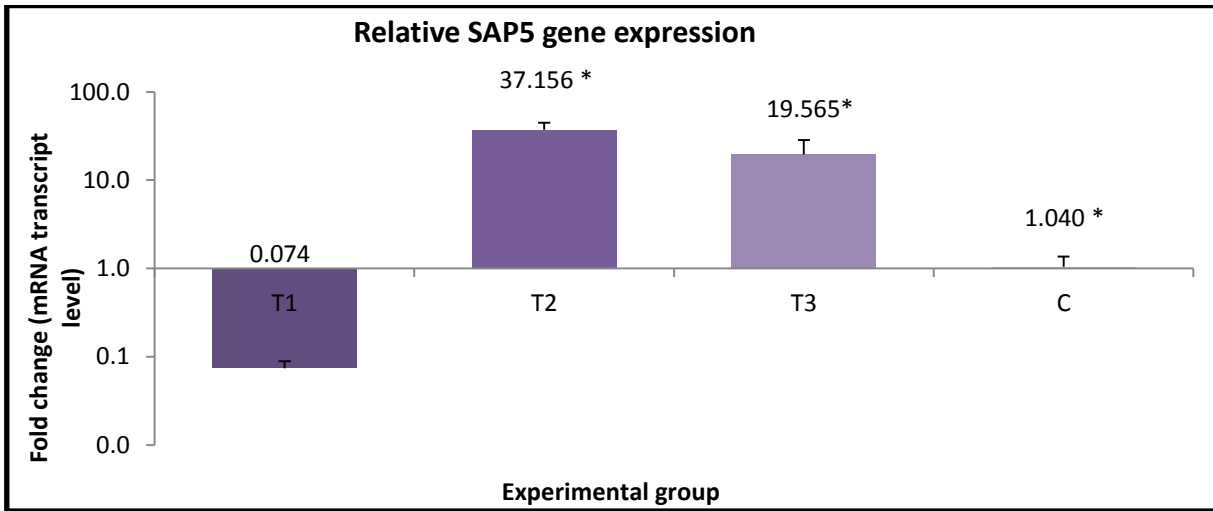
Second, the Δ CT of the test isolates were normalized to the Δ CT of the Control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator}), \text{Fold Change of relative gene expression was by following equation } = (2^{-\Delta\Delta CT}): \text{Normalized expression ratio}$$



الشكل 13: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين SAP 5 في خمائر الـ *C. albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

1. المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C).
2. المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1.
3. المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C. albicans* مع الخلايا الطلانية T2.
4. المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلانية T3.



الشكل 14: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين SAP 5 في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة

تاسعا: نتائج التعبير الجيني لجين SAP7 باستعمال طريقة ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak method)

1. التعبير الجيني لجين SAP7 قبل واثناء اصابة الخميرة للخلايا الطلانية: تشير النتائج الموضحة في الجدول (37) الى ارتفاع معدل التعبير الجيني  $24.850 \pm 2.92079$  في المعاملة

T2  $24.850 \pm 2.92079$  وبفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  بالمقارنة مع

المجموعة C التي كانت قيمة  $1.040 \pm 0.30355$

2. تأثير المستخلص المائي لبذور المورينجا على التعبير الجيني لجين SAP7 قبل واثناء اصابة

الخميرة للخلايا الطلائية: تشير النتائج في الجدول (37) الى ان التعبير الجيني لجين SAP7 كان في

المجموعة C ذو قيمة  $1.040 \pm 0.30355$  بينما انخفضت القيمة الى في المعاملة T1 و

بفرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، اما فيما يخص المعاملة T2 كانت قيمة التعبير

الجيني لها  $24.850 \pm 2.92079$  مرتفعة بالمقارنة مع المعاملة T3 التي انخفض فيها التعبير

الجيني وبمقدار  $10.563 \pm 2.81859$  مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  شكل

(15)(16).

3. الجدول 37: التعبير الجيني لجين SAP7 باستعمال طريقة (Livak method)  $2^{-\Delta\Delta CT}$

Treatment Isolation	CT (SAP7 gene)	CT (actin)	$\Delta CT$ (Test)	$\Delta CT$ (Control)	$\Delta\Delta CT$	Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	Mean + Std.Error
T1	35.16	35.26	-0.10	-4.72	4.63	0.040	$0.042 \pm 0.01645$
T1	35.28	34.61	0.67	-4.72	5.39	0.024	
T1	35.52	35.15	0.37	-4.72	5.09	0.029	
T1	34.44	35.17	-0.73	-4.72	3.99	0.063	
T1	34.24	34.74	-0.50	-4.72	4.22	0.054	
T2	26.14	35.28	-9.14	-4.72	-4.41	21.289	$24.850 \pm 2.92079$
T2	26.34	35.53	-9.19	-4.72	-4.46	22.072	
T2	25.81	35.29	-9.48	-4.72	-4.76	27.036	
T2	26.01	35.46	-9.45	-4.72	-4.73	26.518	
T2	26.26	35.76	-9.50	-4.72	-4.77	27.333	
T3	27.26	35.71	-8.45	-4.72	-3.73	13.240	$10.563 \pm 2.81859$
T3	27.06	35.42	-8.36	-4.72	-3.63	12.403	
T3	28.23	35.58	-7.35	-4.72	-2.63	6.177	
T3	27.73	35.70	-7.97	-4.72	-3.25	9.502	
T3	26.15	34.40	-8.25	-4.72	-3.52	11.492	
C	30.32	35.31	-4.99	-4.72	-0.27	1.204	$1.040 \pm 0.30355$
C	30.52	35.56	-5.04	-4.72	-0.32	1.246	
C	30.03	35.15	-5.12	-4.72	-0.40	1.317	
C	30.13	34.51	-4.38	-4.72	0.34	0.790	
C	31.30	35.38	-4.08	-4.72	0.64	0.640	
Mean C	30.46	35.18	-4.72				

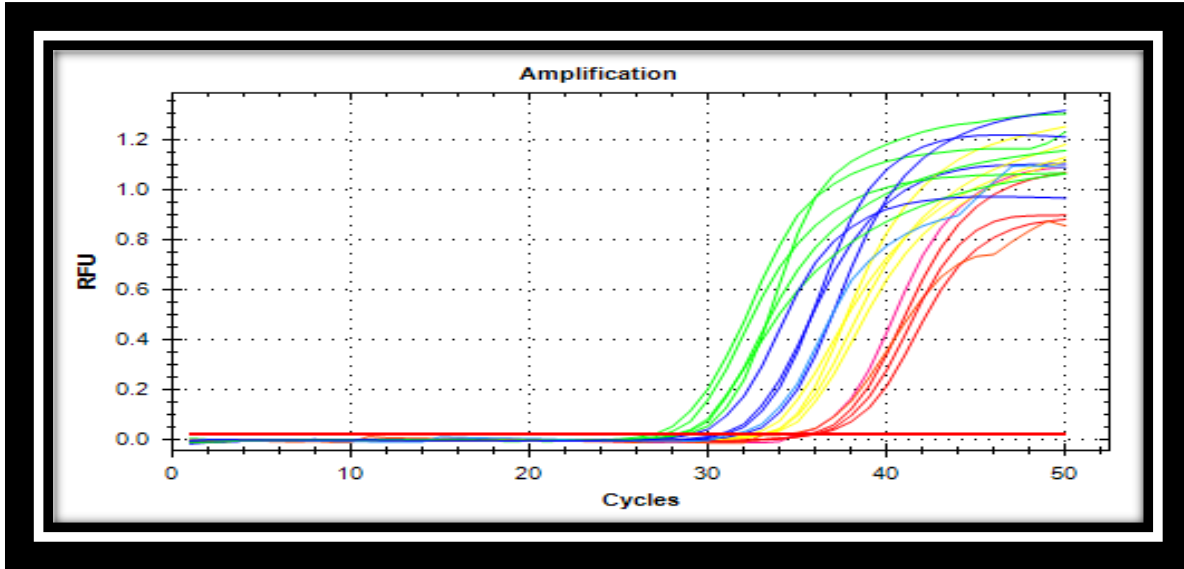
T1 *C.albicans* + *Moringa oleifera* seed Extract ,T2 *C.albicans* + Epithelial Cell ,T3 *C.albicans* + Epithelial Cell + *Moringa oleifera* seed Extract , C *C.albicans* only , CT: q PCR Threshold Cycle number (2- $\Delta\Delta CT$  Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) actin gene, for both the test isolates and the Control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{Control}) = CT(\text{target, Control}) - CT(\text{ref, Control})$$

