



جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التوصيف الجزيئي لخميرة *Cryptococcus neoformans* وتأثير بعض

الجزيئات النانوية في نموها

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم - جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة / احياء مجهرية

من الطالبة

نور داخل مهدي

بكالوريوس علوم / علوم حياة 2013

إشراف

ا.م.د. نيران عبيد جاسم العامري

2016 م

1437 هـ

الأهداء

الى معلمتي الاولى ومن زرعت في نفسي بذور الصبر والحزم ... الى رمز العطاء ومن
غمرتني بحنانها وسارت معي في دربي الطويل (استاذتي الدكتورة نيران)

إلى ملاكي في الحياة .. إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان والتفاني .. إلى بسمه الحياة

وسر الوجود .. إلى من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى أعلى

الحبايب (أمي الحبيبة)

إلى من كلله الله بالهبة والوقار .. إلى من علمني العطاء بدون انتظار .. إلى من أحمل

آسمة بكل افتخار .. أرجو من الله أن يمد في عمرك لترى ثماراً قد حان قطافها بعد طول

انتظار وستبقى كلماتك نجوم أهتدي بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد (والدي العزيز)

إلى من أرى التفاؤل بعينهم .. والسعادة في ضحكهم ... إلى سندي وعوني ورفيقات

دربي (صديقاتي العزيزات)

نور

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين أبي القاسم محمد (صلى الله عليه و آله وسلم) و أهل بيته الطيبين الطاهرين .

يطيب لي وأنا انهي رسالتي هذه ان أوجه أسمى آيات الشكر والتقدير لمشرفتي الفاضلة **الاستاذ المساعد الدكتورة نيران عبيد جاسم** لأقتراحها موضوع البحث ومتابعتها المتواصلة لي وإرشاداتها القيمة لي طوال مدة تنفيذ البحث ,فلها مني خالص الدعاء الذي لا ينقطع ما حييت سائلة المولى عز وجل ان يوفقها وان يمدّها بالصحة والعافية .

واقدم الشكر والتقدير الى عميد كلية العلوم **الاستاذ المساعد الدكتور عبد الأمير سمير سعدون** ورئيس قسم علوم الحياة **المدرس الدكتور جاسم حنون** ولكل من أسهم من تدريسي كلية العلوم في تيسير ما تعسر علي .

كما اتقدم بخالص شكري وتقديري الى **الدكتور خليل كزار جلاب** / كلية الطب البيطري على المساعدة الكبيرة والجهد الذي بذله معي في مجال الدراسة النسيجية المرضية فجزاه الله عني خير الجزاء . كما اشكر **الدكتور علي محمد غازي** /كلية الطب البيطري لمساعدته لي في مجال التحليل الاحصائي .

و اتقدم بالشكر والتقدير الى منتسبي شعبة الأمراض الانتقالية , وأخص بالذكر **السيد قصي كاظم والسيدة ابتسام عبد الكريم** على التسهيلات التي قدموها فجزاهم الله عني خير الجزاء .

الشكر والتقدير الى زملائي من طلبة الدراسات العليا لما قدموه لي من مساعدة وتشجيع وبالأخص **هيام عبدالله , رقية عمران , ميسم هلال , عامرة عبدالهادي وأخي احمد علي حسين** فجزاهم الله عني خير الجزاء .

وأخيرا أودّ ان اشكر أسرتي لما قدموا لي من دعم مادي ومعنوي .

الباحثة

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿نَزَقَهُ وَرَجَّاسٍ مِّنْ نَّسَاءِ﴾

وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ ﴿٧٦﴾

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سورة يوسف (جزء من الآية 76)

إقرار المشرف

اشهد ان رسالة الماجستير الموسومة بـ : **((التوصيف الجزيئي لخميرة *Cryptococcus neoformans* وتأثير بعض الجزيئات النانوية في نموها))** قد أعدتها الطالبة **نور داخل مهدي** بإشرافي , وهي من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية .

التوقيع:

الاسم : أ.م. د. نيران عبيد جاسم العامري

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للبنات – جامعة القادسية

التاريخ : 2016/ /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية المقدمة من الأستاذة المشرفة أحيل هذه الدراسة إلى المقومين اللغوي والعلمي لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم : د. جاسم حنون

اللقب العلمي : مدرس

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ : 2016/ /

إقرار المقوم اللغوي

اشهد انه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالبة (نور داخل مهدي) الموسومة بـ : «التوصيف الجزيئي لخميرة *Cryptococcus neoformans* وتأثير بعض الجزيئات النانوية في نموها» .

التوقيع:

الاسم : خالد عبد فزّاع

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية – جامعة القادسية

التاريخ : 2016/ /

اقرار لجنة المناقشة

نشهد اننا أعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (التوصيف الجزيئي لخميرة *Cryptococcus neoformans* وتأثير بعض الجزيئات النانوية في نموها) وناقشنا الطالبة نور داخل مهدي في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2016/5/15 وإنها جديرة لنيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة /أحياء مجهرية وبتقدير (امتياز) .

التوقيع :	التوقيع :
رئيس اللجنة : د . محمد شمخي جبر	عضو اللجنة : د . عبد الامير سمير سعدون
المرتبة العلمية : استاذ	المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان :كلية التقنيات الصحية والطبية /	العنوان : كلية العلوم /جامعة القادسية
الجامعة التقنية الوسطى	التاريخ : / / 2016
التاريخ : / / 2016	

التوقيع :	التوقيع :
عضو اللجنة : د . بهيجة عبيس حمود	عضو اللجنة : د . نيران عبيد جاسم
المرتبة العلمية : استاذ	المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان :كلية التمريض / جامعة القادسية	العنوان : كلية التربية للبنات /جامعة القادسية
التاريخ : / / 2016	التاريخ : / / 2016

مصادقة مجلس كلية العلوم

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته المنعقدة في / / 2016 وقرر منحه شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة /أحياء مجهرية .

التوقيع:

الاسم : د . عبد الامير سمير سعدون

اللقب العلمي :استاذ مساعد

التاريخ : / / 2016

تضمنت الدراسة الحالية عزل خميرة *Cryptococcus neoformans* وتشخيصها من العينات السريرية من المرضى المراجعين والراقدين في كل من مستشفى الأطفال والولادة التعليمي ومستشفى الديوانية التعليمي والعيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية وخلال المدة من 1/10/2014 الى 1/4/2015 , وقد كان عدد العينات التي تم الحصول عليها 420 عينة سريرية شملت 350 عينة قشع و51 عينة حروق و12 عينة من الغسيل القصي و7 عينات من سائل النخاع الشوكي , فحصت وشخصت جميع العينات بالطرائق التقليدية وباستخدام الأوساط الزرع الخاصة بالخميرة ودعم التشخيص باستخدام تقنية ال PCR .

اختبرت القدرة التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية Silver nanoparticles (Ag-NPs) وبثلاثة تراكيز (2,4,6) ملغم/مل ضد الخميرة بالمقارنة مع المضاد الفطري الامفوتيرسين بي Amphotericin B ودراسة التأثيرات النسيجية والمرضية بعد إجراء إصابة تجريبية في إناث الجرذان البيض المختبرية بالخميرة واختبار كفاءة جزيئات الفضة النانوية علاجا تجريبيا نسيجيا ضد الإصابة المستحدثة في الجرذان . كما تم تحضير جزيئات الفضة النانوية بطريقة بايولوجية باستخدام الفطر *Fusarium oxysporum* .

وبينت نتائج الفحوصات المظهرية والزرعية والمجهريه عائدة 30 عزلة (7.14) % فقط الى نوع *C.neoformans* والتي تضمنت 23 عينة قشع و3 عينات حروق و3 عينات من سائل النخاع الشوكي وعينة واحدة من الغسيل القصي . كما بينت نتائج الدراسة ان التركيز 6% ملغم/مل كان اكثر التراكيز تثبيطا إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط Inhibition zone (5.46 ± 0.29) ملم في حين كان التركيز 4% متقارب معه في النتيجة إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (5.26 ± 0.13) ملم بينما كان التركيز 2% هو اقل التراكيز تثبيطا إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (2.73 ± 0.17) ملم, اما بالنسبة للمضاد الفطري فقد بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (7 ± 0.11) ملم ,حيث بينت النتائج ان هناك فروقا معنوية بين جزيئات الفضة النانوية ومضاد الامفوتيرسين B الذي استخدم كعامل سيطرة موجب .

وتضمنت هذه الدراسة ايضا تتبع إمراضية الخميرة في إناث الجرذان البيض المثبطة وغير المثبطة مناعيا , إذ عانت جرذان كلا المجموعتين من نقصان الوزن , فقدان الشهية وكثرة الحركة مقارنة مع مجموعة السيطرة .

اما نتائج الفحص النسيجي للأعضاء المشمولة بالدراسة (الرئة ، الدماغ) ، فقد تمثلت التغيرات النسيجية – المرضية في الرئة بارتشاح الخلايا الالتهابية في النسيج البيني للرئة مع احتقان الأوعية الدموية وتتكس في الخلايا العمودية المبطنة للقصبات ، وقد زادت هذه التغيرات حدة في المجموعة المثبطة فبالإضافة الى ما ذكر آنفاً لوحظ وجود تثخن في النسيج البيني للأسناخ مع وجود النفاخ الرئوي، ووجود الخميرة داخل تجويف الاوعية الدموية وفي بعض الأسناخ الرئوية . اما بالنسبة للدماغ فقد تمثلت التغيرات بارتشاح الخلايا الدبقية والنجمية , كما لوحظ احتقان الأوعية الدموية وتتكس الخلايا العصبية في نسيج الدماغ

وقد زادت هذه التغيرات في المجموعة المثبطة فبالإضافة الى ما ذكر أنفاه لوحظ تواجد الخميرة بكثرة في نسيج الدماغ .

