



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

التشخيص الجزيئي للمشوكة الحبيبية
Echinococcus granulosus وتقييم فعالية الجسيمات
النانوية البوليمرية المحملة بالبندازول والميبندازول ضد الاطوار
اليرقية للطفيل خارج الجسم الحي وداخله

دعاء سمير احمد الياس

رسالة ماجستير

علوم الحياة

باشرف

الاستاذ المساعد

الدكتور إبراهيم فارس علي

الملخص

في هذه الدراسة تم تحديد الدراسة الانماط الوراثة لطفيل المشوكة الحبيبية في الاغنام باستخدام طريقة التشخيص الجزيئي بالاعتماد على الوحدة الثانوية الاولى للجين سايتوكروم C اوكسيدز Cytochrome C oxidase subunit I (COX1) للمايتوكوندريا، بالاضافة الى دراسة تاثير الجسيمات النانوية البوليمرية المحملة بالبندازول والمبيندازول ضد الاطوار اليرقية للطفيل كالرؤيسات الاولية Protoscolecis والاكياس العدرية Hydatid cysts خارج وداخل الجسم الحي، على التوالي. تم جمع 14 عينة اكباد الاغنام المخمجة بصورة طبيعية بطفيل المشوكة الحبيبية من مجزة السعدون في الجانب الايسر من مدينة الموصل، وكذلك من محلات الجزارين في الجانب الايمن للمدينة، وللفترة من شهر تشرين الاول 2023 الى كانون الثاني 2024. تم اجراء اختبار تفاعلات البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction بالاعتماد على الجين Cox1 للمايتوكوندريا، كما تم اجراء اختبار تتبع تسلسل القواعد النروجينية للجين Cox1، واعقبها اجراء عملية التطابق التسلسلي Sequence alignment للعينات في الدراسة الحالية ومقارنتها مع تسلسلات للعزلات المستودعة في بنك الجينات الدولي باستخدام برنامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool، كما تم تسجيل ستة عزلات في بنك الدولي للجينات مع الارقام التسلسلية (PQ012658، PQ036747، PQ142649، PQ142652، PQ142689، PQ164279). اظهرت نتائج التشخيص الجزيئي ان جميع العينات في الدراسة الحالية كانت من النمط الوراثي G1 (سلالة الاغنام). تم اجراء عملية التطابق الوراثي ودراسة العلاقة التطورية Evolutionary relationship بالاعتماد على تحليل نتائج الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لتسلسلات للعزلات الحالية بواسطة برنامج (MEGA-X) (version 10.2.6) Genetics Analysis across Computing، اذ اظهرت تسلسلات العزلات قيد الدراسة الحالية اعلى درجة من التطابق (99.43-100%) مع العزلة المحلية (العزلة السليمانية JX878690) والعزلة التركية (MF544127)، تلتها العزلة الايطالية (DQ062857) ثم العزلة البابلية (MN514885)، في حين كانت نسبة التطابق التسلسلي مع العزلة الايرانية (LC068914) اقل مما هو في العزلات المذكورة اعلاه، التي تعود الى النمط الوراثي G1 المعزولة من الاغنام، بالاضافة الى وجود علاقة وراثية بين العزلات الحالية من جهة ومع العزلات المستودعة في بنك الجينات الدولي.

كما اشتملت الدراسة الحالية ايضا على تقييم فعالية البندازول والمبيندازول المحمل على الجسيمات النانوية البوليمرية ضد الرؤيسات الاولية خارج الجسم الحي من خلال تحديد التركيز

النصفي القاتل (LC50) 50% Lethal concentration ضد الرؤيسات الاولية. كما تم دراسة تأثير البندازول والمييندازول المحمل على الجسيمات النانوية ضد داء الاكياس العدرية داخل الجسم الحي. اظهرت النتائج الحالية ان التركيز النصفي القاتل LC50 للبندازول -ABZ NP والمييندازول المحمل على الجسيمات النانوية MBZ-NP 27.35 مايكروغرام/مل و141.1 مايكروغرام/مل، على التوالي، مقارنة بالبندازول ABZ والمييندازول MBZ غير المحمل على الجسيمات النانوية البوليمرية التي اظهرت التركيز النصفي القاتل 105.5 مايكروغرام/مل و265.1 مايكروغرام/مل، على التوالي، باستخدام الوسط الزراعي RPMI-1640 وفترة تعرض 72 ساعة بدرجة حرارة 37°م و5% من CO₂، في حين لم تظهر الجسيمات النانوية البوليمرية غير المحملة بالادوية تأثيرا مضادا معنويا للرؤيسات الاولية خارج الجسم الحي مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة. اظهرت نتائج تجارب داخل الجسم الحي انخفاضا معنويا في اعداد واقطار واوزان الاكياس العدرية في الفئران المخمجة والمعالجة بالجسيمات النانوية المحملة بالبندازول والمييندازول مقارنة مع الفئران المعاملة بالبندازول والمييندازول غير المحمل على الجسيمات النانوية مع تفوق البندازول على المييندازول في الفئران المعاملة بالجسيمات النانوية المحملة وغير المحملة بالادوية مقارنة بالمييندازول المحمل وغير المحمل على الجسيمات النانوية، وهذا التأثير تتناسب تناسباً طردياً مع تركيز الادوية المحملة وغير المحملة على الجسيمات النانوية، حيث اظهر البندازول المحمل على الجسيمات النانوية بتركيز 20 مليغرام/كليوغرام والتركيز 100 ملغم/كغم من البندازول غير المحمل على الجسيمات النانوية اعلى نسبة لاختزال لاعداد الاكياس العدرية 73.03% و 78.09%، على التوالي، لمدة 7 اسابيع وبمعدل 3 جرع في الاسبوع مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة، كما اظهرت الفئران المعاملة بالتراكيز 10 و 20 ملغم/كغم من الجسم الحي للبندازول المحمل على الجسيمات النانوية و 100 ملغم/كغم من البندازول لوحده لمدة 7 اسابيع انخفاضا معنويا عاليا وعند مستوى الاحتمالية ($P \leq 0.001$) في معدلات اقطار واوزان الاكياس العدرية. يستنتج من نتائج الدراسة الحالية ان زيادة قابلية ذوبان البندازول والمييندازول في الماء من خلال تحميلها على الجسيمات النانوية البوليمرية تؤدي الى زيادة فعالية تلك الادوية والتي قد تعزى الى زيادة قابلية الادوية على اختراق الاغشية الحيوية مما يسمح بزيادة توافرها الحيوي في مجرى الدم ومما يسمح بتراكم الادوية بكميات اكبر في مناطق عمل الدواء وبالتالي زيادة تأثيرها