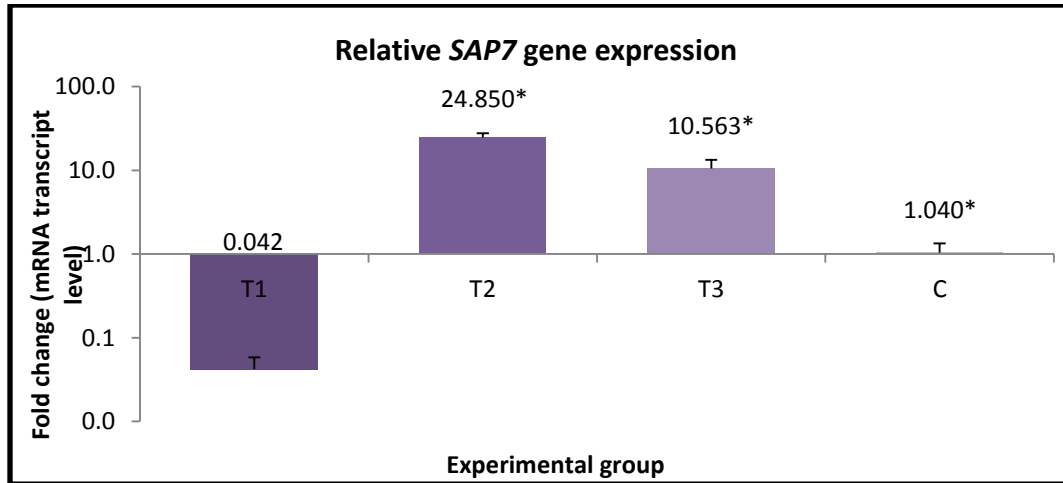
Second, the  $\Delta CT$  of the test isolates were normalized to the  $\Delta CT$  of the Control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{Calibrator}), \text{Fold Change of relative gene expression was by following equation } = (2^{-\Delta\Delta CT}): \text{Normalized expression ratio}$$



الشكل 15: منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *SAP 7* في خمائر الـ *C. albicans* حيث تمثل المنحنيات كالاتي:

1. المنحنيات ذات اللون الاصفر مجموعة السيطرة (C) .
2. المنحنيات ذات اللون الاحمر مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا T1 .
3. المنحنيات ذات اللون الاخضر مجموعة *C. albicans* مع الخلايا الطلانية T2 .
4. المنحنيات ذات اللون الازرق مجموعة *C. albicans* مع مستخلص بذور المورينجا والخلايا الطلانية T3



الشكل 16: الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين *SAP 7* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

ان تقنية تفاعل سلسلة انزيم البلمرة في الوقت الحقيقي (qRT-PCR) تمتاز بالدقة والحساسية وخاصة عند قياس التعبير الجيني لأحدى الجراثيم، اذ تعطي هذه التقنية تعبيراً جزيئياً واضحاً من حيث النوع والكمية مقارنة مع التقنيات الأخرى المستعملة في المجال نفسه لتحديد انتاج انزيم RNAase (Bustin,2002) وان المفتاح الرئيسي لفهم الية حدوث داء المبيضات الفموي يأتي من دراستنا



لجينات عوامل الضراوة *SAP7, SAP5, SAP1, SAP4, SAP3, SAP2, HWPI, ALS1* التي تفرزها *C. albicans* بوصفها عوامل ضراوة لاستعمار اجزاء الفم وحدوث الالتهاب، فبالنسبة لنتائج جين *ALS1* الموضحة في الجدول (30) للمعاملة C تتفق مع دراسة (Cota and Hoyer (2015) اللذان اشاروا الى ان عزلات الـ *C. albicans* المعزولة من الفم تمتلك جين *ALS1* الذي يشفر لانتاج بروتين Agglutinin-like protein 1 المسؤول عن عملية التصاق خميرة المبيضات بخلايا وأنسجة المضيف، والتي تعد الخطوة الاولى لعملية الاستعمار، وتحدث بفعل تكوين طبقة ليفية مكونة من سكريات متعددة وتكون أيضاً ذات طبيعة بروتينية سكرية تساعد على ارتباط الخميرة ببروتينات وكربوهيدرات أغشية خلايا المضيف (Glee et al., 2001) و فيما يخص نتائج جين *HWPI* الموضحة في الجدول (31) للمعاملة C تتفق مع ما ذكره (Cavalcanti et al. (2015) الذين اشاروا الى ان عزلات الـ *C. albicans* المعزولة من الفم تمتلك جين *HWPI* الذي يشفر لانتاج بروتين Hyphal Wall Protein 1 المسؤول عن تكوين الاغشية الحيوية تكوين الغشاء الحيوي وجعل الخميرة مقاومه للظروف المحيطة بها (Sundstrom et al., 2002) اما بالنسبة لجينات *SAP4, SAP3, SAP2, SAP1* و *SAP7, SAP5,* الدراسة متفقة مع دراسة (Koelsch et al. (2000b) الذين اشاروا الى ان عزلات الـ *C. albicans* المعزولة من الفم تمتلك جينات *SAP7, SAP5, SAP4, SAP3, SAP2, SAP1* المسؤولة عن انتاج انزيم Secreted Aspartyl Proteinases .

ومن خلال الجداول (30) الى (37) نلاحظ ارتفاع معدل انتاج التعبير الجيني للمعاملة T2

للجميع جينات عوامل الضراوة *SAP7, SAP1, SAP4, SAP3, SAP2, HWPI, ALS1* عن المعاملة C وبفروقات معنوية عالية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$ ، و يعود سبب الارتفاع الى ان الخلايا الطلائية تعد وسطا حيويا يحتوي على مواد مساعده لنموها وتكاثرها ويعتبر وجودها عاملا محفزا لانتاج الانزيمات الخاصة بامراضية المبيضات، وان ارتباط الـ *C. albicans* بالخلايا الطلائية عن طريق مستقبلات موجودة على سطح الخلايا الطلائية مثلا factor Transglutaminases يقابلها مستقبلات خاصة بها على الكانديدا تدعى *HWPI* و المستقبلات *ALS family* host Cell ferritin، N- Cadherin، E- Cadherin يقابلها الكانديدا (Sundstrom, 2002: Zhao et al., 2003)، بعدها يزداد نشاط الخميرة وتحتاج الى افراز انزيمات تحلل الأنسجة ومنها انزيمات الـ Secreted Aspartyl Proteinases المشفرة من قبل جينات *SAP family* التي تساعد الخميرة للتحليل واختراق الانسجة وغزو باقي اجزاء الجسم

وتوفير العناصر الغذائية ( Julian *et al.*,2003 ) الملاحظ في الجداول نفسها ان هنالك فرق في تعبير جينات عائلة SAP المشمولة بالدراسة *SAP1* , *SAP2* , *SAP3* , *SAP4* , *SAP5* , *SAP7* للمعاملة T2 ، حيث سجل الجين *SAP1* اعلى معدل في التعبير الجيني وبمقدار  $92.244 \pm 15.88358$  يليه الجين *SAP4* وبمعدل  $71.766 \pm 10.42177$  وبعده الجين *SAP3* وبمعدل  $64.828 \pm 3.48543$  ثم الجين *SAP5* وبمعدل مقداره  $37.156 \pm 7.66049$  ثم الجين *SAP2* بمعدل  $(24.975 + 4.38852)$  بينما سجل الجين *SAP7* اقل معدل في التعبير الجيني وهو  $(24.850 + 2.92079)$  وهذا يعني ان الجين *SAP1* له دور كبير واساسي في الامراضية .

بينما نلاحظ انخفاض معدل انتاج التعبير الجيني للمعاملة T1 لجميع جينات عوامل الضراوة *SAP7* , *SAP5* , *SAP4* , *SAP3* , *SAP2* , *SAP1* , *HWPI* , *ALSI* عن المعاملة C وبفروقات معنوية عالية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  قد يعود لاحتواء المستخلص على مواد تعمل على خفض او تعطيل التنظيم الجيني في الخلية كالتانينات التي لها القدرة على الارتباط مع بروتينات الخلية بواسطة روابط هيدروجينية او روابط تساهمية و تشكيل معقدات معها وبذلك تعمل على تعطيل الانزيمات والبروتينات الناقلة في الخلية ، وانها بتراكيز قليلة منها تعمل على تضيق النبيبات الدقيقة في جدار الخلية ومن بعدُ تمنع دخول المواد من والى الخلية وكذلك تجريد الخلية من المعادن كالحديد والمغنسيوم (Latte and Kolodzie,2000) ، وان سحب المغنسيوم من الخلية يؤدي الى ال تأثير على عمل الـ RNA polymerase الذي يشترك بعملية استنساخ mRNA من الـ DNA وهي الخطوة الاولى لبناء البروتين لان عامل مساعد يساعده على اضافة النيوكلووتيدات وبالتالي فقده يقلل التعبير الجيني ( Bruce ,2002 ) بالاضافة الى ان هنالك دراسات تذكر ان للتانينات تأثير مثبط لانزيمات النسخ العكسي الفايروسي ( Kakiuchi *et al.*,1985 ) .

وفيما يخص انخفاض التعبير الجيني في المعاملة T3 لجميع جينات عوامل الضراوة *SAP7* , *SAP5* , *SAP4* , *SAP3* , *SAP2* , *SAP1* , *HWPI* , *ALSI* عن المعاملة T2 وبفروقات معنوية عالية عند مستوى احتمال  $P \leq 0.01$  فهذا يعني ان المستخلص له دور فعال ايضا مع وجود الخلايا الطلانية التي حفزت التعبير الجيني في المعاملة T2 .

# الفصل الخامس

## الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and

Recommendations

## Conclusions

## الاستنتاجات

1. يعد النوع *C.albicans* هي الخميرة السائدة في احداث الاصابة بداء المبيضات الفموي للمرضى السرطان
2. المبيضات البيضاء تمتلك جينات *ALS1*، *HWP1*، *SAP2*، *SAP3*، *SAP1*، *SAP4*، *SAP5*، *SAP7*، تشفر لانتاج عوامل الضراوة الالتصاق، الاغشية الحيوية، انتاج الانزيم المحلل للبروتين والتي تؤهلها لاحداث الاصابة وبنسب مختلفة حسب النوع.
3. يحتوي المستخلص المائي لبذور المورينجا على مركبات فعالة والتي قد تكون سببا في تثبيط نمو *C.albicans* في الاوساط الغذائية الصلبة، كما للمستخلص المائي لبذور المورينجا دور فعال في خفض معدل التعبير الجيني لعوامل الضراوة قيد الدراسة
4. للخلايا الطلائية دور في تحفيز انتاج عوامل الضراوة في *C.albicans* لانها تعد وسطا حيويا يحتوي على مواد مساعدة لنموها وتكاثرها ويعتبر وجودها محفز لانتاج الانزيمات.