كما أظهرت نتائج المقاطع النسيجية للجرذان المعالجة بالمضاد الفطري تغيرات قريبة للمجاميع غير المعالجة ولم نلاحظ أي تحسن في حين بينت نتائج الجرذان المعالجة بجزيئات الفضة النانوية تغيرات اقل من المجاميع غير المعالجة , وهذا يشير الى ان إعطاء جزيئات الفضة النانوية كعلاج تجريبي قد اسهمت بشكل فعال وواضح في تقليل التغيرات النسيجية - المرضية. كما كان هناك تفاوت في استجابة الجرذان للعلاج إذ أعطت المجموعة غير المثبطة استجابة أفضل للعلاج حيث كان النسيج مقارب لنسيج مجموعة السيطرة في حين اظهرت المجموعة المثبطة استجابة اقل للعلاج .

وهذا ما يؤكد ان كلا من الجرذان المثبطة وغير المثبطة مناعيا يمكنها ان تصاب بخميرة *C.neoformans* إلا ان الجرذان المثبطة مناعيا أظهرت إصابة أكثر شدة . اما النتائج الخاصة بقدرة الفطر *Fusarium oxysporum* على انتاج الفضة النانوية فقد تم الكشف عنها باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية UV-vis .

1- المقدمة :

يعد داء المكورات الخبيثة (cryptococcosis) الذي تسببه خميرة *Cryptococcus neoformans* من الامراض الخطرة على الصعيد العالمي (Barnett,2010) . يكون هذا المرض أكثر حدة في الأشخاص الذين يعانون من ضعف مناعي وخاصة الأشخاص الذين يعانون من نقص في خلايا T-cell (CD4) (cell-mediated immunity) والأشخاص المصابين بالايذ Human immunodeficiency virus (Jarvis et al .,2013) .

كذلك من العوامل الاخرى التي تساعد في حدوث الإصابة هي الاستخدام المفرط والعشوائي للمضادات الحياتية و الستيرويدات القشرية (Corticosteroids) (Slavin and Chen , 2013) ، وزراعة الاعضاء (Solid organ transplant) (Warkentien and Crum- Cianflone , 2010) والاصابة بالأورام السرطانية اللمفية الشبكية Lymphoreticular malignancies) ، وغيرها (Bratton et al .,2012) .

وتعد خميرة *C.neoformans* المسببة لهذا الداء من الفطريات الانتهازية الواسعة الانتشار في العالم والتي تصيب الانسان ومعظم الحيوانات (Sidrim et al .,2010) . حيث تميل خميرة *C.neoformans* بشدة لاصابة الجهاز العصبي المركزي أكثر من المواقع الأخرى في الجسم مسببة السحايا (cryptococcal meningitis) الذي يعد الشكل الاكثر شيوعا في حالة انتشار الخميرة من

الموضع الرئيسي للإصابة وهي الرئة (Park *et al* .,2009) , في حين تكون إصابة الجلد اقل من الحالة الأولى (Perfect *et al* .,2010) , وتعد إصابة مجرى الدم (Cryptococemia) خطرة جدا لقدرة الخميرة على الوصول بسهولة الى الأعضاء الأخرى للجسم (Brizendine *et al* .,2013) .

ونتيجة للتقدم الذي حصل خلال السنوات الأخيرة في المجال الطبي وأستعمال التقنيات الحديثة في العلاج أدى ذلك الى نجاة العديد من المصابين الذين كانوا يعانون من أمراض خطيرة ولكن بالوقت نفسه ازدادت مقاومة الميكروبات للمضادات الحياتية (Stevanovic *et al* ., 2012) , إذ تمّ ملاحظة زيادة نسبة الإصابة بالفطريات الانتهازية (Oppertunistic fungi) مثل: (Aspergillus و Candida و Cryptococcus) , والتي تعد من اكثر الفطريات الجهازية مقاومة للمضادات الحياتية (Sionov *et al* ., 2010 ; Mortensen *et al* ., 2011) .

ونظرا لأستخدام المضادات الفطرية المتمثلة بمجاميع الازول Azole والبولينات Polyenes في علاج الفطريات لعدة عقود فقد أظهرت هذه الفطريات مقاومة ضد Fluconazole وحتى ضد المضاد العالي السمية amphotericin B (Mukherjee *et al* .,2003) . بالإضافة الى امتلاك المضادات الفطرية اثارا جانبية على صحة الانسان مثلا يسبب مضاد الامفوتيرسين B فشل كلوي إذ لوحظ ان معظم الاشخاص الذين تناولوا هذا المضاد كانوا يعانون من حمى واغماء وإسهال بعد استخدامهم لهذا المضاد .اما المضادات الفطرية التي تنتمي لعائلة Azole مثل: Fluconazole فانها تسبب تسمم الكبد وإيقاف تصنيع هرمون Testosterone (Nasrollahi *et al* .,2011) .

مما دفع العلماء الى ايجاد بدائل عن المضادات الفطرية تمتلك فعالية عالية ضد الفطريات الممرضة ,قليلة التكلفة , غير سامة و تعمل بطرائق غير مألوفة بالنسبة للفطريات للتخلص من المقاومة العالية للفطريات ضد المضادات الفطرية (Kanhed *et al* .,2014) .

وفي العقود الاخيرة تركزت بحوث العلماء على جزيئات المعادن النانوية .لذا كانت من البدائل التي وجدها العلماء هو أستخدام الجزيئات النانوية (nanoparticles) والتي تتميز بامتلاكها فعالية عالية ضد الميكروبات (Schabes-Retchkiman *et al* .,2006) .

معدن الفضة هو احد المعادن التي تستخدم بالشكل النانوي بصورة واسعة جدا في العديد من مجالات الحياة ,وبصورة رئيسة استخدامها كمضادات للأحياء المجهرية في المجال الطبي (Kandile *et al* .,2010) .

تعود هذه الفعالية لأمتلاك جزيئات الفضة النانوية لمساحة سطحية واسعة مقارنة مع الحجم (Kanhed *et al* .,2014) , مما يجعل جزيئات الفضة النانوية تمتلك خصائص كيميائية ,حيوية ,ميكانيكية ,بصرية وفيزيائية تمكنها من الاستخدام في العديد من منتجات المستهلك مثل صناعة الادوية ,صناعة

الأغذية, المنسوجات, مواد التجميل والاجهزة الطبية والطلاء وغيرها (Dubchak et al ., 2010; Pulit et al ., 2011).

اثبتت العديد من الدراسات ان جزيئات الفضة النانوية تمتلك فعالية عالية ضد الفطريات (Qian et al., 2013; Xu et al., 2013). وفي الوقت الحاضر أشارت العديد من الدراسات ان استخدام جزيئات الفضة النانوية كعوامل بايولوجية أصبح شائعاً جداً (Korbekandi et al ., 2013; Yasin et al ., 2013). ولهذا جاءت دراستنا هذه لتثبت تأثير هذه الجزيئات على واحد من الفطريات المرضية التي ازدادت الاصابة بها في الوقت الحاضر وهي خميرة *C.neoformans* حيث هدفت الدراسة الى اختبار الفعالية التثبيطية للفضة النانوية تجاه هذه الخميرة وامكانية استخدامها كبديل عن المضادات الفطرية وشملت الدراسة المحاور الآتية :

1: عزل الخميرة و تشخيصها من العينات السريرية وتنميتها على أوساط زرعية مختلفة .

2: استخدام تقنية ال PCR لدراسة النمط الوراثي للخميرة المعزولة .

3: دراسة تأثير الجزيئات النانوية للفضة مختبرياً وبتراكيز مختلفة ضد خميرة *C. neoformans* .

4: تقييم الاثر العلاجي لجزيئات الفضة النانوية تجريبياً (in-vivo) على التأثيرات المرضية –النسجية للإصابة المستحدثة بخميرة *C.neoformans* في اناث الجرذان البيض المختبرية .

5: امكانية تصنيع الجزيئات النانوية للفضة بايولوجياً باستخدام الفطر *F. oxysporum* .

2- الاستعراض المراجع :

2-1: خميرة *Cryptococcus neoformans* :

ينتمي النوع *Cryptococcus neoformans* الى الفطريات البازيدية والطور الكامل للفطر هو *Filobasidiella neoformans* التي تنمو بشكل خمائر (Yeast-like) وهي من الخمائر الانتهازية (Opportunistic) التي تصيب الاشخاص المثبطين مناعياً (Immunocompromised) والتي تسبب نسب عالية من الاصابة (Morbidity) والهلاك (Mortality) كما تصيب أيضاً الاشخاص غير المثبطين مناعياً (Immunocompetent) لكن بنسب اقل (Chen et al ., 2008).

يضم جنس *Cryptococcus* اكثر من 100 نوع مشخص حسب التصنيف الحديث (Fonseca et al., 2011) لكن الانواع الممرضة للإنسان والحيوان قليلة جداً أهمها وأشدها إمرضية هو النوع *Cryptococcus neoformans* و *Cryptococcus gattii* كما يوجد النوعين *C.albidus* و *C.laurentii* اللذين نادراً ما يسببان المرض (Baddley and Dismukes, 2003).

تتميز خميرة *C.neoformans* بان خلاياها كروية الى بيضوية الشكل قطرها (4-6) mm ومحاطة بغلاف (Capsule) سميك مكون من السكريات المتعددة (Polysaccharides) يتراوح حجمه من 1 الى 30 ميكرو متر . تتكاثر الخميرة بالتبرعم (Budding) مكونة برعم واحد ضيق القاعدة و لا تكون خيوط فطرية حقيقية (True hyphae) و لا انبوبا جرثوميا (Koneman et al.,1992) (Germ tube) .

