جامعة الموصل

كلية العلوم

التحري عن علاقة عزلات *Salmonella enterica* serovar Typhi في تكوين حصى المرارة والدور التثبيطي للكابسسين على خطوط الخلايا السرطانية

ساهرة ادريس حميد أحمد السنجري

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة أميرة محمود محمد الراوي

1443هـ 2022م

الخلاصة

أولت الدراسة الحالية اهتماماً بالتحري عن جراثيم *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) وعلاقتها بتكون حصى المرارة وسرطان المرارة من العينات المرضية والتي شملت 30 عينة من سائل الصفراء Bile و30 عينة من نسيج المرارة Fresh tissue من المرضى الذين يعانون من حصى المرارة و20 عينة من المرضى المؤكد اصابتهم بسرطان المرارة والمثبتة بالفورمالين والمحفوظة بشمع البارافين Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) وبشكل اكثر وضوحاً شملت الدراسة عدة محاور.

تضمن المحور الاول تشخيص جراثيم S.Typhi وبنسبة 2(6.66%) من عينات سائل الصفراء و 10(33.3%) من نسيج المرارة Fresh tissue باستخدام طرائق الزرع الروتينية والاختبارات الكيموحيوية وتقنية الفاتيك 2 والتحري عن بعض جينات الضراوة *FliC-d* و *CdtB* باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR) لتأكيد انتشار جرثومة S.Typhi بين المرضى المصابين بحصى المرارة وسرطان المرارة وبينت النتائج إن نسبة عزل جرثومة S.Typhi من المرضى المصابين بحصى المرارة 14(46.6%) مقارنة بنتائج العزل الروتينية وبنسبة 9(64.3%) في الإناث و 5(35.7%) لدى الذكور فيما بلغت نسبة عزلها من المرضى المصابين بسرطان المرارة وحصى المرارة معا 8(40%) منها 5(62.5) من الإناث و 3(37.5%) للذكور.

وركز المحور الثاني على تصميم جهاز مزرعة مستمرة جديد محلياً مع استخدام وسط Birlliant Green Bile Broth (BGBB) ولقحت المزرعة المستمرة بجرثومة S.Typhi. واظهرت النتائج تكون تجمعات كروية بأحجام مختلفة ولوحظ زيادة حجم الحصى المتكون في نهاية التحضين، درست اشكال بلورات الكوليسترول وكاربونات الكالسيوم المكون للحصى باستخدام المجهر الضوئي والفلورسيني والمجهر الالكتروني الماسح وشخصت المجاميع الفعالة باستخدام تقنية طيف الاشعة تحت الحمراء Fourier Transforms Infrared Spectroscopy (FTIR) .

وتناول المحور الثالث التحري عن فعالية الكابسسين المستخلص من نبات الفلفل الحار على انتاج متعدد السكريات وتكوين الحصى باستخدام نظام المزرعة المستمرة وبينت النتائج ان للكابسسين فعالية لتثبيط انتاج متعدد السكريات وتثبيط تكوين حصى الكوليسترول عند التركيز 50 مايكروغرام/ سم^3.

فضلاً على ما تقدم توصلت الدراسة الى أن للكابسسين المستخلص تأثيراً ساماً على خطوط الخلايا السرطانية باستخدام اختبار MTT وبالتراكيز 400، 200، 100، 50، 25، 12.5 مايكروغرام/ سم3 على الخطين الخلويين، خط خلايا سرطان المرارة G415 وخط خلايا سرطان

القولون CaCo-2 مقارنة مع خط الخلايا الطبيعية WRL 68 وبينت النتائج ان الكابسسين اعطى اعلى نسبة تثبيط على خلايا G415 بلغت 57.5% عند التركيز 400 مايكروغرام/ سم3 فيما بلغت اعلى نسبة تثبيط للكابسسين على خلايا CaCo-2 وبلغت 55.6% عند التركيز 400 مايكروغرام/ سم3 ولوحظ عدم وجود تأثير عالي على خط الخلايا الطبيعي WRL68.

تضمن المحور الرابع دراسة قابلية جراثيم S.Typhi على تخليق دقائق الفضة النانوية بالاعتماد على التغير الوني من الاصفر الفاتح الى اللون البني وتم توصيف دقائق الفضة النانوية المخلقة حيوياً باستعمال تقنيات عدة شملت مطياف الاشعة فوق البنفسجية Ultra Violet Spectrum (UV-Vis) وطيف الاشعة تحت الحمراء Fourier Transforms Infrared Spectroscope (FTIR) وتقنية حيود الاشعة السينية X- Ray Diffraction (XRD) والمجهر الالكتروني النافذ Transmission Electron Microscope (TEM).

Abstract

This study focused on the investigation on the *Salmonella enterica* serovar Typhi (S.Typhi) and its relationship to the formation of gallstone and gallbladder cancer. The study included 30 samples of bile fluid, 30 samples of fresh gallbladder tissue from patients suffering from gallstone, and 20 samples of formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) gallbladder tissue from patients confirmed with gallbladder cancer infection. The study included of several parts.

The first part included the diagnosis of S.Typhi with 6.66% of the bile fluid samples and 33.3% of the fresh gallbladder tissue using conventional methods, biochemical tests, and theVitek2 technique and detection of the *FliC-d* and *CdtB* genes using polymerase chain reaction (PCR) to confirm the prevalence of S.Typhi among patients with gallstones and gallbladder cancer. The results showed a 46.6% positivity for S.typhi among patients infected with gallstones compared with conventional methods more precisely, it was 64.3% for females and 35.7% for males. While the results showed a 40% positive with gallbladder cancer, it was 62.5% for females and 37.5 % for males.

The second part focused on the design of a noval continuous culture for the first time locally. Brilliant green bile broth (BGBB) was used, and the continuous culture was inoculated with S. Typhi. The results revealed formation of spherical aggregations of various sizes. Moreover, it was observed that there was an increase in the size of the stone that formed at the end of the incubation. The morphology of cholesterol and calcium carbonate crystals were studied using light, fluorescent and scanning electron microscopes, and the functional groups were diagnosed using the (FTIR) technique.

The third part of the study deals with the investigation of the effectiveness of capsaicin extracted from the chili plant on the polysaccharide production and cholesterol stones formation by using the continuous culture system. The results showed that capsaicin was effective in inhibiting the polysaccharide production and cholesterol stones formation at concentrations of 50 µg/ml.

In addition to the above, the study concluded that the extracted capsaicin had a toxic effect on cancer cell lines using the cytotoxicity test (MTT). The concentrations 400, 200, 100, 50, 25 and 12.5 µg/ml were used on the two cell lines the gallbladder cancer cell line G415 and the colon cancer line CaCo-2 compared with the normal cell line WRL68. The results showed that capsaicin caused highest inhibition percentage (57.5% for G415) at the concentration of 400 µg/ml, While highest inhibitory percentage of capsaicin on CaCo-2 was 55.6% at a concentration of 400 µg/ml, and there was no large effect observed against the normal cell line of WRL68.

The fourth part of the study consisted of studying the ability of S. Typhi 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).

University of Mosul

College of Sciences

Investigating the Relationship of *Salmonella enterica* serovar Typhi Isolates with Gallstones Formation and the Inhibitory Role of Capsaicin on Cancer Cell Lines

Sahira Adrees Hamed Ahmad Al-Sanjary

Ph.D. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood M. Al-Rawi

1443 A.H. **2022 A.D.**