## Recommendations

## التوصيات

1. التوسع في اجراء دراسات مماثلة حول فطريات اخرى في حالات الاصابة بالسرطان للحد من ضرورتها
2. استخدام مستخلصات نباتية ودراسة تأثيرها المضاد للـ *C.albican* و استخدام تقنية R-time PCR للكشف عن تأثير مستخلصات النباتات اخرى على عوامل الضراوة لاحياء المجهرية
3. ادخال المستخلص المائي لبذور المورينجا في صناعات دوائية بعد اجراء دراسات موسعة عليه للحد من الاصابات الفموية وغيرها
4. دراسة المعايير المناعية للاشخاص المصابين بداء المبيضات الفموي للحالات السرطانية

# المصادر

## References

## المصادر العربية:

1. الراوي، خاشع محمود (1992). المدخل الى الاحصاء كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل-العراق
2. الزيدي، مجيد، (2000). علم الأحياء المجهرية النظري، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة بغداد
3. شامي، سامي اغا، (1982). دراسة بعض الصفات الدوائية والسمية لأزهار القيصوم . رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .
4. هيكل، محمد و عمر، عبد الله عبد الرزاق، (1988). النباتات الطبية، انتاجها، فوائدها، منشأة المعارف في الاسكندرية .

## المصادر باللغة الانكليزية:

1. Abbas, J.;Bodey, G.P.; Hanna ,H .A.; Mardani ,M. ; Girgawy, E.;  
Abi-Said, D.; Whimbey, E.; Hachem, R.; and Raad, I. J.  
(2000).*Candida krusei* fungemia. an escalating serious infection in  
immunocompromised patients. Arch Intern Med. 160: 2659-2664.
2. Abdelghani, S. ; Timothy E. K. ; David P. ; Vishnu C. ; May W. ;  
Andrea D. ; Steven P. ; and Kent A. S. ( 2001). *Candida*  
*dublinsiensis* at a Cancer Center Clinical Infectious Diseases ;  
32:1034–8.
3. Abdulmoneim, M. ; Saadabi, and Abu Zaid, I.E. (2011). An invitro  
antimicrobial activity of *Moringa oleifera* seed extracts against  
different groups of microorganisms. Australian Journal of Basic and  
Applied Sciences . 5(5): 129-134.
4. Al- Dabagh, N. N. (2015). Detection of enzymatic activities of  
*Candida* species isolated from hospitalized patients in Hilla. J.of  
Pharmacy and Biological Sciences . 2278-3008.
5. AL-Khazragi,S.M. (1991).Biopharmacological study of Artemisa  
herbaalba.MSc.Thesis. University Baghdad .
6. Alonso –Vargas, R.;Elorduy, L. ; Evaso, E ; Cano, J.F. ; Guarro, J.  
and Ponton, J. (2008). Isolation of *Candida africana*, probable a  
typical strains of *Candida albicans* from a patient with vaginitis Journal  
of Medical Mycology. 46 pp. 167–170
7. Alves, S.H.; Milan ,E.P.; Sant’ana, P.L.; Oliveira, L.O.; Santurio,  
J.M.and Colombo, A.L. (2002).Hypertonic sabouraud broth as a



- simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. Diagnostic Microbiol Infect Dis., 43:85-86..
8. **Antoniadou, A. ; Torres, H.A ; Lewis R.E. ; Thornby J. ; Bodey G.P. and Tarrand J.P. ( 2003).** Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. Medicine. 82:309–321.
  9. **Anwar, F. and Rashid U. ( 2007).** Physico-chemical characteristics of *Moringa Oleifera* seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. Pak. J. Bot. 39(5): 1443-1453.
  10. **Augustin, S. ;(1991).** Antimicrobial properties of tannin Phytochemistry. 30(12):387-388
  11. **Baron, E.J ; Peterson, L.R. and Finegold, S.M. 1994).** Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 9th ed. (pp 168-193). St. Louis: Mosby-Year Book. Inc
  12. **Basson, N.J. ;(2000).** Competition for glucose between *Candida albicans* and oral bacteria grown in mixed culture in a chemostat. J Med Microbiol. ;49:969–975.
  13. **Belazi ,M.; Velegraki, A.; Koussidou-Eremondi, T.; Andreadis, D.; Hini, S. and Arsenis, G. (2004).** Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. Oral Microbiol Immunol. 19:347-351.
  14. **Bellm, L.A.; Epstein, J.B.; Rose-Ped, A.; Martin, P. and Fuchs ,H.J. (2000).** Patient reports of complications of bone marrow transplantation. Support Care Cancer.;8:33–39.

15. **Bendel, C.M. (2003).** Colonization and epithelial adhesion in the pathogenesis of neonatal candidiasis *Seminars in Perinatology*. 27 (pp. 357–364).
16. **Benson, H.J. (2002).** *Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology* .8<sup>th</sup>ed .The the McGraw-Hill Companies.USA.
17. **Berger, A. (2004).** *Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting*. Bethesda, Md: CMP Healthcare Media, Oncology Publishing Group.
18. **Beveridge, R.A.; Miller, J.A. and Kales, A.N. (1998).** A comparison of efficacy of sargramostim (yeast-derived RhuGM-CSF) and filgrastim (bacteria-derived RhuG-CSF) in the therapeutic setting of chemotherapy-induced myelosuppression . *Cancer Invest*. 16 (6): 366–373.
19. **Branda ,S. S. ; Vik,A. ; Friedman, L. and Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited . *Trends in Microbiology*. 13(1). 20–26.
20. **Brighenti, F.L. ; Medeiros, A.C. ; Matos, B.M. ;Ribeiro Z.E. and Koga-Ito C.Y . (2014).** Evaluation of caries-associated virulence of biofilms from *Candida albicans* isolated from saliva of pediatric patients with sickle-cell anemia. *J Appl Oral Sci*. Nov-Dec;22(6):484-9.
21. **Brooks, G. F. ; Bulte, J. S. and Mores, S. A. (1998).** *Immunology In: Jawetz, E.; Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. Medical Microbiology. Middle East Edition. Appelton and Lange.*
22. **Bruce, A. (2002).** *Molecular Biology of the Cell* , Garland Science. 4edition.

23. **Bustin, S. A. (2002).** Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. *J. Mol. Endocrinal*, 25: 169 – 193.
24. **Calderone, R. A. ; and Fonzi, W. A. ( 2001) .** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*9:327-335.
25. **Calderone, R.A.and Clancy, C.J. (2012).** *Candida* and Candidiasis: ASM Press, Washington, D.C.
26. **Campbell,C.K. ;Holmes , A.D.; Davey ,K.G.; Szekely , A.and Warnock, D.W. (1998) .** Comparison of a new Chromogenic agar with germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans* . *Eur J clin microbial infec Dis .*, 17:367-8.
27. **Cavalcanti , Y.W.;Morse, D.J.; da Silva, W.J.; Del-Bel-Cury A.A, Wei, X. ;Wilson M. ; Milward P.; Lewis,M.;Bradshaw D.and Williams D.W. (2015).** Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling.* ;31(1):27-38.
28. **Chaffin, W. L.; Lopez-Ribot, J. L. ; Casanova, M. ; Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998) .** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. J. Mol. Biol. Rev.* 62:130-180.
29. **Chandra, J. ; Mukherjee, P. K. ;Leidich, S. D. ;Faddoul, F. F. ;Hoyer, L. L. ;Douglas, L. J. and Ghannoum, M. A. ;(2001).** Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J .Dent Res* 80, 903–908.