تتميز خميرة *C.neoformans* بانها تكون مستعمرات بيضاء الى كريمية اللون ، ملساء مخاطية على الاوساط الزرعية الصلبة ، مثل : وسط السابرويد دكستروز اكار ، كما تعتمد مخاطية المستعمرات على حجم الكبسولة . تنمو الخميرة بمعدل اقل من الخمائر الاخرى ، مثل : *Candida albicans* و *Saccharomyces cerevisiae* تحت الظروف نفسها (Mitchell and Perfect ,1995) .

وتتمكن خميرة *C.neoformans* من النمو في درجة حرارة 37 م° وهذا ما يميزها عن الانواع الاخرى غير الممرضة للخميرة والتي لا تستطيع النمو في مثل هذه الدرجة . كما لا تؤيض خميرة *C.neoformans* سكر اللاكتوز والنترات ، كما تتمكن معظم السلالات من استغلال الكرياتين كمصدر وحيد للنيتروجين وهذا ما يفسر نموها على مخلفات الطيور الغنية بهذا المركب . كما تمتلك خميرة *C.neoformans* القدرة على انتاج الميلانين واليوريز وتحلل النشا واستهلاك سكر الانوستول (Kwon-chunge and Bennett ,1992) (Inositol) .

اما التصنيف العلمي الحديث للخميرة ، فهو كالاتي (Hibbett et al .,2007) :

Kingdom : Mycetae

Phylum :Basidiomycota

Subphylum: Basidio mycotina

Class: Tremellomycetes

Order: Filobasidiales

Family: Filobasidiaceae

Genus :*Filobasidiella (Cryptococcus)*

Species: *neoformans*

تضم خميرة *C.neoformans* أربعة انماط مصلية اعتمادا على الخاصية المستضدية لسكريات الغلاف ، وهي : (A , B , C , D) (Kwon-chung and Varma,2006) . ويعتبر النمط المصلي A

هو أكثر الأنواع انتشاراً ، والمسؤول عن النسبة الأكبر من حالات الإصابة بداء المكورات الخبيثة (Vu et al., 2013). تمتلك الخميرة ضربين هما : *C.neoformans var neoformans* يضم الطرز المصلية (A , D) و *C.neoformans var gattii* يضم الطرازين (C , B) (Springer and Chaturvedi ,2010) .

وتضم خميرة *Cryptococcus* بالإضافة إلى *C.gattii* و *C.neoformans* 98 نوع مشخص بحسب التصنيف الحديث (Fonseca et al.,2011) . معظم هذه الأنواع لا تستطيع العيش والنجاة داخل جسم الكائن الحي بسبب درجة حرارة الجسم العالية نسبياً وكذلك مناعة المضيف لذلك تكون الإصابة بهذه الأنواع نادرة جداً ، ومن هذه الأنواع التي وجدت في العينات السريرية هي *C.laurentii* , *C.humicolus* , *C.curvatus* , *C.uzbekistanensis* , *C.adeliensis* , *C.magnus* , *C.albidus* , *C.uniguttulatus* , *C.flavescens* , *C.macerans* , *C.luteolus* , (Eshar et al., 2010) .

وتتوجد خميرة *C. neoformans* بشكل واسع في مصادر بيئية مختلفة ، مثل : التربة وفضلات الطيور وخاصة فضلات الحمام التي تعد الموطن البيئي الرئيس للخميرة ,ويعد الحمام الذي يعود للنوع *Columba livia* بمثابة المضيف الخازن Reservoir لهذه الخميرة في حين *C.gattii* يكون مرتبطاً مع الأشجار (Springer and Chaturvedi ,2010) .

تشير الدراسات إلى إمكانية عزل الخميرة من مصادر بيئية أخرى مثل: الفواكه والخضروات إذ عزلت أول مرة من عصير الخوخ عام 1894 وكذلك من الأخشاب المتحللة والتربة الملوثة بفضلات الطيور (Junior et al.,2013) . كما عزلت الخميرة من براز أنواع أخرى من الطيور ، مثل : الببغاء ، طيور المونيا (Munia birds) والكناري ومن الأعشاش القديمة وأعشاش الخفافيش (Lazera et al., 1993) .

2-2: عوامل ضراوة خميرة *C.neoformans* :

تمتلك خميرة *C.neoformans* عدداً من عوامل الضراوة التي تزيد من إمراضية الخميرة ، والتي تتضمن كل الآليات التي تسمح للخميرة بالنمو والتكاثر داخل الكائن الحي و العوامل التي تمكنها من مقاومة الجهاز المناعي للمضيف (Cadieux et al., 2013 ; Coelho et al., 2014) وعلى العموم تشمل عوامل الضراوة ما يأتي :

1-2-2: المحفظة Capsule :

تشير العديد من الدراسات بأن المحفظة تعد من أهم عوامل ضراوة خميرة *C. neoformans* (O Meara and Alspaugh,2012;Vecchiarelli et al.,2013) . تمتد المحفظة من الجدار الخلوي

للخميرة وتصل أحيانا الى ضعف حجم الخميرة , إذ° بينت الدراسات ان حجم المحفظة يزداد خلال مرحلة الإصابة بالخميرة (Zaragoza et al ., 2010; Okagaki et al ., 2010) .

وتتكون المحفظة من تركيب معقد مكون من أنواع من السكريات المتعددة ومن أهم هذه السكريات هو سكر Glucuronoxylomannan (GXM) الذي يعد السكر السائد في تكوين محفظة *C.neoformans* وهو المستضد الذي يتم بواسطته تحديد الأنماط المصلية للخميرة (Heiss et al .,2013) . بالإضافة الى هذا السكر تتكون المحفظة من مكونين اخرين هما : سكر Glucuronoxylomannogalactan (GalXM) و البروتين السكري Mannoproteins (MP) وهما موجودان بكمية قليلة في المحفظة مقارنة مع (GXM)

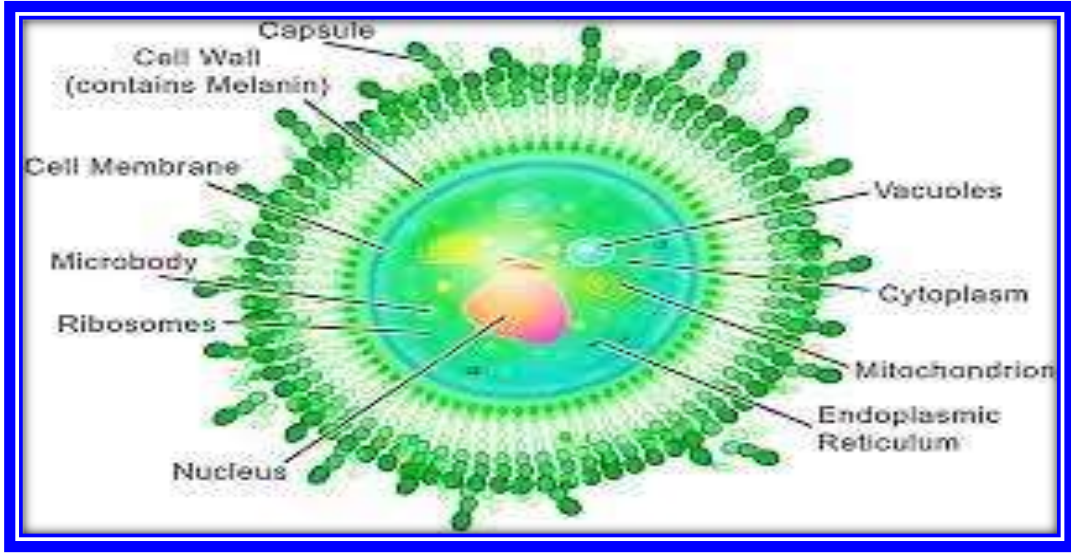
(Jesus et al .,2010) .

يشكل ال GXM نسبة 88% من مكونات المحفظة ويبلغ الوزن الجزيئي له (1.700-7.000) كيلو دالتون وعند دراسة التركيب الكيميائي لل GXM لجميع الانماط المصلية وجد انه يتكون من ثلاثة مكونات هي: حامض الكلوكورونك Glucuronic acid و الزايلوز Xylose و المانوز Mannose , كما لوحظ ان الاختلافات الحاصلة بين هذه الانماط يعود الى اختلاف النسب المولارية Molar ratio للمكونات اعلاه (McFadden et al .,2006) .

كما وجد ان GalXM يتكون من الكالاكتوز Galactose ، الزايلوز Xylose و المانوز Mannose ويشكل 10% من مكونات المحفظة وبوزن جزيئي 275 كيلو دالتون Zaragoza et al (.,2009) . اما MP فهو مركب ثانوي لجدار الخميرة والذي يعمل كمكتسبات للحديد عند سطح الخميرة والذي يتكون من متعدد سكريد مقترنا مع بروتين ويشكل نسبة 1-2% من مكونات المحفظة Cadieux et al ., 2013) .

بينت العديد من الدراسات بان المحفظة تمتلك سكريات متعددة اضافية مثل: البيتا كلوكان

β -glucan الذي وجد في محفظة الخمائر المسنة (Cordero and Pontes et al ., 2011) وكذلك الكايتين (Chitin) الذي وجد بشكل مرتبط مع GXM والذي يعمل بمثابة المرتكز لل GXM في جدار الخلية (Ramos et al.,2012) .



شكل (1):

رسم توضيحي لتركيب خلية الخميرة مع المحفظة (Bose et al., 2003).

2-2-2: الميلانين واللاكيز Melanin and Laccase

يعد وجود الميلانين من أهم عوامل الضراوة التي تتميز بها الخميرة والتي تسهم في زيادة إمراضية الخميرة بالإضافة إلى الكبسولة (Eisenman and Casadevall, 2012). أما Laccase فهو الإنزيم المسؤول عن تصنيع الميلانين من مادة الكاتيكولامينات Catecholamins ويؤدي الخلل في laccase إلى خلل في إنتاج الميلانين مما يؤدي إلى حدوث خلل في ضراوة الخميرة (Liu and Nizet, 2009).

