The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Mosul / College of Sciences

Department of Biology

Molecular Identification of *Neisseria gonorrhoea*e Isolated from Patients with STDs and its Effect on the Expression of Some Genes Related to Prostate Cancer

Qasim Mustafa Khalid Al-Dobardani

Ph.D. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood Mohammed Al-Rawi

2023 A.D. **1445 A.H.**

Abstract

The current study focuses on detection of *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) and other sexually transmitted diseases (STDs) causing bacteria in 30 urethral swab and 30 urine specimens collected from STDs diagnosed patients depending on the clinical symptoms and disease history, the period between january 2022 to July 2022 in Dohuk city.

The first part of this study includes the isolation of bacteria by classical methods and using Vitek-2 compact system for identification, where both *N. gonorrhoeae* and *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) were isolated with the rate of 23.3% and 16.6% respectively, as well as direct flow chip kit for the detection of bacteria was used for the positive specimens 63.3% where the rate of infection with *N. gonorrhoeae* was 15.7% while the highest rate of infection was belongs to *Ureaplasma urealyticum (U. urealyticum)* 68.3%. At the same time *Chlamydia trachomatis(C. trachomatis)* represents only 5.1% of infections while both *Mycoplasma hominis(M.hominis)* and *Mycoplasma genitalium (M.genitalium)* represent 15.7% and 10.5% respectively.

The second part includes the confirmation of bacterial identification molecularly depending on 16s rRNA where two new strains were submitted to NCBI genes bank with the strain name of *N. gonorrhoeae* strain QaAm-IRAQ-2 accession number ON986776.1 and *Enterococcus faecalis* strain QaAm-IRAQ-1 accession number ON796012.1 .

BLAST system with neighbor-joining (JB) methods were used to determine the similarities among gene sequence and creating the phylogenetic tree for the isolates. The results exhibited that both isolates were 99% identical to many international isolates. This study also included the molecular detection of two virulence genes *opa* and *por*A *N. gonorrhoeae* by using nested Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The results show the presence of both genes .

In the third part of this study the detection of gene expression of six different genes which are related to the immune oncogenes group was performed after treatment of laboratory animal cells with dead cells of *N. gonorrhoeae*, the results of gene expression by using Real Time Quantitative PCR and graph prism software exhibited the presence of statistical differences

between *N. gonorrhoeae* treated and non-treated laboratory animal cells. All genes exhibited an expression between one and a half (1.5) to more than 15 (>15) change fold.

Finally, the fourth part of our study includes the effects of clove (*Syzigium aromaticum*) and silver nanoparticles (AgNPs) conjugated clove on each of *N. gonorrhoeae*, prostate cancer cell line PC3 and normal cell HdFn. And the study consisted of studying the ability of *N. gonorrhoeae* isolates to biosynthesize the silver nanoparticles based on the colour change from pale yellow to brown. The biosynthetic silver nanoparticles were characterised using several techniques , including the ultraviolet spectrum (UV-vis), a fourier transform infrared spectroscope (FTIR), X- ray diffraction (XRD) and a transmission electron microscope (TEM).

By disc diffusion method the results showed that the clove extract inhibited the growth of *N. gonorrhoeae* at a concentration of 100% with an inhibition zone of 8mm, while the inhibition zone created by AgNPs-clove compound was 13mm.

The results also revealed that the rate of inhibitory activity of clove extract on PC3 cell line were ٤٥.٣%,٣٨.١ %,٢٤.١ %,١٧.١ % and ١٥% at the concentrations of 400, 200, 100, 50 and 25 µg/ ml respectively. The rate of inhibition of clove on normal cells HdFn ranges from 48.5 % to 4.8% at the concentration of 400-200 µg/ ml, the IC50 value was 140 µg/ ml on PC3 cell line and 142 µg/ ml on the normal cell line.