30. **Chritchaly, I.A. and Douglas, J.L. (1987).** Isolation and partial characterization of an adhesion from *Candida albicans*, *J. of General Microbiology*, 133:629-633.
31. **Chun, H. ; Jun, W.J. ; Shin, D.H. ; Hong, B.S. ; Cho, H.Y. and yang, H.C. (2001).** Purification and characterization of anti-complementary polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris* L., *Chem. Pharm. Bull*, 49(6): pp.762-764.
32. **Clayton, B. ; Green, G. ; Cheng, J. ; Yotsna C. ; Pranab M., Mahmoud, A. G. and Lois, L. H. (2004).** RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model Biofilms, *Microbiology*, 150, 267–275.
33. **Colin, K. C. ; Kate, G. D. ; Ann, D. H. ; Adrien, S. ; and David, W. W. (1999).** Comparison of the API Candida System with the Auxacolor System for Identification of Common Yeast Pathogens 37(3): 821–823
34. **Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996).** Mackie and McMarteny. *Practical Medical Microbiology*. 14<sup>th</sup>.ed. Churchill Livingstone Inc., New York, U.S.A.
35. **Cota, E. and Hoyer, L. (2015).** The *Candida albicans* agglutinin-like sequence family of adhesins: functional insights gained from structural analysis *Future Microbiol.* 10(10):1635-548
36. **Cowan, M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* : 12(4) : 564-582
37. **Dambroso, D ; Svidzinski, T.I.E.; Svidzinski, A.E.; Dalalio, M.M.O. and Moliterno, R.A. (2009).** Radiotherapy effect on frequency of

- Candida* spp and on virulence of *C. albicans* isolated from the oral cavity of head and neck cancer patients Rev Farm. 30(2):153-159
- 38. De Hoog ,G.S.J.;Guarro, j.;Gene,M.J. and Figueras, F. (2000)**  
.Atlas of clinical fungi ,2<sup>nd</sup>,centraabureau voor schimmelcultures  
Utrecht ,the Netherlands. Vol.53-No.1,P: 45-49.
- 39. de Sousa ,Lourimar V. ; Nascimento F. and Vera L. S. (2016).**  
Isolation and identification of *Candida* species in patients with  
orogastric cancer:susceptibility to antifungal drugs, attributes of  
virulence in vitro and immune response phenotype , Infectious  
Diseases,
- 40. De Bernardis,F.;Sullivan,P.A. and Cassone ,A.(2001).**Aspartyl  
proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity  
.Med.Mycol .39:303-313.
- 41. Dorak, M.and Tervli, K.; (2009).**Real Time PCR, electronic books
- 42. Dubey,D.K.; Dora,J.; Kumar,A. and Gulsan,R.K.;(2013).**A  
Multipurpose Tree- *Moringa oleifera* . Intl. J. of Pharm. And Chem.  
Sci. 2 (1):415-423.
- 43. Eilert, U.; Wolters B. and Nahrstedt, A. (1981).** The Antibiotic  
principles of seeds of *Moringa oleifera*. Planta Medica, 42(1): 55-61.
- 44. Elisa B. ;Giuliano B. ; Vincenzo A. ; Behzad, Z.S. ;Ebrahim, S.  
;Felice, S. and Virginia, L. (2007).**Saponins from *Allium minutiflorum*  
with antifungal activity Phytochemistry 68 : 596–603
- 45. El-kabir, M.;Scully, C.and Samaranayake, L.(1994).***Candida* and  
oral candidosis: a review."Critical Reviews in Oral Biology and  
Medicine 5 (2).

46. Ellis, D.; Stephan, D.; Helen, A.; Rosemary, H. and Roben, B. (2007). Description of Medical Fungi. 2<sup>nd</sup> ed. Ltd. Australia, PP: 147 – 150.
47. Ellis, D.H. (1994). Clinical microbiology. The human opportunistic mycosis .gillingham .Printters pty .Ltd, Australia. P:166.
48. Elting, L.S. ; Cooksley, C. ; Chambers, M. ; Cantor S.B. ; Manzullo E. and Rubenstein E.B. (2003) .The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. Cancer. ;98:1531–1539.
49. Eman, N.; A.; Suleyman, A. ;Muyibi, Hamzah M. ;Salleh, M. ;Ramlan M. S. and MdZahangir A. ;(2009). *Moringa oleifera* seeds as natural coagulant for water treatment. 162-167.
50. Espinel-Ingroff, A. (2008). Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*. ;25(2):101–106.
51. Eyerich, K.; Eyerich, S. and Hiller, J. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis, from bench to bedside. *Eur J Dermatol* ;20(3):255 –260
52. Fahmy, I.R. (1933). Constituents of plant crud drugs. Ist . Ed-Poul Barbey-Cairo. Egypt.
53. FDA. Food and Drug Administration .(2003). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Food Bacteriological Analytical Manual. Chapter: 10. for the detection of bacterial pathogens : present and future considerations for the clinical laboratory . Clin . Chim Acta., 363:206-220.

54. Felk, A.; Schafer, W.; and Hube, B. (2000). *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*SAP10*) gene. Accession number AF146440.
55. Freifeld, A.G. and Kaul, D.R. (2008). Infection in the patient with cancer, in Abeloff's clinical oncology. In: Abeloff MD et al (eds) Churchill Livingstone, Philadelphia, pp 717–738
56. Fu, Y.; Ibrahim, A.S.; Sheppard, D.C.; Chen, Y.C.; French, S.W. and Cutler, J.E. (2002) *Candida albicans* ALS1: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. Mol Microbiol 44: 61–72. .
57. Gibellini, D.; Vitone, F.; La Placa, M. and Re, M. C. (2004) Quantitative detection of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) viral load by SYBR green real – time RT – PCR Technique in HIV-1 sero positive patients. J. Virol. Method, 113(2): 183 – 189.
58. Gibson, U. E.; Heid, C. A. and Williams, P. M. (1996) A novel method for real time quantitative RT – PCR. Genome Res., 6: 995 – 1001.
59. Gilfillan, G. D.; Sullivan, D. J.; Haynes, K. ; Parkinson, T. ; Coleman, D. C. and Gow, N. A. R. (1998). *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. J. Microbiology 144:829-838.
60. Glee, P. M.; Cutler, J. E.; Benson, E. E.; Bargatez, R. F. and Hazen, K. C. (2001). Inhibition of hydrophobic protein – mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiological shear flow. Infect. Immun., 4: 2815 – 2820.

- 61. Gomella, L. G. ;Singh, J. ;Lallas, C. and Trabulsi, E. J. (2010).** Hormone therapy in the management of prostate cancer: evidence-based approaches. *Therapeutic Advances in Urology*, 2(4), 171-181.
- 62. Gow, N.A.R. ; Vande, V. F.L. ; Brown, A.J.P. and Netea M.G. (2012).** *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization *Nature Reviews*, 10 pp. 112–122.
- 63. Green, C.B. ;Hoyer, L.L. ; Oh, S.H. and Zhao, X . (2008)** .Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family- a sticky pursuit. *Med Mycol*.46(1):1-15.
- 64. Greenber, M.S.; Glick, M. and Ship, J.A. (2008).** *Burket's oral medicine* (11th ed.). Hamilton, Ont.: BC Decker. pp. 79–84.
- 65. Groll, A. H . ;Piscitelli , S. C. and Walsh , T . J . (1998).** Clinical pharmacology of systemic antifungal agents :a comprehensive review of agents in clinical us , current investigational compounds , and putative targets for antifungal drug development , p . 343-500 .In J . T . August , M . W . Anders , F . Murad , and J . T . Coyle (eds) , Academic Press , San DIEGO
- 66. Gullatte, M.M. and Gaddis, J. (2004).** Chemotherapy. In: Varrichio CG, ed. *A Cancer Source Book for Nurses*. 8th ed. Sudbury, Mass: Jones and Bartlett; 103-130.
- 67. Gutierrez, J. ;Morales P. ;Gonzalez M. A. and Quindos G. (2002).** *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *Journal of Basic Microbiology* . 42, 207-227.



68. Hancock, P.J, Epstein, J.B. and Sadler G.R.:(2003). Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. J Can Dent Assoc 69(9):585–590.
69. Harrison, N.; Mitterbauer, M. and Tobudic, S.:(2015). Incidence and characteristics of invasive fungal diseases in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study. BMC Infect Dis;15:584.
70. Hautala, T. A. ;(2007). Cluster Of *Candida Krusei* Infections In A haematological unit. BMC Infectious Diseases, 7:97.
71. Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. and Watson, R.; (1993). Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reaction. Biotechnol., 11: 1026 – 1030.
72. Horvath , L.L.; Hospenthal , D.R.; Murray , C.K. and Dooley, D.P.; (2003). Direct isolation of *Candida* spp. From blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida . J.Clin .Microbiol.,41:2629-32.
73. Hoyer, L. L., Scherer, S. Shatzman, A. R. and Livi ,G. P. (1995). *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. Mol. Microbiol. 15:39–54.
74. Hoyer, L. L.; ( 2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiology . 9(4):176-180.
75. Hoyer, L. L.; Green, C. B.; Oh, S. H. and Zhao. X. (2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin like sequence (ALS) gene family—a sticky pursuit. Med. Mycol. 46:1–15.

- 76.Hube, B..(2000)** .Extracellular Proteinases of Human Pathogenic Fungi, p. 126-137. In J. F. Ernst and A. Schmidt (ed.), Contributions to Microbiology. Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts. S. Karger AG, Basel, Switzerland.
- 77.Iwata,K and Yamanmota,Y.(1983).**High –molecular –weight toxins produced by pathogenic fungi ,paraticulary *Candida albicans* and their role in pathogenesis of fungal infection .40. First international symposium on hemodynamics .Chiba .Japan.
- 78.Iwata,K;Uchida,K.;Hmajima,K.and Kamamura,A. (1984).**Role of canditoxin in experimental *Candida* infections.J.Med .Bio.27:130-133.J. Ann.Inter.Med.8.12-15.
- 79.Jacobsen, I.D.; Wilson, D.; Wächtler, B.;Brunke, S.; Naglik, J.R. and Hube, B. (2012)** .*Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target Expert Review of Anti-infective Therapy. 10 pp. 85–93
- 80.Janet, F. S. and Paula, S. (1998)** .Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWPI* of *Candida albicans* Authors. DOI: 10.1002/(SICI)1097-1099
- 81.Joensuu, H. (2008).**Systemic chemotherapy for cancer: from weapon to treatment . Lancet Oncol. 9 (3): 304.
- 82.Julian, R. Naglik, S. ; Challacombe, J.and Bernhard, H. (2003).** *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis, 67(3): 400–428.
- 83.Julin,F.B.; Gupta, K.L. and Brueske, C. H.(2010).** Proteolytic activity of a clinical isolate of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol.; 23: 631-633.