تعمل جزيئة الميلانين على استقرار الجذور الحرة وهي مضادات أكسدة كفوءة جدا وهذه الوظيفة مهمة جدا بالنسبة للخميرة حيث تعمل على حماية الخميرة من الجذور الحرة التي ينتجها الجهاز المناعي للمضيف (Heitman et al., 2011; Dadachova et al., 2008). كما يسهم الميلانين في زيادة صلابة الجدار الخلوي للخميرة (Papepinto et al., 2009). تمتلك الخميرة نوعين من laccase هما lac1 والذي يوجد بكثرة في جدار الخلية و lac2 يوجد بكثرة في الساييتوبلازم لكن كلاهما مسؤولان عن إعطاء الصبغة الداكنة للجدار الخلوي للخميرة (Missall et al., 2005).

3-2-2: القدرة على النمو في 37 م° :

تستطيع خميرة *C. neoformans* من النمو بصورة جيدة في درجة حرارة 37 م° وهي صفة مميزة لهذا النوع عن بقية الأنواع غير الممرضة التي لا تمتلك القدرة على النمو في مثل هذه الدرجة. ولكي تتمكن الخميرة من العيش في 37 م° فأنها يجب أن تمتلك جين فعال يتضمن وحدة فرعية تشفر لإنتاج Calcineurin A (Brown et al., 2007). Calcineurin هو عبارة عن سيرين-ثريونين serine-threonine خاص بأنزيم الفوسفاتيز phosphatase الذي يحفز بواسطة أيونات الكالسيوم

Ca²⁺ وقد وجد ان العزلات الطافرة التي لا تحتوي على Calcineurin من الخميرة لا تستطيع العيش في درجة حرارة 37 م° . ويتضح من ذلك بان Calcineurin هو عنصر اساسي في نجاة الخميرة داخل جسم المضيف ومن ثمَّ فهو عامل ضروري جدا في إمراضية الخميرة (Perfect , 2006) .

2-2-4: الانزيمات المحللة : Analysis enzymes

اولا: Proteinase :-

جميع عزلات *C.neoformans* التي تمَّ عزلها من العينات السريرية والبيئية وجد بانها تحتوي على انزيم proteinase (Rodriguez et al ., 2003) . إذْ اظهرت الخميرة القدرة على تحلل بروتينات المضيف ، مثل: immunoglobulins , fibrinogen , Collagen , elastin (Chen et al ., 1996) .

افترض كل من Tucker and Casadevall , (2002) بان تكاثر خميرة *C.neoformans* داخل الخلايا البلعمية هو مرتبط بإنتاج انزيمات تتضمن كل من Phospholipases و Proteinases لتحطيم غشاء الخلايا البلعمية , لذلك فان الخميرة لها القدرة على تحلل أنسجة المضيف وتحطيمها واستخدامها كغذاء , كما يساعد في هجرة الخميرة الى الجهاز العصبي المركزي (Vu et al ., 2014) .

ثانيا: - Phospholipase :

هو الانزيم الذي يحلل الدهون الفوسفاتية Phospholipids عن طريق تحطيم واحدة او اكثر من الأواصر الاسترية الموجودة في glycerophospholipids واحد اشكاله هو Phospholipase B (PLB) الذي تفرزه الخميرة أثناء إصابة المضيف والذي يعمل على نجاة الخميرة من الخلايا البلعمية (Cox et al ., 2001) , وان تحلل الدهون الفوسفاتية للمضيف بواسطة (PLB) سوف يحدث خلل في اغشية الخلايا البلعمية والتي تمكن الخميرة من المرور بسهولة الى مكونات الساييتوبلازم وهذا يلعب دورا اساسيا ومباشرا في اكتساب المغذيات (Chrisman et al ., 2011) . الدراسات الحديثة اثبتت بان PLB الذي تفرزه الخميرة يسهل من التصاق الخميرة بسطح الخلايا الطلائية البطانية Endothelial cells للرئة والخلايا الدبقية Glial cells للدماغ (Lev et al ., 2013) .

ثالثا: - Urease :

يعمل انزيم urease دور مهم في خميرة *C.neoformans* وهو عبارة عن انزيم ثانوي يعمل على إزالة سمية اليوريا الناتجة من القلويدات الموجودة في الوسط عن طريق التحلل المائي لليوريا محولا اياها الى امونيا Ammonia و مسببا زيادة موضعية في نسبة ال pH وبذلك يسهل من عملية أخذ النتروجين (Maruvada et al ., 2012). وقد وجد بان انزيم urease يعمل على دعم اجتياز الخميرة الحواجز الطلائية ويساعد أيضا في اجتياح الدماغ (Shi et al.,2010 ;Singh et al .,2013).

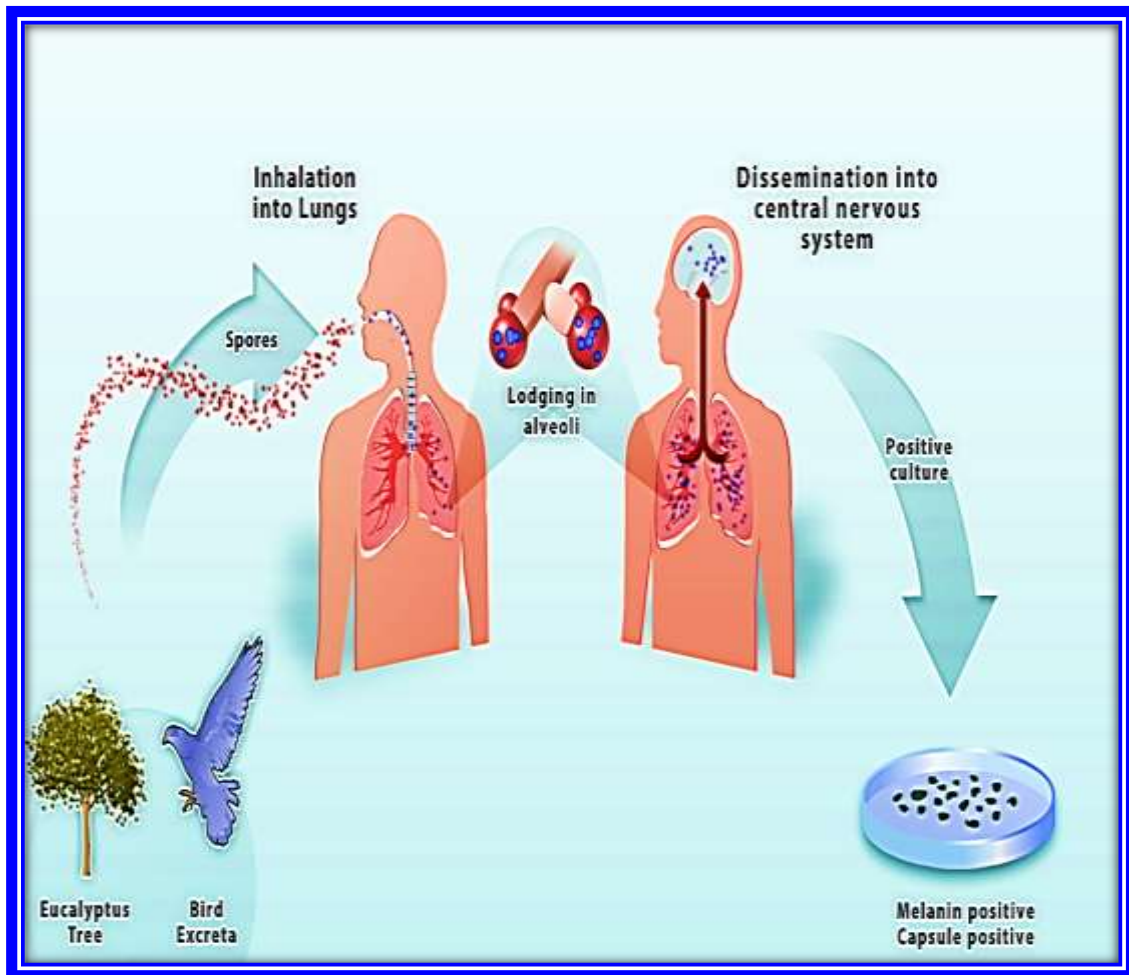
ومن عوامل الضراوة الأخرى هي ان خميرة *C.neoformans* تنتج مواد أخرى ومنها المانيتول mannitol والذي يلعب دورا مهما في زيادة مقاومة الخميرة لعوامل الاجهاد الحراري (Heat stress) والاجهاد الاوزموزي (Osmotic stress) (Chaturvedi et al .,1996).

2-3- الأشكال السريرية للإصابة Clinical forms of infection

تعتمد الأشكال السريرية للإصابة بالخميرة بشكل كبير على الحالة المناعية للمضيف وتختلف حدة الإصابة من بدون أعراض الى تكوين عقيدات رئوية عرضية وصولا الى الانتشار الواسع للخميرة. تصيب الخميرة الانسان ولاسيما الاشخاص اللذين يعانون من خلل في المناعة الخلوية وخاصة خلايا T-cell التي تكون لديهم اقل من 50 خلية / مل , الاشخاص المصابين بالايذز سرطان الدم الخبيث والامراض المزمنة وعمليات نقل الاعضاء والاشخاص اللذين يتناولون الكورتيكوستيرويدات بشكل مستمر ، وغيرها من الأمراض التي تسبب تثبيط مناعي للشخص (Yu et al .,2012 ; Harris et al .,2011). ومن الأشكال السريرية للإصابة هي:

2-3-1:داء المخفيات الرئوي Pulmonary cryptococcosis تعد

الرئة اول عضو مستهدف من قبل الخميرة بصفتها المدخل الرئيس لدخول خلايا الخميرة او الابواغ البازيدية (Visnegarwala et al .,1998). وتكون الإصابة من بدون اعراض وهذا ما يحدث في معظم المصابين الى اعراض متوسطة وخفيفة تشمل ضيق التنفس ,سعال وغثيان و الم في الصدر و التعرق الليلي ,واحيانا نفث الدم (Hemoptysis) (Chang et al .,2006). اما الاعراض الحادة للإصابة والتي تشمل الحمى و التعرق الليلي وفقدان الوزن تكون اقل شيوعا في الاشخاص غير المثبتين مناعيا مالم تكون الإصابة منتشرة الى المناطق الأخرى في الجسم (Chang et al .,2006). وعند مقارنة حالة الإصابة في الاشخاص المثبتين مناعيا ولاسيما الاشخاص المصابين بالإيدز مع الاشخاص غير المثبتين نجد ان مرحلة ظهور الاعراض تكون أسرع وكذلك نسبة الوفيات أكبر من الاشخاص غير المثبتين (Meyohas , 1995).