The results also show that the clove coated with AgNPs has higher activity against PC3 cell line than the clove extract alone as it inhibited the cells by ٥٨.٢%,٤٨.٤ %,٣٦.٩ %,١٨ % and ٤.٤% at the concentrations of 400,٢٠٠ ,١٠٠ , ٥٠,٢٥ µg/ ml respectively. At the same time the clove coated with AgNPs showed a low cytotoxicity against normal cells where the inhibition rates were 33.3% -4.2% at the concentrations of 400 – 25 µg/ ml, as well as the results showed significant differences $P<0.0001$ by calculating the value of IC50 when the coated clove compound was applied to both PC3 cell line and normal cell at a concentration of 67.44 µg/ ml and 132.5 µg/ ml respectively.

الخلاصة

اولت الدراسة الحالية اهتماما بالتحري عن جرثومة (*N.gonorrhoeae*) *N. gonorrhoeae* والمسببات البكتيرية الاخرى للامراض المنقولة جنسيا من العينات المرضية والتي شملت ٣٠ عينة من مسحات الاحليل و٣٠ عينة ادرار من مرضى تم تشخيص اصابتهم بالامراض المنقولة جنسيا من قبل اطباء اختصاصيين بالاعتماد على الاعراض السريرية وتاريخ المرض للفترة من كانون الثاني ٢٠٢٢ولغاية تموز ٢٠٢٢ في محافظة دهوك .

تضمن الجزء الاول وباعتماد الطرق الروتينية للعزل والتشخيص باستخدام تقنية Vitek-2 عزل *N.gonorrhoeae* و (*E.*faecalis) *E. faecalis* وبنسبة ٢٣.٣٪ و 16.6% على التوالي. بالاضافة الى التحري عن المسببات البكتيرية باستخدام تقنية STD direct flow chip kit والتي بلغت فيها نسبة العينات الموجبة 63.3% ومن بين العينات الموجبة بلغت نسبة الاصابة بجرثومة *N.gonorrhoea* ١٥.٧٪ *بينما كانت اعلى نسبة اصابة ٦٨.٣٪ لجرثومة Ureaplasma urealyticum (U. urealyticum)* كما سجلت اقل نسبة اصابة ٥.١٪ لجرثومة *Chlamydia. trachomatis* بينما تفاوتت نسبة العينات الموجبة لكل من *Mycoplasma hominis(M.hominis)* و *Mycoplasma genitalium (M.genitalium)* وكانت ١٥.٧٪ و ١٠.٥٪ على التوالي .

فيما تناول الجزء الثاني تاكيد تشخيص العزلات الجرثومية جزيئيا باستعمال الجين 16SrRNA حيث تم تسجيل سلالتين جديدتين في بنك الجينات NCBI باسم-*N. gonorrhoeae* strain QaAm IRAQ-2 accession number ON986776.1 و *E. faecalis* strain QaAm-IRAQ-1 and ON796012.1 code accession number

كما تم استخدام نظام BLAST و طريقة NJ(neighbor-joining) لتحديد التشابه في التسلسل الجيني و رسم الشجرة التطورية للجرثومة المعزولة و اظهرت نتائج العزلتين الجرثومية تطابق و بنسبة ٩٩٪ لبكتر E. faecalis وبنسبة ١٠٠٪ لبكترا N. GONORRHOEA العديد من العزلات القياسية العالمية, فضلا عن ذلك تم التحري الجزيئي لبعض جينات الضراوة لجرثومة *N.gonorrhoeae* وهي *opa and por A genes* باستخدام Nested PCR حيث أظهرت النتائج أن التسلسل الجيني لكلا الجينين موجود وكان الوزن الجزيئي لكل من *opa* و *por* A (559bp, 298bp) و (567bp, 190bp) على التوالي .