- 84.Kakiuchi, N. ;Hattori, M. ;Namba, T.;Nishizawa, M.; Yamagishi ,T.; and Okuda, T. (1985).**Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. *J Nat Prod.* 48(4):614-21.
- 85.Kangoga, M.C.; Wanyoike , M.W.; Revathi, G.and Bii, C.C. (2011).** Phenotypic characterization of *Candida albicans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *African Journal of Health Sciences*, 19(3-4):21-25.
- 86.Karkowska-Kuleta, J.; Rapala-Kozik, M. and Kozik, A. (2009).** Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica.* 56(2): 211-224.
- 87.Kassab ,N.H. (2002).** Antifungal effect of some agents on *Candida albicans* growth on acrylic resin denture base surface (in vitro study)M.Sc thesis .Collage of Dentistry.-Univ.of Mousel.
- 88.Kato, M.; Ozeki, M.; Kikuchi, A. and Kanbe, T. (2001).**Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. *Gene.*, 272: 275 -281.
- 89.Kebreab, A.G.; Gunaratna ,K.R. ; Henriksson, H.; Brumer, H. ;and Dalhammar, G. (2005).** A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Res.*, 39: 2338-2344
- 90.Kelly, S.L.; Lamb, D.C. and Kelly, D.E.(1997).**Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol  $\Delta 5,6$ -desaturation. *FEBS Letters.* ;400(1):80–82.

- 91. Kerawala, C. and Newlands, C. (2010).** Oral and maxillofacial surgery. Oxford: Oxford University Press. pp. 446
- 92. Kerridge, D. (2009).** The protoplast membrane and antifungal drugs. in Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics. eds Peberdy J. F., Ferenczy L. (Marcel Dekker Inc. New York, N.Y), p 135.
- 93. Klotz, M.; Monod, D. A.; Schofield, A. J. P.; Brown and Gow, N. A. R. (2010).** Expression of Seven Members of the Gene Family Encoding Secretory Aspartyl Proteinases in *Candida albicans*, Molecular Microbiology, Vol. 14, No. 1, , pp. 87-99.
- 94. Koelsch, G.; Tang, J.; Loy, J. A.; Monod, M.; Jackson, K. ; Foundling S. I.; and Lin. X. ( 2000).** Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta 1480:117-131.
- 95. Koelsch, M. D. T.; Hyina, X. J. ; Vandoninck, W. H.; Luyten, V. and Bossche, H. ( 2000) .** Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1660-1670.
- 96. Koneman , E.W. ; and Roberts , G.D.; (1985).** Practical Mycology, 3rd ed Baltimore, MD Williams and Wilkins.
- 97. Kostler, W.J.; Hejna, M.; Wenzel, C. and Zielinski, C.C. ; (2001).** Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. CA Cancer J Clin; 51(5):290–3158

98. Kumar,P.S.; Mishra,D.; Ghosh,G. and Panda,G.S.(2010). Medicinal uses and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. Int.J.Phytomed. 2: 210–216
99. Kumaraswamy, K.L; Vidhya, M; Rao, P.K. and Mukunda, A. (2012). Oral biopsy: oral pathologist's perspective.. Journal of cancer research and therapeutics. 8 (2): 192–8.
100. Kuriyama , T.; Williams, D.W.; Silva, S.; Malic, S. and Lewis, M.A. .(2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. Periodontol .55:250-65.
101. Kwon –Chung, K.J. and Bennett, J.E. (1992). Medical Mycology .Williams and Willins Company, P:105-161.
102. Larone, D.H. (1993). Medically important fungi : a guide to identification , 2 nd ed ., p.193 – 211 . American Society for microbiology , Washington , D. C.
103. Latté, K.P.; and Kolodziej, H. (2000). Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. Z. Naturforsch C.55(5-6):467-72.
104. Leak,J.A.;Mosley,D.G.;Englang;Graham,J.V. and Plicaites,B.D.(2000). Risk factors for acute symptomatic mycosis among elderly persons in Arizona.1996-1997.J.Infect.Disesa.182(4):1434-1440.
105. Leidich, A. R.; Aumont, F. ; Deslauriers, N. ; Belhumeur, P. and De Repentigny, L. (2001). Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. Infect. Immun.; 64: 4514-4519.

106. **Livak ,J.K. and Schmittgen, T . D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method, Volume 25, Issue 4, p 402-408.
107. **Lodder, J. (1974).** The yeasts :Ataxonomic study .2nd ed., revised and enlarged edition .Amsterdam
108. **Lumbsch, T.H. and Huhndorf, S.M. (2007).** The present classification contains all accepted genera and higher taxa above the generic level in phylum Ascomycota, Outline of Ascomycota Myconet .13: 50 - 58
109. **Macfaddin,J.F.(2000).** Biochemical tests for identification of medical bacteria .the Williams and wilkins co,London
110. **Machado, A.G.; Komiyama, E.Y.; Santos, S.S.F.; Jorge, A.O.C.; Brighentif, L. and Koga-Ito, C.Y. (2011).** In vitro adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. J Appl Oral Sci.;19:384–87.
111. **Mah, T.(2012).** Biofilm-specific antibiotic resistance. Future Microbiol.7(9):1061–107.
112. **Mahdi,N.K.and AL-Hamdani ,M.M. (1998).** Sexually transmitted diseases among women with habitual abortion East.Med.H.J.4;343-349
113. **Mancini, N. and Ossi, C. M. ;(2005).** Direct sequencing of *Scedosporium apiospermum* DNA in the Diagnosis of a case of keratitis. J. Med. Microbiol., 54 : 897–900.
114. **Manfredi, M.; Polonelli, L.; Aguirre-Urizar, J.M.; Carrozzo M. and McCullough, M.J. (2013).** Urban legends series: oral candidosis. Oral Dis. ;19:245-61

115. Maschmeyer, G. and Haas, A. (2008). The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* 31(3):193–197
116. Mastromarino, P.; Vitali, B. and Mosca, L. (2013). "Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics" *New Microbiologica*. 36: 229–238.
117. Mayer, F.L.; Wilson, D. and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 4(2): 119–128.
118. Mc Ginnis, M.R. (1980). *Laboratory handbook of medical mycology*. Academic press, New York, U.S.A. 66P.
119. Meis J.F.; Ruhnke M.; De Pasuw B.E.; Odds F.C.; Siegert, W. and Verweij, P.E. (1999). *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:150–3.
120. Milne, L.J.R. (1996). Fungi. In: *Practical Medical Microbiology* (Collee, J.F. ed.) Churchill, Liringtonstone.
121. Mohamed, N. A. (2012). Detection of *Candida spp.* and other pathogens responsible for vulvovaginitis in women with contraceptive methods . MSC thesis .submitted by College of Science University of Baghdad
122. Mokaddas E., Khan Z.U. and Ahmad S. (2011). Prevalence of *Candida dubliniensis* among cancer patients in Kuwait: a 5-year retrospective study. *Mycoses*; 54:29–34.
123. Monod, M.; Togni, G.; Hube, B. and Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol*; 13:357–68.

124. **Morschhauser, J. (2002).** The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*.1587:240–248.
125. **Mossa , J.S.; Al-Yahya ,M.A. and Al-Meshal,I.(1997).** Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families,National Library of Medicine. 75(2):149-61
126. **Mothershed, E.A. and Whitney, A.M. (2006).** Nucleic acid –based methods morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3,582–588
127. **Muller ,H. ;Christophe H. ;Julien, G. ;Bernard, D. ;and Cécile, F. (2008) .**The Asexual Yeast *Candida glabrata* Maintains Distinct a and  $\alpha$  Haploid Mating Types' *Eukaryot Cell*.. 7(5):848-858
128. **Murciano, C.; Moyes, D.L.; Runglall, M.; Tobouti, P.; Islam, A.;Hoyer, L.L. and Naglik, J.R. (2012).**Evaluation of the Role of *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Proteins in Human Oral Epithelial Cell Interactions. *PLoS One*. 7(3): 3362-3365
129. **Murray,P . R . ; Baron , E . J . ;Pfaller , M . A . ;Tenover , F. C. and Tenover , R . H . (1999).**Manual of clinical Microbiology .7th ed .ASM press . Washington
130. **Naglik, Julian, R.; Moyes, David L.; Wächtler, Betty; Hube, and Bernhard .(2011).** *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity .*Microbes and Infection* 13 (12-13): 963–976.
131. **Naima ,O.(2007).**Oral and Maxillofacial Side Effects of Radiation Therapy on Children. *Pratique* , Vol. 73, No 3.
132. **Napolean, P.; Anitha, J. and Emilin, R.R. (2009).**Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. *Current Biotica* ; 3(1): 33 – 37.



133. Newport, G. and Agabian, N. (1997). KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. J. Biol. Chem. 272:28954-28961.
134. Nobile, C.J.; Nett, J.E.; Andes, D.R. and Mitchell, A.P. (2006). Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. Eukaryot Cell. 5(10):1604-10.
135. Osho, A.; and Adelani, O. A. (2012). The Antimicrobial Effect of Some Selected Nigerian Chewing Sticks on Clinical Isolates of *Candida* Species Journal of Microbiology. 2(1): 1-5
136. Otmani, N. (2007). Oral and Maxillofacial Side Effects of Radiation Therapy on Children . Vol. 73, No. 3
137. Park, K.K; Brodell, R.T. and Helms, S.E. (2011). Angular cheilitis, part 1: local etiologies. Cutis; cutaneous medicine for the practitioner. 87 (6): 289–295.
138. Pfaller, M.A. and Diekema, D.J.;(2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 20:133–163.
139. 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. 36:2093-2095
140. Price, M.L. ;(2000) .The Moringa tree purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. Water Res., 39: 2338-2344.