شكل(2): إصابة الرئة والجهاز العصبي المركزي (King , 2013) .

2-3-2- إصابة الجهاز العصبي المركزي Cryptococcal meningitis

يعد التهاب الدماغ وتواجد الخميرة في سائل النخاع الشوكي هو الأكثر شيوعاً لإصابة الشخص بالخميرة وتتراوح الإصابة من تحت حادة إلى مزمنة وغالباً ما تؤدي إلى الموت في حالة عدم أخذ العلاج المناسب وتكون الوفاة بعد مدة قصيرة من الإصابة تكون بالأسابيع أو أشهر قليلة من ظهور الأعراض وهذا يرتبط غالباً بالحالة المناعية للمصاب (Terada , 2010) . تتشابه الأعراض السريرية في الأشخاص المثبتين وغير المثبتين مناعياً لكن في المثبتين تكون أكثر حدة وأسرع وذلك بسبب قلة الاستجابة الالتهابية وتواجد الخميرة بكثرة في هؤلاء الأشخاص وتشمل: صداع و تقيؤ وغثيان (Saag et al .,1992) .

يعاني 30 % تقريباً من المرضى من ضعف العصب القحفي والذي ينتج من زيادة الضغط داخل القحف واجتياح الخميرة للقحف وإصابة الأنسجة الدماغية . ومن أهم الأعراض التي تشير إلى إصابة العصب القحفي هو نقص حدة البصر وازدواج الرؤية وأحياناً يسبب فقدان البصر , فقدان السمع , ضعف الوجه , تجمع الماء في الرأس (Hydrocephalus) والنوبات العصبية التي تحدث في المرحلة الأخيرة من الإصابة (Makadzange and McHugh , 2014) . إن ارتفاع الضغط داخل القحف يعود إلى تواجد

الخميرة بكثرة والتي تعمل على عرقلة تدفق سائل النخاع الشوكي عبر الشبكة العنكبوتية بالإضافة الى تراكم السكريات المتعددة الذائبة المكونة لكبسولة الخميرة في الشبكة العنكبوتية يعمل على تغير مجرى سائل النخاع الشوكي (Loyse *et al* .,2010) .

Ocular infection

2-3-3:إصابة العين

تحدث الإصابة بالعين عن طريق دخول دقائق الغبار الملوثة بخلايا الخميرة الى العين والتي تؤدي الى فقدان البصر في بعض الأحيان (Rippon ,1988) . فتقريبا 45% من الاشخاص المصابين بالسحايا يعانون من أمراض العين كما ان العديد من حالات التهاب السحايا تم التعرف عليها بعد ظهور أمراض العين (Crump *et al* .,1992) .

الأعراض البصرية تشمل ازدواجية الرؤيا (Diplopia) ,ضمور بصري (Opticatrophy) ,التهاب الشبكية (Chorioretinitis) ,عتمة (Scotoma) وفقدان الرؤيا (Kwon-chung and Bennet ,1992) . حوالي 20% من الاشخاص غير المثبتين مناعيا يعانون من اصابات العين ,وقد يحدث فقدان الرؤيا خلال ساعات قليلة ، وأسابيع أو اشهر وهذا يعود الى التهاب العصب البصري ، أو ربما بسبب زيادة الضغط داخل القحف (Graybill *et al* ., 2000) .

Cutaneous Cryptococcosis

2-3-4:إصابة الجلد

تكون إصابة الجلد قليلة جدا في الاشخاص المثبتين وغير المثبتين مناعيا وحوالي 15% من الأشخاص المصابين بالإيدز يعانون من إصابات جلدية (Mitchell & Perfect ,1995) . الأعراض السريرية للإصابة الجلدية تكون بأشكال مختلفة كالفروخ ,البثور ,الحبوب والتهاب النسيج الخلوي والأورام السطحية (Baddley and Dismukes,2003) . يعد ظهور الإصابة الجلدية في الاشخاص المصابين بالإيدز دليلا على الشكل المنشر للخميرة في حين في الاشخاص غير المثبتين فتعد إصابة الجلد الموقع الوحيد لظهور الإصابة بالخميرة والذي ينتج من تماس الشخص بشكل مباشر مع الحمام (Sampaio *et al* .,1999) .



شكل(3): الاصابة الجلدية (King , 2013) .

Osteoarticular infection

5-3-2:الاصابة العظمية

تحدث اصابة الهيكل العظمي بالخميرة بمعدل اقل من 10% في الاشخاص المصابين بالسحايا (King,2001) . تلاحظ الاصابة العظمية من خلال انتفاخ الانسجة الرخوة وتكون العظام طرية وقابلة للكسر كما تتميز بانحلال العظم (Osteolysis) . تصيب الخميرة عظام الجمجمة والفقرات و الاضلاع و الحوض والمفاصل ، وقد تؤدي اصابة الفقرات بالخميرة الى ضغط الفقرات على الحبل الشوكي مسببة شلل نصفي (Zhou et al .,2013 ; Ramkillawan et al .,2013) .

كما تصيب الخميرة العديد من الأعضاء الأخرى للجسم حيث تنتقل الخميرة من الرئة كونها العضو الاول المستهدف من قبل الخميرة عن طريق الأوعية الدموية واللمفية لتصل الى الأعضاء الأخرى للجسم كالقلب مؤدية الى التهاب عضلة القلب (Myocarditis),الكلية مؤدية الى التهاب الكلية والحويضة (Pyelonephritis),البروستات التي تعمل كمخازن للخميرة مما يجعلها مسؤولة عن حالات انتكاس مرضى الايدز (King ,2001) , كما تصيب الخميرة الكبد ,الطحال والغدة الكظرية والدرقية والمرء (Chayakulkeeree and Perfect ,2006) .

Nanoparticles

4-2:الجزيئات النانوية

تعد التقنية المتناهية الصغر (Nanotechnology) مجالا علميا بحثيا واسعا يعنى بدراسة خصائص المواد عند مقياس اقل من 100 نانومتر ,حيث يستخدم النانومتر كوحدة لقياس الاشياء الصغيرة جدا التي لا ترى الا تحت المجهر الالكتروني والذي يساوي 10^9 من المتر, اذ تظهر جزيئات المواد عند ذلك المقياس خصائص غير عادية بحيث يكون من الممكن تصنيع المواد وتشكيلها للحصول على خصائص افضل من خصائص هذه المواد عندما تكون بقياسها الطبيعي (الاسكندراني, 2010). وفي السنوات الأخيرة كانت تقنية النانو هي واحدة من العلوم السريعة المتطورة جدا والتي ترتبط بعلاقة وثيقة جدا مع العلوم الأخرى ,مثل : الاحياء والكيمياء والفيزياء والهندسة , وغيرها من العلوم الأخرى (Islam and Miyazaki , 2009).

يمكننا تعريف الجزيئات النانوية (Nanoparticales) بانها تلك الفئة المتميزة من الجزيئات التي يمكن انتاجها بحيث تتراوح مقاييس ابعادها بين (1-100) نانومتر . وقد ادى صغر حجم هذه المواد الى ان تسلك سلوكا مغايرا للمواد التقليدية كبيرة الحجم والتي تزيد عن 100 نانومتر حيث تظهر صفات الكترونية ,مغناطيسية وبصرية تختلف عن المعادن الكبيرة الحجم (Nowack , 2010). وتعد المواد النانوية هي مواد بناء القرن الحادي والعشرين وأهم ركن من أركان تكنولوجيا هذا العصر وتختلف المواد النانوية من حيث المصدر بحسب بنيتها كان تكون عضوية أو لاعضوية و طبيعية أو مصنعة (الاسكندراني, 2010).

Silver nanopartical

2-5:جزيئات الفضة النانوية

جزيئات الفضة النانوية هي عبارة عن جزيئات رقيقة جدا من معدن الفضة والتي تمتلك على الاقل بعد واحد اقل من 100نانومتر (Tejamaya et al .,2012). الفضة النانوية هي لم تكتشف حاليا بل تم اكتشافها قبل حوالي 100 سنة (USFDA ,2010) , إذ كانت تستخدم في علاج الاصابات والامراض قبل اكتشاف البنسلين Penicillin في 1928 (Nano Health solutions , 2010).

تنتج جزيئات الفضة النانوية من تحويل معدن الفضة الى فضة ذات حجم نانوي والتي تكون ذات فعالية كبيرة جدا ضد الاصابات البكتيرية والفطرية والفيروسية وهذه الصفات الفريدة لجزيئات الفضة النانوية تعود لامتلاكها مساحة سطحية واسعة بالنسبة للحجم (Tolaymat et al .,2010) . وهناك عاملان يجعلان من جزيئات الفضة النانوية تسلك سلوكا مغايرا للمادة الاصلية هما الفعالية الكمية والسطحية هذه العوامل تؤثر على الصفات الكيميائية والميكانيكية والكهربائية والالكترونية والمغناطيسية للمواد (Roduner ,2006).