Abstract

Ten different genotypes (G1-G10) of the *Echinococcus* genus have been identified so far, based on genetic diversity. This genetic variation among the parasite's genotypes leads to differences in pathogenicity, drug resistance, and adaptability to a wide range of hosts. The current study aims to identify the genotypes of *Echinococcus granulosus* in sheep using molecular diagnostic methods based on the mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I (COX1) gene. Additionally, the study investigates the effects of polymeric nanoparticles loaded with albendazole and mebendazole against the larval stages, including protoscoleces and hydatid cysts, both in vitro and in vivo, respectively. A total of 14 liver samples naturally infected with *Echinococcus granulosus* were collected from Al-Saadoun slaughterhouse on the left side of Mosul City and from butcher shops on the right side of the city over a period from November 2023 to January 2024.

All samples were underwent to polymerase chain reaction (PCR) analysis based on mitochondrial Cox1 gene, followed by mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing. Subsequently, sequence alignment and comparison were performed with sequences deposited in the NCBI-GenBank database using the BLAST program. Six isolates were registered in the GenBank database with the accession numbers (PQ012658, PQ036747, PQ142649, PQ142652, PQ142689, PQ164279).

The molecular diagnostic results revealed that all samples in the current study belongs to the G1 genotype (sheep strain). Genetic alignment and the evolutionary relationship were studied based on phylogenetic tree analysis of the current genetic sequences using the MEGA-X software (version 10.2.6). The sequences of the current isolates showed a highest degree of identity (99.43-100%) with local isolates

(Sulaymaniyah isolate - JX878690) and Turkish isolate (MF544127), followed by Italian isolate (DQ062857), then the Babylon isolate (MN514885). However, the sequence identity of the current isolates with the Iranian isolate (LC068914) was lower than those mentioned above, which belong to the G1 genotype isolated from sheep. Additionally, there was a genetic relationship between the current isolates and those deposited in the NCBI-GenBank database.

The current study also included an evaluation of the efficacy of albendazole and mebendazole-loaded polymeric nanoparticles against protozoa *in vitro* and hydatid cysts *in vivo*. This was achieved by evaluation the lethal concentration 50% (LC50) against protozoa *in vitro*. The results showed that the lethal concentration 50% (LC50) for albendazole-loaded nanoparticles (ABZ-NP) and mebendazole-loaded nanoparticles (MBZ-NP) was 27.35 $\mu\text{g/mL}$ and 141.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively, compared to albendazole (ABZ) and mebendazole (MBZ) not loaded onto nanoparticles, which exhibited LC50 values of 105.5 $\mu\text{g/mL}$ and 265.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These results were obtained using the RPMI-1640 culture medium with an exposure period of 72 hours at 37°C and 5% CO₂. In contrast, unloaded polymeric nanoparticles did not exhibit a significant anti-protozoa effect *in vitro* compared to the positive control group.

The *in vivo* experiments demonstrated a significant reduction in the number, diameter, and weight of hydatid cysts in infected mice that treated with albendazole- and mebendazole-loaded nanoparticles compared to those treated with unencapsulated albendazole and mebendazole. Albendazole showed superior efficacy compared to mebendazole in both loaded and unloaded forms. This effect was directly proportional to the concentration of the drugs, whether loaded or

unloaded onto nanoparticles. Albendazole-loaded nanoparticles at a concentration of 20 mg/kg and albendazole-unloaded nanoparticles at 100 mg/kg achieved the highest reduction rate in the number of hydatid cysts 73.03% and 78.09%, respectively, over a period of 7 weeks with 3 doses/week compared to the positive control group. The mice that treated with 10 and 20 mg/kg of albendazole-loaded nanoparticles and 100 mg/kg of albendazole-unloaded nanoparticles exhibited high significant reduction ($P \leq 0.001$) of diameters and weights of hydatid cysts. The results of the current study suggest that increasing the solubility of albendazole and mebendazole by loading them onto polymeric nanoparticles may enhance their effectiveness by improving their ability to penetrate biological membranes, thus increasing the bioavailability of these drugs in the bloodstream. This could lead to accumulation higher amount of drug at the drug action sites, thereby enhancing their therapeutic effect.

University of Mosul
College of Education
for Pure Sciences



**Molecular diagnosis of *Echinococcus granulosus*
and evaluation of albendazole and mebendazole-
loaded polymeric nanoparticles efficacy against
larval stages of the parasite *in vitro* and *in vivo***

Doaa Samir Ahmed alyas

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Assist.Prof.

Dr. Ibrahim Faris Ali

2025 A.D

1446 A.H