141. Price, M.F.; Wilkinson, I.D. and Gentry, L.O.; (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *C. albicans* sabouraudia .22:201-207.
142. Prize, C.; Pauli, M. and Bazerque, P.; (1990). An antibiotic assay by the agar-well diffusion Method. *J. Actabiologiae*. 15:113-115.
143. Purkait, S.K. ; (2011). Essentials of oral pathology (3<sup>rd</sup> ed.). New Delhi: Jaypee Bros. Medical Publishers. p. 12
144. Rebrikov, D.V. and Trofimov, D.Y.; (2006). Real- Time PCR: A Review of approaches to data analysis. *J. Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(5): 455-465.
145. Redding, S.W.; Kirkpatrick, W.R.; Coco, B.J.; Sadkowski, L.; Fothergill, A.W. and Rinaldi, M.G. (2002). *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J Clin Microbiol*. 40:1879-1881.
146. Resende, J.C.D.P.; Franco, G.R.; Rosa, C.A.; Hahn, R.C. and Hamdan, J.S. (2004). Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. Isolates from hospitalized patients. *Rev. Iberoam Micol*. Vol. 21:24-28.
147. Rose, A. H. and Harisson, J. S. (1969). *The yeast: Biology of Yeast* ., 1, Academic press, London
148. Sahar, M.; Kheir, S. K.; and Haitham, E. (2014). Evaluation Of The Antifungal Activity Of *Moringa oleifera* Seeds, Leaves And Flowers *World Journal Of Pharmaceutical Research* volume 4, Issue 2, 18-25.
149. Sardi, J. C. O.; Scorzoni, L.; Bernardi, T.; Fusco-Almeida, A. M. and Mendes, G. M. J. S. (2013). *Candida* species: current

- epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. of Medical Microbiology* . 62, 10–24 .
- 150. Scully ,C. (2013).** Oral and maxillofacial medicine : the basis of diagnosis and treatment (3rd ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone. pp. 254–267.
- 151. Sharkey, D. J.; Scalice, E. R.; Christy, K. G.; Atwood, S. M. and Daiss, J. L. (1994).** Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction. *Bio/Technology*. 12 (5): 506–509.
- 152. Sheets , N.C; Goldin, G.H. and Meyer, A.M. (2012).** Intensity-modulated radiation therapy, proton therapy, or conformal radiation therapy and morbidity and disease control in localized prostate cancer. *JAMA*. ;307(15):1611-1620.
- 153. Shihata, I.M. (1951).** A pharmacological study of *Anagallis arvensis* M.D.vet. Thesis Cairo University. Mycology 3d edition , William and Wilkins , Baltimore. pp.211.
- 154. Singh, S.; Sobel, J.; Bhargava D.; Boikov P. D. and Vasquez J. A. (2002).** Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clin. Infect. Dis.* 35:1066-1070.
- 155. Stevenson-Moore, P. (1990).** Oral complications of cancer therapies. Essential aspects of a pretreatment oral examination. *NCI Monogr* ;9:33-36.
- 156. Sudbery, P. Gow, N. and Berman, J. (2004).** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 12(7):317-24.

157. Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. Cell Microbiol 4: 461–9
158. Talhaliani ,P. and Kar, A. (2000). Pharmacological Research, 41(3) 323 – 319 .
159. Tavanti, A . ; Pardini, G.; Daniele C.; Paola D.; Antonella, L. and Sonia, S. ( 2004). Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (SAP1-10) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes American Society for Microbiology. All Rights Reserved, Vol. 42, No. 10.
160. Thaweboon, S.; Thameboon, B. ; Srithavaj, T. and Choonharuangdej ,S.;(2008). Oral Colonization of *Candida* species in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. Quintessence Int.; 39:52-57.
161. Thomas, B.P.H.J.;(2003). *Candida* spp: from saprophyte to specific parasite Molecular plant pathology, 4:225-236.
162. Treister, N.S. and Bruch J.M .(2010). Clinical oral medicine and pathology. New York: Humana Press. pp. 19, 21, 92, 93.
163. Vissink ,A.; Jansma J.; Spijkervet F.K.; Burlage, F.R. and Coppes R.P. (2003). Oral sequelae of head and neck radiotherapy. Crit Rev Oral Biol Med; 14(3):199–212.
164. Wanda, C. and Gonsalves, M.D. (2008). Common Oral Conditions in Older Persons Am Fam Physician. 1;78(7):845-852.
165. Watters, K. ; O’Dwyer, T.P. and Rowley ,H.; (2004). Cost and morbidity of MRSA in head and neck cancer patients: what are the consequences? J Laryngol Otol .118(9):694–699.

166. **Westbrook, S. D.; Kirkpatrick, W. R. Freytes, C. O.; Tor, J. J. ; Bernado, S.; Patterson, T. F.; Redding, S. W., and Lee, S. A. (2007).** *Candida krusei* sepsis secondary to oral colonization in a hemopoietic stem cell transplant recipient. *Med. Mycol.* 45:187-190.
167. **Wetter, T.J. (2004).** Advances in yeast and mold monodrug and combination drug antifungal susceptibility testing. *Microbiology*. Ph.D. Thesis Montana state University.
168. **White, P.L.; Barton, R. and Guiver, M. (2006).** A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis: a united kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systematic fungal infection . *J.Mol. Diagn.*,8:376-384.
169. **Williams, D. and Lewis, M. (2011).** Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* ;28:3.
170. **Wisplinghoff, H.; Ebbers, J.; Geurtz, L.; Stefanik, D.; Major, Y. and Edmond M.B. ( 2014).** Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.*;43:78–81.
171. **Yang, Y.L. (2003).** Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.*;36:223–228.
172. **Yin, J. L.; Shackel, N. A.; Zekry, A.; McGuinness, P. H.; Richards, C.; Putten, K. V.; McCaughan, G. W.; Eris, J. M. and Bishop, G. A. (2001).** Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immun. Cell Biol.* 79(3): 213 – 221.

173. Zhao, X.; Pujol, C.; Soll, D.R. and Hoyer, L.L. (2003). Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9. *Microbiology*; 149: 2947–2960.

الملاحق

Appendices

## ملحق (1) الاستمارة الخاصة بجمع المعلومات من المرضى والاصحاء

<input type="text"/>	الاسم الثلاثي
<input type="text"/>	الجنس
<input type="text"/>	العمر
<input type="text"/>	العنوان

## المرضى

<input type="text"/>	الجزء المصاب بالسرطان
<input type="text"/>	عدد الجرعات
<input type="text"/>	نوع العلاج
<input type="text"/>	wbc

## الاصحاء

<input type="text"/>	wbc
----------------------	-----



ملحق (2) القائمة التوضيحية للفحوصات التشخيصية التي تشملها عدة *api candida*  
التشخيصية عن الشركة المصنعة BioMerieux

الأنواع				المادة الأساس	
<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>		
-	-	-	-	Control	Con
-	+	+	+	Glucose	GLU
-	+	+	-	Glycerol	GLY
-	-	-	-	L-arabinose	ARA
+	+	+	+	Xylose	XYL
-	+	+	+	Galactose	GAL
-	-	-	-	Inositol	INO
-	-	+	-	Cellobiose	CEL
+	-	-	+	Lactose	LAC
-	-	+	+	Maltose	MAL
+	+	+	+	Sucrose	SAC
+	+	+	+	Trehalose	TRE
-	-	-	-	Raffinose	RAF

\*تقرأ النتيجة بعد إضافة الكواشف .