وتمتلك جزيئات الفضة النانوية العديد من التطبيقات الطبية ومنها :-

- 1: تستخدم في تغليف الأجهزة والأدوات الطبية التي تستخدم في مجالات الجراحة والتخدير وطب القلب والمسالك البولية (Wijnhoven et al., 2009).
- 2: تستخدم في مجال جراحة العظام ، مثل : اضافتها الى اسمنت العظام ، أو استخدامها في طلاء المفاصل والعظام الاصطناعية التي تستبدل مكان الطبيعية كما تضاف أيضا الى المواد المعقمة للمستشفيات والمنسوجات الطبية ، انابيب القسطرة وأجهزة منع الحمل (Tolaymat et al., 2010).
- 3: تستخدم في مجال طب الاسنان في صنع الأسنان الاصطناعية وكذلك تستخدم في تغليف العدسات اللاصقة وفي تحسين أداء بطارية الاجهزة الطبية التي تزرع في الجسم (Senjen, 2007 ; Wijnhoven et al., 2009).
- 4: تستخدم في تصوير الخلايا السرطانية وفي علاج التهاب الجلد وحب الشباب والتهاب القولون التقرحي (Boxall et al., 2007).
- 5: تضاف الى ضمادات الجروح وقد وجد الاطباء ان استخدام الضمادات المغلفة بالفضة النانوية لا تعمل على تثبيط نمو البكتريا او الفطريات فقط ، بل تعمل أيضا على شفاء الجروح بسرعة كبيرة ، كما ان هذه الضمادات صُممت أيضا حتى تحرر الفضة ببطء ، وهذا يعتمد على السوائل الموجودة في الجرح (Dirienzo, 2006).
- 6: تستخدم جزيئات الفضة النانوية كمضادات للبكتريا والفطريات بمدى واسع من التطبيقات تشمل: رذاذ الهواء المطهر والوسائد والجوارب والشامبو والصابون والمنظفات والكمادات والمناديل الرطبة ومعجون الاسنان ومرشحات الهواء وتغليف غرف التبريد والثلاجات والغسالات وحافظات تخزين الغذاء ، والهواتف الخلوية (Stensberg et al., 2011 ; Bennt et al., 2010).

2-6:الفعالية المضادة للفضة على الاحياء المجهرية The antimicrobial effect of silver nanoparticles on microorganisms

في الآونة الاخيرة وجد ان معظم الاصابات الفطرية تنتج من الفطريات الانتهازية وخاصة في الاشخاص اللذين يعانون من خلل في الجهاز المناعي (Jarvis et al., 2013) ، وكذلك في حالة الحمل و الاستخدام المفرط والعشوائي للمضادات الحيوية ، مثل : الستيرويدات القشرية و الإصابة بالأورام السرطانية والامراض المزمنة ، وغيرها من العوامل المهيئة الى هذا النوع من الإصابات (Slavin and Chen, 2012; Bratton et al., 2013).

العديد من هذه الفطريات تكون مقاومة للمضادات الفطرية كذلك الحال بالنسبة للبكتريا لذلك فان احد المشكلات التي كان يواجهها العلماء هي ان الانواع المختلفة من المضادات الفطرية المستخدمة في العلاج

تبقى لمدة محدودة و لأن الفطريات كائنات حقيقية النواة و تمتلك تركيب و أيضا مشابه لخلايا المضيف ، لذلك فان حاجة الطب كانت ملحة و محتومة لإيجاد مضادات ضد الأحياء المجهرية تعمل باليات غير مألوفة (Kanhed *et al.* , 2014).

لذلك تركزت الدراسات على جزيئات المعادن النانوية , لكن العلماء اعطوا اهتماما كبيرا لجزيئات الفضة النانوية و امكانية استخدامها كمضادات ضد الأحياء المجهرية (Kandile *et al.* , 2010) لامتلاك جزيئات الفضة النانوية فعالية تثبيطية قوية بالإضافة الى انها تعد من المضادات الواسعة الطيف ضد البكتريا , الفطريات و الفايروسات

(Saha *et al.* ; 2010 ; Saha *et al.* ; 2011) لأسباب عديدة واهم هذه الاسباب هو امتلاكها مساحة سطحية واسعة بالنسبة للحجم مما يزيد من ارتباطها مع الأحياء المجهرية وهذا يعد من أهم الأسباب التي تجعل جزيئات الفضة النانوية مثبطة لنمو الأحياء المجهرية (Tolaymat *et al.* , 2010) . أشار كل من (Kedziora and Sobik ,2013 ;Chaloupka *et al.* ,2010) ان الفعالية البايولوجية لهذه الجزيئات تعود لعدة أسباب وهي :-

1: قدرتها على التفاعل مع الجدار والغشاء الخلوي مما يؤدي الى تغير في النفاذية الخلوية وعدم السيطرة على نقل الفوسفات خلال الغشاء البلازمي , تحلل الغشاء البلازمي , فقد القوة الدافعة للبروتون و تثبيط تصنيع ATP .

2: تفاعلها مع الأحماض الأمينية وخاصة مجاميع الثايول (-SH group) وكذلك تثبيط فعالية الانزيم من خلال ارتباطها بالموقع الفعال للانزيم .

3: عرقلة سير الطاقة مما يؤثر على حركة الالكترونات في السلسلة التنفسية و تثبيط السايكروومات .

4: تفاعلها مع DNA و RNA يؤدي الى تحطيم الاواصر الهيدروجينية , تثبيط تصنيع القواعد النتروجينية , خلل في تصنيع DNA و RNA و مسخ الرايبوسوم و من ثم عدم تصنيع البروتين.

5: توليد انواع الاوكسجين التفاعلي reactive oxygen species الذي يؤدي الى تلف الخلايا عن طريق حدوث ضرر في البروتينات والدهون و الأحماض النووية .

ومن الدراسات التي أجريت على جزيئات الفضة النانوية هي الدراسة التي قام بها Kim *et al.* (2008) على تأثير Ag-NPs على الفطر الجلدي *Trichophyton mentagrophytes* و خميرة *Candida albicans* فوجد ان Ag-NPs قد تثبتت نمو الفطريات المذكورة أنفا بنسبة 80 % عند استخدامها بتركيز من (1-7 mg/ml) .

كما درس (2008) Lu *et al* . تأثير ال Ag-NPs بحجم يتراوح بين (10-50) nm على فايروس Hepatitis B virus (HBV) فوجد انها تعمل على تثبيط الفايروس من خلال تثبيطها لعملية تضاعف الفايروس عن طريق ارتباطها مع DNA الفايروس .

اشار (2009) Kim *et al* . ان تأثير Ag-NPs على الفطر الممرض للنبات *Raffaelea sp* الذي يسبب نسبة عالية من موت اشجار oak trees في كوريا , لا تؤثر فقط على الخيوط الفطرية للفطر وانما ايضا تثبتت عملية تكوين ابواغ الفطر .

كما قام (2009) Barma-Pinto *et al* . بدراسة تأثير ال Ag-NPs على فايروس Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) فوجد ان استخدام ال Ag-NPs بحجم 4nm يعمل على منع ارتباط الفايروس مع خلية المضيف .

ذكر (2010) Liu, ان Ag-NPs تعتبر من أفضل المضادات البكتيرية ضد بكتريا *E.coli* و *Staphylococcus aureus* .

كذلك درس (2011) Kim *et al* . تأثيرها على الانواع نفسها من البكتريا فوجد ان التركيز المثبط الأدنى MIC لكلا النوعين قد بلغ 100mg/ml .

وتناولت دراسة (2012) Thombre *et al* . فعالية Ag-NPs ضد ثلاثة انواع من البكتريا ونوعين من الفطريات فاتضح ان ال Ag-NPs تأثير كبير في تثبيط نمو كل من هذه البكتريا والفطريات اذ بلغ قطر منطقة التثبيط لكل من *E.coli* و *Bacillus subtilis* (20mm) و *S.aureus* (17 mm) ولفطر *Apergillus niger* (15mm) و *Pichia pastoris* (19mm) .

قام (2012) Gavanji *et al* . بدراسة تأثير Ag-NPs على نوعين من الفطر *Trichoderma* هما *T.harzianum* و *T.viride* فوجد ان نمو الفطر يقل بزيادة تركيز Ag-NPs ومدة التعرض لها .

ذكر (2013) Roy *et al* . ان Ag-NPs المصنعة من الفطر *A.foetidus* قد تثبتت نمو خمسة انواع تعود الى الفطر نفسه وكذلك فطر *Fusarium oxysporium* .

بينما اوضح (2013) Manivasagan *et al* . تأثير Ag-NPs على ستة انواع من البكتريا *E.coli* , *B.subtilis* , *S.aureus* , *Enterococcus hirae* , *Shigella flexneri* , *Pseudomonas aeruginosa* واربعة انواع من الفطريات *A.niger* , *A.fumigates* , *A.brasiliensis* , *C.albicans* فوجد ان استخدام Ag-NPs بتركيز 30mg/ml كان له تأثير مثبط قوي على بكتريا *B.subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* وكذلك خميرة *C.albicans* اكثر من بقية البكتريا والفطريات المذكورة آنفا وهذا يعود الى اختلاف ميكانيكيات عمل Ag-NPs وكذلك اختلاف ميكانيكيات المقاومة من كائن الى اخر .

بحث (2014) Singh and Vidyasagar , تأثير Ag-NPs على ثلاثة انواع من الفطريات الجلدية *Microsporum gypseum* , *Trichophyton rubrum* , *T. tonsurans* وثلاثة انواع من البكتريا *E. coli* , *S. aureus* , *B. subtilis* فوجد ان الفطريات الجلدية تكون اقل حساسية ل Ag-NPs مقارنة مع البكتريا اذ بلغ قطر منطقة التثبيط للفطريات الثلاثة 11,13,14 mm على التوالي في حين بلغ قطر منطقة التثبيط للبكتريا 18,20,22 mm على التوالي .