في الجزء الثالث تم التحري عن التعبير الجيني لستة مؤشرات جينية لها علاقة بمؤشرات الاورام المناعية,بعد معاملة بعض خلايا نسيج الحيوانات المختبرية بجرثومة *N.gonorrhoeae* اظهرت نتائج التعبير الجيني باستخدام RT qPCR بواسطة برنامج Graph prism software وجود فروقات معنوية ذات دلالة إحصائية بين عينات زراعة الأنسجة المعاملة و غير المعاملة مع الجرثومة قيد الدراسة .حيث اظهرت جميع الجينات تعبيرا مابين واحد ونصف ١.٥ – اكثر من خمسة عشر ١٥ ضعف واخيرا في الجزء الرابع درست فعالية وتاثير كل من نبات القرنفل clove (Syzigium aromaticum) والقرنفل المحمل على دقائق الفضة النانوية AgNPs على جرثومة *N.gonorrhoeae* وخط الخلايا لسرطان البروستات PC3 والخلايا الطبيعية HdFn .

كما تضمنت دراسة قابلية جراثيم *N.gonorrhoeae* على تخليق دقائق الفضة النانوية بالاعتمادعلى التغير اللوني من الاصفر الفاتح الى اللون البني وتم توصيف دقائق الفضة النانوية المخلقة حيويا باستعمال تقنيات عدة شملت مطياف الاشعة فوق البنفسجية وطيف الاشعة تحت الحمراء وتقنية حيود الاشعة السينية والمجهر الالكتروني النافذ .

اظهرت نتائج تاثير مستخلص القرنفل على جراثيم N.gonorrhoeae وبطريقة الانتشار بالاقراص اعلى منطقة تثبيط بحدود 18 مليمتر وعند تركيز ١٠٠٪ من المستخلص النباتي بينما كانت منطقة التثبيط لمركب القرنفل النانوي اكبر وبحدود 26 مليمتر.

وبينت النتائج تاثير مستخلص القرنفل على خط خلايا سرطان البروستات PC3 فعالية وبنسبة تثبيط بلغت ٤٥.٣٪, ٣٨.١٪, ٢٤.١٪, ١٧.١٪, ١٥٪ وبالتراكيز ٤٠٠ , ٢٠٠, ١٠٠, ٥٠, ٢٥ مايكروغرام/ سم^3 على التوالي , فيما بينت نتائج تاثير القرنفل على الخلايا الطبيعية نسبة تثبيط تراوحت بين ٤٨.٥٪ – ٤.٨٪ عند التراكيز من ٤٠٠ – ٢٠٠ مايكروغرام / سم . فيما بلغت قيمة IC50 (140) مايكروغرام / سم على خط خلايا PC3 بينما كانت قيمتها على خط الخلايا الطبيعية (142) مايكروغرام/سم .وعند اختبار مركب clove-AgNPs تبين ان له فعالية اعلى من مستخلص القرنفل لوحده ضد خط خلايا PC3 اذ ثبطت الخلايا بنسبة ٥٨.٢٪, ٤٨.٤٪, ٣٦.٩٪, ١٨٪, ٤.٤٪ بالتراكيز ٤٠٠, ٢٠٠, ١٠٠, ٥٠, ٢٥ مايكروغرام/سم^3 على التوالي في حين لم يظهر المركب سمية خلوية عالية ضد خط الخلايا الطبيعية اذ تراوحت نسبة التثبيط بين ٣٣.٣٪ – ٤.٢٪ وبالتراكيز ٤٠٠ – ٢٥ مايكروغرام/ سم^3 . فضلا عن ذلك اظهرت النتائج فروقا معنوية $P< 0.0001$ عند حساب قيمة IC50 عند معاملة مركب القرنفل مع AgNPs بخط خلايا PC3 ٦٧.٤٤ مايكروغرام/ سم^3 والخلايا الطبيعية ١٣٢.٥ مايكروغرام / سم^3 .

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التشخيص الجزيئي لبكتريا *Neisseria gonorrheae* المعزولة من المرضى المصابين بالامراض المنتقلة جنسياً وتأثيرها على التعبير الجيني لبعض الجينات المرتبطة بسرطان البروستات

قاسم مصطفى خالد الدوبرداني

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف

الاستاذ الدكتورة

اميرة محمود محمد الراوي

١٤٤٥هـ ٢٠٢٣م