## ملحق (3) البيانات الخاصة بعينات المرضى

WBC (10 <sup>9</sup> /mL)	Gender	Age (year)	Part	Doses Number	Remedy Type	Pathological Type	Num.
2.22	ذكر	50	الرئة	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	1
1.88	أنثى	51	الثدي	10	كيميائي	<i>C. albicans</i>	2
3.80	ذكر	60	الحنجرة	4	إشعاعي	<i>C. dublineinsis</i>	3
0.79	ذكر	65	الدم	16	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	4
1.57	أنثى	48	الثدي	14	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	5
1.25	أنثى	80	البروستات	2	كيميائي	No growth	6
1.89	ذكر	65	الرئة	15	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	7
2.51	ذكر	59	المعدة	15	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	8
0.45	أنثى	60	الغدة للمقاوية	9	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	9
0.84	ذكر	55	الرئة	15	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	10
1.13	أنثى	75	المبايض	11	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	11
0.98	ذكر	76	نخاع العظم	11	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	12
2.37	أنثى	31	الثدي	5	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	13
1.16	ذكر	45	الحنجرة	15	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	14
2.10	أنثى	50	الثدي	8	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	15
1.43	ذكر	46	الرئة	13	كيميائي	<i>C. krusei</i>	16
1.12	ذكر	47	الرئة	13	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	17
2.10	ذكر	70	الرئة	13	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	18
1.43	ذكر	41	الرئة	15	كيميائي	<i>C. krusei</i>	19
1.12	ذكر	60	الرئة	13	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	20
2.10	ذكر	55	المريء	4	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	21
2.23	أنثى	63	الدم	9	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	22
1.08	ذكر	66	الحنجرة	13	كيميائي	<i>C. krusei</i>	23
1.99	ذكر	65	المريء	17	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	24
1.49	ذكر	44	الغدة الصم	11	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	25
2.98	ذكر	45	الرئة	15	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	26
1.48	ذكر	67	الرئة	8	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	27
2.98	ذكر	50	الحنجرة	17	إشعاعي	<i>C. dublineinsis</i>	28
0.89	ذكر	54	الرئة	13	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	29
0.77	ذكر	50	الرئة	12	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	30
1.90	ذكر	54	الرئة	11	كيميائي	<i>C. albicans</i>	31
2.44	ذكر	65	الحنجرة	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	32
2.03	ذكر	45	القولون	14	كيميائي	<i>C. albicans</i>	33
1.09	ذكر	47	الكلية	3	كيميائي	No growth	34
2.87	ذكر	49	المثانة	18	كيميائي	<i>C. albicans</i>	35
4.80	ذكر	59	الرئة	5	كيميائي	<i>C. albicans</i>	36
2.08	ذكر	62	المثانة	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	37
2.30	ذكر	63	نخاع العظم	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	38
1.57	ذكر	48	الكلية	6	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	39
0.91	ذكر	42	الدم	15	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	40
0.79	ذكر	50	الغدة للمقاوية	7	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	41
0.72	ذكر	50	الحنجرة	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	42
1.42	ذكر	40	الحنجرة	8	كيميائي	<i>C. albicans</i>	43
1.74	ذكر	80	المريء	16	كيميائي	<i>C. albicans</i>	44
0.93	ذكر	60	الكلية	7	كيميائي	No growth	45
0.82	ذكر	35	نخاع العظم	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	46
0.76	ذكر	45	الكلية	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	47
0.95	أنثى	40	الثدي	13	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	48
1.54	ذكر	48	نخاع العظم	12	كيميائي	<i>C. albicans</i>	49
2.87	ذكر	40	المعدة	12	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	50
2.98	أنثى	45	عقن الرحم	12	كيميائي	<i>C. albicans</i>	51
4.87	ذكر	70	القولون	8	كيميائي	<i>C. albicans</i>	52
3.97	أنثى	65	الثدي	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	53
2.54	أنثى	70	الثدي	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	54
2.67	ذكر	68	الحنجرة	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	55

2.54	أنثى	70	الحنجرة	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	56
1.88	أنثى	30	الدم	16	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	57
1.78	أنثى	40	الجلد	13	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	58
1.67	أنثى	37	الغدة اللعابية	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	59
1.56	أنثى	57	الغدة اللعابية	13	كيميائي	<i>C. krusei</i>	60
0.98	أنثى	48	الغدة اللعابية	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	61
4.60	أنثى	45	المرىء	9	كيميائي	<i>C. albicans</i>	62
2.97	أنثى	69	المرىء	8	كيميائي	<i>C. albicans</i>	63
3.90	ذكر	57	المرىء	20	كيميائي	<i>C. krusei</i>	64
2.88	أنثى	50	عق الرحم	8	كيميائي	<i>C. albicans</i>	65
2.80	أنثى	39	المعدة	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	66
1.40	أنثى	69	الكلى	8	كيميائي	<i>C. krusei</i>	67
1.33	أنثى	45	الحنجرة	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	68
1.76	ذكر	70	الحنجرة	1	كيميائي	<i>C. albicans</i>	69
1.98	أنثى	50	الحنجرة	11	كيميائي	<i>C. krusei</i>	70
1.77	أنثى	60	الحنجرة	12	كيميائي	<i>C. albicans</i>	71
0.99	أنثى	53	الثدي	16	كيميائي	<i>C. albicans</i>	72
1.45	أنثى	52	الدم	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	73
1.53	أنثى	40	الثدي	12	كيميائي	<i>C. krusei</i>	74
1.40	أنثى	53	الثدي	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	75
1.70	أنثى	54	الحنجرة	13	كيميائي	<i>C. krusei</i>	76
1.87	أنثى	64	الرئة	11	كيميائي	<i>C. krusei</i>	77
0.64	أنثى	54	نخاع العظم	13	كيميائي	<i>C. albicans</i>	78
0.99	أنثى	80	نخاع العظم	12	كيميائي	<i>C. krusei</i>	79
1.87	أنثى	60	الثدي	17	كيميائي	<i>C. albicans</i>	80
1.55	ذكر	58	المرىء	8	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	81
1.68	ذكر	59	الغدة الصم	18	كيميائي	<i>C. albicans</i>	82
1.99	ذكر	57	نخاع العظم	20	كيميائي	<i>C. albicans</i>	83
1.66	أنثى	46	الثدي	9	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	84
1.53	أنثى	20	الدم	8	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	85
2.98	ذكر	40	الرئة	18	كيميائي	<i>C. albicans</i>	86
2.98	أنثى	50	الثدي	15	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	87
2.89	ذكر	64	المرىء	12	كيميائي	<i>C. albicans</i>	88
2.78	أنثى	50	الثدي	13	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	89
2.98	ذكر	60	الحنجرة	17	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	90
1.98	ذكر	21	نخاع العظم	15	كيميائي	<i>C. albicans</i>	91
1.87	ذكر	51	نخاع العظم	9	كيميائي	<i>C. glabrata</i>	92
1.59	أنثى	62	الثدي	17	كيميائي	<i>C. albicans</i>	93
1.87	ذكر	42	الجلد	3	كيميائي	No growth	94
1.33	ذكر	63	الحنجرة	18	كيميائي	<i>C. krusei</i>	95
2.56	أنثى	40	الثدي	3	كيميائي	No growth	96
1.54	أنثى	48	الحنجرة	15	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	97
1.76	أنثى	58	البروستات	1	كيميائي	No growth	98
2.65	ذكر	56	نخاع العظم	19	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	99
1.97	ذكر	25	الدم	15	كيميائي	<i>C. dublineinsis</i>	100

## ملحق (4) البيانات الخاصة بعينات الإصحاء

WBC (10 <sup>9</sup> /mL)	Gender	Age (year)	Pathological Type	Num.
8.62	ذكر	55	<i>Candida albicans</i>	1
7.70	ذكر	54	No growth	2
11.60	ذكر	40	No growth	3
10.90	أنثى	52	<i>Candida albicans</i>	4
6.50	ذكر	54	<i>Candida albicans</i>	5
5.20	أنثى	41	<i>Candida albicans</i>	6
6.50	أنثى	52	No growth	7
10.10	ذكر	42	<i>Candida albicans</i>	8
7.20	ذكر	41	<i>Candida albicans</i>	9
8.20	أنثى	53	No growth	10
7.80	أنثى	45	<i>Candida albicans</i>	11
10.40	أنثى	32	<i>Candida albicans</i>	12
7.80	أنثى	43	<i>Candida albicans</i>	13
6.80	أنثى	42	<i>Candida albicans</i>	14
11.90	ذكر	48	No growth	15
16.70	أنثى	46	No growth	16
9.70	ذكر	30	<i>Candida albicans</i>	17
11.80	أنثى	41	No growth	18
12.90	أنثى	43	<i>Candida albicans</i>	19
9.50	ذكر	33	No growth	20
7.50	أنثى	45	<i>Candida albicans</i>	21
9.90	ذكر	42	No growth	22
7.80	ذكر	53	No growth	23
10.10	أنثى	40	No growth	24
9.70	ذكر	40	No growth	25
9.40	ذكر	40	No growth	26
11.20	أنثى	32	No growth	27
9.30	ذكر	52	<i>Candida albicans</i>	28
10.50	ذكر	42	No growth	29
9.30	ذكر	55	No growth	30
10.70	أنثى	22	<i>Candida albicans</i>	31
6.30	أنثى	45	No growth	32
7.50	أنثى	20	No growth	33
6.90	أنثى	49	No growth	34
8.80	أنثى	22	No growth	35
5.60	ذكر	40	No growth	36
9.90	ذكر	48	No growth	37
12.90	ذكر	55	<i>Candida albicans</i>	38
8.10	ذكر	25	No growth	39
10.50	أنثى	36	No growth	40
10.90	أنثى	20	No growth	41
9.50	أنثى	41	No growth	42
10.90	أنثى	40	No growth	43
11.20	ذكر	33	No growth	44
10.70	ذكر	32	No growth	45
7.20	أنثى	42	No growth	46
9.10	أنثى	36	No growth	47
9.50	أنثى	60	No growth	48
6.30	ذكر	52	No growth	49
9.30	ذكر	40	No growth	50
10.90	أنثى	40	No growth	51
10.50	أنثى	42	No growth	52
8.10	ذكر	42	No growth	53
5.50	ذكر	55	No growth	54
9.60	أنثى	43	No growth	55
5.60	ذكر	52	<i>Candida albicans</i>	56
8.90	أنثى	53	No growth	57
7.60	أنثى	47	No growth	58