و درس (2014) Nithya and Ragunathan , تأثير Ag-NPs المصنعة من الفطر *A. niger* على أربعة انواع من البكتريا *E. coli* , *S. aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Bacillus sp* فوجد ان قطر منطقة التثبيط عند استخدام التركيز 10mg/ml قد بلغ 23,12,20,8 mm على التوالي في حين كان قطر منطقة التثبيط في التركيز 50mg/ml هو 25,16,28,14mm على التوالي .

حقق (2015) Singh et al . تأثير Ag-NPs في تثبيط نمو خمسة انواع من البكتريا *E. coli* الخمائر *C. albicans* فاتضح له ان Ag-NPs تمتلك فعالية عالية في تثبيط نمو البكتريا والخميرة المستخدمة في الدراسة .

3- المواد وطرائق العمل Materials & Methods

3-1: المواد والاجهزة المستخدمة

3-1-1: الاجهزة و المعدات :

جدول (1) الاجهزة والمعدات المختبرية المستخدمة في الدراسة .

المنشأ	الشركة المصنعة	أسم الجهاز	
England	Gallen Kaamp	Incubator	الحاضنة
England	Gallen Kaamp	Autoclave	الموعدة
Lebanon	Concord	Refrigerator	ثلاجة

Japan	Olympus	Compound light microscope	مجهر ضوئي مركب
India	Superestar	Slids	شرائح زجاجية
India	Superestar	Disposable Syringes	محاقن
England	Gallen Kaamp	Sensitive electronic balance	ميزان الكتروني حساس
Japan	Fisons	Distiller	جهاز التقطير
Germany	Memmert	Water bath	حمام مائي
Chnia	CYAN	Vortex	مازج
England	Shndon,scientific Co.LTD	Gel electrophoresis	جهاز الترحيل الكهربائي
Korea	Bioneer	PCR Thermocycler	جهاز الدوران الحراري
Germany	Memmert	UV-Spectrophotometer	مطياف الأشعة فوق البنفسجية
India	Superestar	Test tube	أنابيب اختبار
India	Superestar	Cover slids	أغطية شرائح زجاجية
England	Gallen Kaamp	Centrifuge	المنبذة
England	Gallen Kaamp	Hot plate with Magnetic stirrer	هيتز مع محرك مغناطيسي
Germany	Neubaur	Haemocytometer	جهاز عد الخلايا الدموية
USA	San .Gabriel	Ultra violel	باعث الأشعة فوق البنفسجية
Germany	Eppendorf	Cooling Centrifuge	منبذة مبردة
Chnia	Sailbran	Disposable Petri dishes	أطباق بتري بلاستيكية
India	Himedi	Standard wire loop (1m)	الناقل الزراعي القياسي

Japan	Sony	Digital camera	كاميرا رقمية
China	CYAN	Micropepitte 0.5-10 ml,10-100ml ,100-1000ml	ماصات دقيقة باحجام مختلفة
Korea	Bioneer	Exispin vortex centrifuge	جهاز الطرد المركزي الهزاز

2-1-3: المواد

1: المواد الكيميائية Chemical materials

جدول (2) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة .

المنشأ	الشركة المصنعة	المادة الكيميائية	
England	BDH	Glucose	كلوكوز
England	BDH	Sucrose	سكروز
England	BDH	Lactose	لاكتوز
England	BDH	Maltose	مالتوز
England	BDH	Dextrose	دكستروز
England	BDH	Formalin	فورمالين
England	BDH	Absolute ethanol	كحول اثيلي
England	BDH	Malt extract	خلاصة الشعير
USA	Nanoshell	Silver nanoparticl	الفضة النانوية
England	BDH	KH ₂ PO ₄	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
England	BDH	Sodium chloride	كلوريد الصوديوم
England	BDH	Creatinine	كرياتنين
England	BDH	Normal salin	المحلول الملحي

			الفسلجي
Canada	Biobasic	Agarose	أكاروز
Canada	Biobasic	Isopropanol	الأيذوبروبانول
Canada	Biobasic	TBE buffer	بفر TBE
Canada	Biobasic	Free nuclease water	ماء خاص لل PCR
Canada	Biobasic	Ladder 100 bp	اللاذر
Canada	Biobasic	Pepton	ببتون
Canada	Biobasic	Yeast extract	خلاصة خميرة
Canada	Biobasic	Agar	أكار
England	BDH	AgNO ₃	نترات الفضة

2:الصبغات Stains

جدول (3) الصبغات المستخدمة في الدراسة .

المنشأ	الشركة المصنعة	الصبغة	
England	Gallen Kaamp	India Ink	الحبر الهندي
England	Gallen Kaamp	Cotton blue	ازرق القطن
Canada	Biobasic	Ethidium bromide	بروميد الايثديوم
Canada	Biobasic	Loding dye	صبغة التحميل
Korea	Riedle	PAS stain	صبغة PAS
England	Gallen Kaamp	Bromothymol blue	بروموثايمول

3:
المضاد
ات
الحيوي
ة
Anti
bioti
c

جدول
(4)
المضادا

ت المستخدمة في الدراسة .

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم المضاد	
India	Haryana	Chloramphenicol	الكلورمفنيكول
Istanbul	Maslak	Amphotersin B	الأمفوتيرسين B
India	Haryana	Hydrocortisone	الهيدروكورتزون

4:العدة Kits

جدول (5) العدة المستخدمة في الدراسة .

الشركة المصنعة ومنشأها	مكوناتها	أسم العدة
Biobasic /Canada	Universal Digestion Buffer	عدة استخلاص الحمض النووي الخميري EZ-10 Column Yeast Genomic DNA Purification Kit
	Universal Buffer PY	
	Universal Buffer BD	
	Universal PW Solution	
	Universal Wash solution	
	CE Buffer (pH 9.0)	
	Proteinase K	
	Snailase Reaction Buffer	
	Snailase Storage Buffer	
	Snailase	
	EZ-10 Spin Column	

	2ml Collection Tube	
Bioneer /Korea	TOP DNA polymerase	عدة فحص Accupower R PCR PerMIX
	dNTP(dATP , dCTP ,dGTP ,dTTP)	
	Tris-HCL(pH 9.0),KCL,MgCl ₂	
	Stabilizer and Tracking dye	

5:البادئات Primers

تم استخدام البادئات الخاصة بجين (ribosomal RNA gene ITS region) الخاص بتشخيص خميرة *Cryptococcus neoformans* إذ تم تصميم البادئات في هذه الدراسة من موقع بنك الجينات NCBI Genbank وباستخدام برنامج Primer 3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص ال PCR وتم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية .

جدول (6) البادئات التي استخدمت في الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي ونتائج فحص ال PCR

المصدر	حجم الناتج bp	تسلسل القواعد النروجينية (5'-3')	أسم البادئ
صمم في هذه الدراسة	502BP	F TTG CCG CGA CCT GCA AAG	ITS-1
		R CCT CAC GGT ACT TGT TCG CT	

F:البادئ الامامي R:البادئ العكسي

2-3:طرائق العمل Methods

1-2-3:الأوساط الزرعية والمحاليل :

1-1-2-3:تحضير الأوساط الزرعية :

استخدمت العديد من الأوساط الزرعية في تنمية مزارع الخميرة وعزلها وتشخيصها وحفظها وقد تم تحضير كل منها بحسب تعليمات الشركات المنتجة لها وهذه الأوساط شملت ما يأتي :

1: وسط السابرويد دكستروز أكار Sabouraud s Dextrose Agar

أستخدم في عزل الخميرة وتشخيصها وتنقيتها (Odds,1991), ويتكون من :-

65 غم	Sabouraud s Dextrose Agar	سابرويد دكستروز أكار
1000 مل	Distilled water	ماء مقطر

2: وسط نقيع القلب والدماغ Brain –Heart-Infusion Agar

أستخدم لعزل الخميرة وكذلك لزيادة حيوية العزلات قبل استخدامها في التجارب (Vall et al ,1999), ويتكون من :-

37 غم	Brain heart infusion	نقيع القلب والدماغ
20 غم	Agar	أكار
1000 مل	Distilled water	ماء مقطر

3: وسط تخمر السكريات السائل Fermentation Broth Media

أستخدم لاختبار قدرة الخميرة على تخمر السكريات (Kreger-Van ,1984), ويتكون من :-

10 غم	Pepton	ببتون
5 غم	Nacl	كلوريد الصوديوم
5 غم	Yeast extract	خلاصة خميرة
0.2 غم	Bromothymol blue	بروموثايمول
1000 مل	Distilled water	ماء مقطر

4: وسط اكار البطاطا Potato dextrose agar

أستخدم لتنمية الفطر *Fusarium oxysporum*, حضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة .

5: وسط ستيب اكار Staib agar

أستخدم الوسط لتشخيص الخميرة وعزلها (Staib *et al*, 1987), ويتكون من :-

50 غم	Niger seed	البذور السوداء
1 غم	Glucose	كلوكوز
1 غم	Creatinine	كرياتنين
1 غم	KH ₂ PO ₄	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
15 غم	Agar	أكار
1000 مل	Distilled water	ماء مقطر

6: وسط أزهار الداودي Chrysanthemum flower agar

أستخدم الوسط لعزل الخميرة وتشخيصها, حضر في هذه الدراسة ويتكون من :-

50 غم	Chrysanthemum flower	ازهار الداودي
15 غم	Agar	أكار
1000 مل	Distilled water	ماء مقطر

7: وسط أوراق الداودي Chrysanthemum leaves agar

أستخدم الوسط لعزل الخميرة وتشخيصها, حضر في هذه الدراسة ويتكون من :-

50 غم	Chrysanthemum leaves	أوراق الداودي
15 غم	Agar	أكار
1000 مل	Distilled water	ماء مقطر

8: مرق اليوريا Urea Broth

أستخدم في اختبار اليوريا السريع (Rapid Urease test) , حضر بحسب تعليمات الشركة .