6.80	أنثى	25	No growth	59
10.40	ذكر	46	No growth	60
9.30	ذكر	40	No growth	61
10.70	أنثى	51	No growth	62
7.50	أنثى	41	No growth	63
8.10	ذكر	43	No growth	64
7.90	أنثى	58	No growth	65
9.20	ذكر	49	No growth	66
8.90	أنثى	52	No growth	67
7.80	أنثى	43	No growth	68
9.40	ذكر	50	No growth	69
6.50	أنثى	62	<i>Candida albicans</i>	70
12.90	أنثى	63	No growth	71
10.70	ذكر	51	No growth	72
7.90	أنثى	61	No growth	73
11.90	أنثى	51	No growth	74
7.60	ذكر	57	No growth	75
8.70	أنثى	40	No growth	76
7.90	أنثى	35	No growth	77
11.90	ذكر	35	No growth	78
7.80	أنثى	34	No growth	79
12.90	ذكر	35	No growth	80
6.80	أنثى	41	No growth	81
7.10	ذكر	44	No growth	82
8.8	أنثى	41	<i>Candida glabrata</i>	83
6.90	ذكر	41	No growth	84
8.80	أنثى	51	<i>Candida albicans</i>	85
11.90	ذكر	55	No growth	86
4.60	ذكر	46	No growth	87
11.10	أنثى	41	No growth	88
8.70	ذكر	50	<i>Candida albicans</i>	89
12.70	أنثى	40	No growth	90
11.50	ذكر	48	No growth	91
12.30	أنثى	42	<i>Candida albicans</i>	92
5.90	ذكر	50	No growth	93
10.50	أنثى	35	<i>Candida albicans</i>	94
12.90	ذكر	65	No growth	95
6.10	أنثى	31	No growth	96
7.70	ذكر	35	No growth	97
9.5	أنثى	56	<i>Candida glabrata</i>	98
7.90	ذكر	40	No growth	99
6.90	أنثى	41	No growth	100

ملحق (5) عوامل الضراوة لـ *C.albicans* المعزولة من مرضى السرطان

انتاج الانزيم المحلل للبروتين	تكوين الاغشية الحيوية	الالتصاق بالخلايا الطلانية	ت
+	+	+	<i>C.albicans</i> (1)
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 2 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 3 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> (4)
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 5 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 6 )
+	+	-	<i>C.albicans</i> ( 7 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 8 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 9 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 10 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> (11)
+	+	-	<i>C.albicans</i> (12)
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 13 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 14 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 15 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 16 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 17 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 18 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 19 )
+	+	-	<i>C.albicans</i> ( 20 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 21 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 22 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 23 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 24 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 25 )
-	-	-	<i>C.albicans</i> ( 26 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> (27)
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 28 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 29 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> (30)
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 31 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 32 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 33 )
+	-	+	<i>C.albicans</i> ( 34 )
+	+	-	<i>C.albicans</i> ( 35 )
+	+	-	<i>C.albicans</i> ( 36 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 37 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 38 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 39 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 40 )
+	+	+	<i>C.albicans</i> (41)
40	39	35	العدد الكلي للحالات الموجبة
1	2	6	العدد الكلي للحالات السالبة

ملحق (6) عوامل الضراوة لـ *C.albicans* المعزولة من الاصحاء

انتاج الانزيم المحلل للبروتين	تكوين الاغشية الحيوية	الالتصاق بالخلايا الطلانية	ت
-	-	+	<i>C.albicans</i> (1)
-	-	+	<i>C.albicans</i> ( 2 )
+	-	-	<i>C.albicans</i> ( 3 )
+	+	-	<i>C.albicans</i> (4 )
-	-	+	<i>C.albicans</i> ( 5 )
+	-	-	<i>C.albicans</i> ( 6 )
+	-	+	<i>C.albicans</i> ( 7 )
-	+	+	<i>C.albicans</i> ( 8 )
+	-	-	<i>C.albicans</i> ( 9 )
-	-	-	<i>C.albicans</i> ( 10 )
+	-	+	<i>C.albicans</i> (11 )
-	-	-	<i>C.albicans</i> (12)
+	+	+	<i>C.albicans</i> ( 13 )
-	-	-	<i>C.albicans</i> ( 14 )
+	-	-	<i>C.albicans</i> ( 15 )
-	-	+	<i>C.albicans</i> ( 16 )
-	-	-	<i>C.albicans</i> ( 17 )
+	-	+	<i>C.albicans</i> ( 18 )
+	+	-	<i>C.albicans</i> ( 19 )
+	-	+	<i>C.albicans</i> ( 20 )
+	+	-	<i>C.albicans</i> ( 21 )
+	-	-	<i>C.albicans</i> ( 22 )
13	5	10	العدد الكلي للحالات الموجبة
9	17	12	العدد الكلي للحالات السالبة

## Abstract

A total of 100 samples (cotton swabs of oral ulcers and venous blood) were collected from with cancer, which treated with after chemotherapy or radiotherapy and who had oral infection with weve diagnosed by specialist doctor of the patient of Al-Diwanyiah for the period from the first of March 2016 to the end of August 2016.

A total of 100 samples (cotton swabs of oral ulcers and venous blood) were collected from healty people (not suffering from any chronic diseases) as a control to compare between the two group in terms of the percentay of groups yeast and their types and virulence factor .

The number and percentages of isolates obtained from patients and healthy patients were 94 and 24 respectively.

Four types *Candida albicans* with 41 followed by *C. dubleninsis* 22 *C. glabrata* 19 (19%) and *C. kruse* 12 . In the healthy, the results were recorded for two types of *Candida* species: *C. albicans* and *C. glabrata* and 22 and 2 respectively.

There were also significant differences in the rate of white blood cell count between males and females with cancer .

There were significant differences between infected and healthy people, whether, in male or female, there is a clear reduction in the rate of white blood cells in infected (males and females) compared with healthy controls (males and females).

And that the most cases of *Candida* *Candida* have been attributed to patients with cancer of the throat and 18% and the least skin cancer and ovarian cancer (1)%, and the results showed significant differences in the distribution of patients with *Candida* by type of treatment at the level of probability  $P < 0.01$  . In addition, there were significant differences in the distribution of patients with oral candidiasis according to the number of doses at  $P < 0.01$ . The number of male infections was higher than that of females, with no significant differences between them at  $P < 0.01$ . Significant differences in the distribution of patients with oral candidiasis by age group at a probability level of  $P < 0.01$



In addition to the study of some of the virulence of *C.albicans* factors which adhesion, biofilms, and enzyme production analyst of protein The numbers and ratios of in patients The numbers and ratios of 35 (85.8%) 39(45%), 22% (100%) 0.40 (97.5%), respectively, While the numbers and ratios of virulence factors in the healthy are 10 (45.4%) 5 (22.7%) 22 (100%) 13 (59)%, respectively.

The effect of Amphotricen B in the *Candida albicans* was tesed and it had an inhibition effect , with a maximum diameter 40 mm , in addition the effect of aqueous extract of the seeds of *Moringa Oleifera* on the growth of *Candida albicans* was evaluatal . The extract has an effective of 90% as well as the concentrations 35.50 0.75% and did not give any effect at concentrations 25.15% it seems that the maximum inhibitory diameter is 33 mm while the Concentrations 35,50,75% recorded the maximum diameters, namely, 4,16,20 mm Respectively.

The gene expression of genes *HWPI*, *ALS1* ,*SAP1*, *SAP4*, *SAP3*, *SAP2* , *SAP7*, *SAP5* was detected using Real- time PCR Technology for some isolates before and during yeast infection of epithelial cells, and the results wer factor the high production rate of gene expression for the treatment of T2 and all of the genes *HWPI*, *ALS1*, *SAP1*, *SAP4*, *SAP3*, *SAP2* *SAP5*, *SAP7* compared to transaction with treatment C and significant differences at the level of the probability  $P \leq 0.01$

The use of an extract of the seeds of *Moringa Oleifera* seed extracts was to evaluate its effect on the genes of gene expression *ALS1*, *HWPI*, *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5*, *SAP7* before and during infection yeast cells of epithelial and the results were lower production for the treatment of T1 gene expression of all genes rate of virulence factors *ALS1*, *HWPI*, *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5*, *SAP7* Compared with treatment c high spirits the differences at the level of the probability  $P \leq 0.01$  the also lower gene expression in the treatment T3 for all the genes of virulence factors *ALS1*, *HWPI*, *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5*, *SAP7* Compared with treatment T2 the high a significant difference at the level of the probability of  $P \leq 0.01$ .

The study showed, that there is a difference in the gene expression of genes under study of SAP family, SAP1, SAP2, SAP3, SAP4, SAP5, SAP7 for the treatment of T2 where the sap1 recoded the  $92.244 \pm 15.88358$  followed by the gene SAP4 the rate of  $71.766 \pm 10.42177$  and then the gene SAP3 at a rate of  $64.828 \pm 3.48543$ , then gene SAP 5 the at a rate of  $37.156 \pm 7.66049$  then gene SAP 2 at a rate of  $24.975 \pm 4.38852$  While gene log. (SAP7) has the the lowest rate in its gene expression  $24.850 \pm 2.92079$ .

**AL- QADISIYAH UNIVERSITY  
COLLEGE OF EDUCATION  
DEPARTMENT OF BIOLOGY**



**Characterization of some virulence factors  
and gene expression of Secreted Aspartyl  
proteinase in *Candida albicans* isolated  
from oral candidiasis in cancer patients**

**A Thesis Submitted to the Council of the  
College of Education / University of Al-Qadisiya**

**By**

**Zahraa khudhair abbas al-khafaji**

**In partial Fulfillment of the Requirements for the Dgree of  
Doctor of Philosophy in Biology- Microbiology**

**Supervised by**

**Prof. Majid kadhim Aboud Alshibly**

1438

2017