9:أ كار اليوريا Urea agar

أستخدم الوسط للتحري عن قدرة الخميرة على إنتاج إنزيم اليوريز , حضر بحسب تعليمات الشركة .

3-2-1-2:تحضير المحاليل والكواشف

1:محلول صبغة البروموثايمول الزرقاء Bromothymol blue solution

أستخدم هذا المحلول لغرض تصبيغ الخميرة لأجراء الفحص المجهرى ,حضر بحسب طريقة (McGinnis,1980) ,ويتكون من :

0.2 غم	Bromothymol blue	مسحوق الصبغة
5 مل	NaoH	هيدروكسيد الصوديوم
95 مل	Distilled water	ماء مقطر

2:محلول صبغة ألاكثوفينول الزرقاء Lactophenol methylene blue

استخدمت لصبغ الخميرة لفحصها بالمجهر ,حضرت بحسب طريقة (Ellis,1994) ,وتتكون من :

20 غم	Phenol crystals	بلورات الفينول
20 مل	Lactic acid	حامض اللبنيك
40 مل	Glycerol	كليسول
20 مل	Distilled water	ماء مقطر

3:صبغة Periodic acid –schift stain

استخدمت لصبغ المقاطع النسيجية وحضرت حسب طريقة (Mc Ginnis ,1980) ,وتتكون من :

1- Periodic acid solution

50 غم	Periodic acid	الحامض الدوري
100 مل	Distilled water	ماء مقطر

2- Basic fuchsin solution

0.1 غم	Basic fuchsin	الفوكسين القاعدي
5 مل	Ethanol absolute	ايثانول مطلق
95 مل	Distilled water	ماء مقطر

3- Sodium metabisulfate solution

1 غم	Sodium metabisulfate	ثنائي كبريتات الصوديوم الفوقية
10 مل	Hydrochloric acid (1N)	حامض الهيدروكلوريك
190 مل	Distilled water	ماء مقطر

4: تحضير مضاد الامفوتيرسين B (Preparation of amphotericin B)

اعتمدت طريقة McGinnis,(1980) لتحضير المضاد الفطري الامفوتيرسين B التي تضمنت ما يأتي :

وضع 5 مل من الماء المقطر المعقم في قنينة زجاجية محكمة الغلق (Vial) ثم اضيف اليها 50 ملغم من المضاد الفطري ثم رج المحلول بقوة وترك المحلول في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة قبل الاستخدام واعتبر هو المحلول الاصلي بتركيز 10.000 مايكروغرام/مل .

5:تحضير التراكيز المختلفة للفضة النانوية Preparation of silver nanoparticles concentration

تم تحضير التراكيز المختلفة للفضة النانوية باستخدام الماء المقطر المعقم , إذ أذيب (2,4,6) ملغم من الفضة النانوية في 100مل من الماء المقطر لتحضير التراكيز (2%,4%,6%) على التوالي .

3-2-2: جمع العينات

جمعت (420) عينة سريرية ,شملت (350) عينة قشع من الاشخاص الذين يعانون من امراض تنفسية , (7) عينات من سائل النخاع الشوكي , (51) عينة حروق و(12) عينة من الغسيل القصي من الأشخاص المراجعين والراقدين في كل من مستشفى الأطفال والولادة التعليمي ومستشفى الديوانية التعليمي ،

والعيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية وخلال المدة من 1/10/2014 الى 1/4/2015 إذ تم اخذ العينات بطرائق معقمة ثم نقلت الى المختبر لإجراء الاختبارات اللازمة عليها .

3-3:العزل Isolation

خطت العينات على سطح الأوساط الزرع الخاصة بالخميرة باستخدام الناقل loop وبواقع ثلاثة مكررات لكل عينة وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة ثلاثة أيام وبعد ظهور النمو تم إجراء الاختبارات اللازمة لعملية التنقية والتشخيص .

3-4:ادامة العزلات Isolates of maintenance

تمت إدامة العزلات عن طريق ترميتها على مرق نقيع القلب والدماغ (BHIB) بعد حضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة يومين وحفظت العزلات في الثلاجة لحين الاستعمال , ولأجل حفظ العزلات لمدة طويلة زرعت الخميرة على وسط BHIB وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة يوم واحد ثم اضيف اليها الكليسرول وبعدها حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° (NCCLS,2003) .

3-5:تشخيص الخميرة *Cryptococcus neoformans* identification

استخدمت العديد من الطرق لتشخيص الخميرة ومنها :

3-5-1:- الفحص المجهرى Microscopic examination

وذلك بإضافة قطرة من الحبر الهندي (Indian ink) او صبغة اللاكتوفينول الزرقاء إلى قطرة من عالق الخميرة الموجود على شريحة زجاجية نظيفة ، بعدها تم الفحص تحت المجهر لملاحظة وجود المحفظة من عدمه ، أستعمل هذا الفحص لتمييز خميرة *C.neoformans* عن الخمائر الأخرى التي لا تستطيع تكوين المحفظة (Rippon,1988).

3-5-2:- النمو على وسط ستيب أكار Growth on Staib agar

خطت الخميرة النامية على سطح الوسط وحضنت بدرجة حرارة 37 م° و تمت متابعة صفات نمو الخميرة على هذا الوسط وهي تغير لونها الى اللون البني , أستخدم هذا الوسط لتشخيص الخميرة (*Staib et al* ,1987).

3-5-3: النمو على وسط أوراق وأزهار الداودي

خطت الخميرة النامية على سطح وسط كل من أوراق وأزهار الداودي المحضر في هذه الدراسة وحضنت بدرجة حرارة 37 م° وتمت متابعة صفات نمو الخميرة على هذا الوسط وهي تغير لونها الى اللون البني , استخدم هذا الوسط لتشخيص الخميرة .

3-5-4:الاختبارات البايوكيميائية Biochemical test

3-5-4-1: اختبار تخمر السكريات Sugars fermentation test

تم هذا الاختبار بحسب طريقة (Robert, 1990) وكما يأتي :

حضر الوسط من ماء البيتون وأضيف إليه 2% من السكريات (كلوكوز , سكروز , دكستروز , مالتوز , لاكتوز) و 0.5 % من خلاصة الخميرة ثم أضيفت إليه صبغة البروموثايمول الزرقاء كدليل على تغير اللون , صب الوسط في أنابيب اختبار بواقع 5 مل وبعدها تركت الأنابيب بوضع مائل لتتصلب بعدها خطت العينات على سطحها وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة ثلاثة أيام , تمثلت النتيجة الموجبة بتغير لون صبغة البروموثايمول من اللون الأخضر الى اللون الأصفر .

3-5-4-2:-فحص اليوريز Urase test

اجري هذا الاختبار للتحري عن قدرة الخميرة على إنتاج إنزيم اليوريز وبحسب طريقة Phadhy (and Ajello, 1977) والتي تشمل ما يأتي :-

نقل جزء من الخميرة من مزرعة بعمر ثلاثة أيام الى أنابيب اختبار حاوية على أكار اليوريا وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة ثلاثة أيام , التحلل الكلي لليوريا سوف يغير لون الوسط من الأصفر الى الأحمر الأرجواني في حين أن التحلل الجزئي سوف يتغير الى اللون الوردي او البرتقالي اما عدم قدرة الخميرة على تحلل اليوريا سوف يبق لون الوسط أصفر .

3-5-5:طريقة التشخيص باستخدام فحص PCR

تم إجراء فحص PCR وذلك لتحري عن خميرة *Cryptococcus neoformans* وذلك باستخدام البادئات الخاصة بجين ال ribosomal RNA gene الخاصة بتشخيص الخميرة , و يتكون الفحص من عدة خطوات:

1: استخلاص الحامض النووي من الخميرة Yeast DNA extraction

أستخلص الحامض النووي DNA للخميرة المختبرة باستعمال عدة خاصة لهذا الغرض هي عدة البايونير (Bioneer Kit) وبأتباع الخطوات الآتية وبحسب تعليمات الشركة المصنعة :-

1: تم تنشيط الخميرة المختبرة على الوسط الزراعي الصلب SDA, ثم جمعت مستعمرات الخميرة ونقل حوالي 200 ملغم من مستعمرات النمو الخميري الى حاوية خزفية معقمة وباستخدام النايتروجين السائل, أذ تم سحق مستعمرات الخميرة بواسطة مطرقة خاصة وذلك لتحطيم الجدار الخلوي لخلايا الخميرة والحصول على الحامض النووي بسهولة ومن ثم نقلت الى أنابيب معقمة سعة 1.5ml .

2 : أضيف 180 مايكروليتر من محلول (Universal Digestion Buffer) و 20 مايكروليتر من أنزيم Proteinase K الى كل انبوبة و مزجت باستخدام المازج و حضنت بدرجة حرارة 56°C لمدة 30-60 دقيقة.

3 :أضيف للأنابيب 100 مايكروليتر من محلول (Universal Buffer PF) و مزجت بالتقليب وحضنت بدرجة حرارة 20°C- لمدة 5 دقائق.

4:نبذ المزيج بسرعة 12000 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ونقل الطافي والذي يحتوي على الاحماض النووية الى أنبوبة جديدة سعة 1.5 مل .

5: أضيف 200 مايكروليتر من محلول (Universal Buffer BD) للمزيج و مزج بالمازج ,ثم تم التخلص من الراسب والحاوي على بقايا من حطام الخلايا والأنزيمات .

6 :أضيف 200 مايكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق 96% Absolute ethanol الى المزيج المتحلل و مزج بالمازج.

7: تم نقل المزيج الى أنابيب خاصة حاوية على مرشحات لتنقية الحامض النووي المجهزة مع العدة -EZ (10 tube) موضوعة داخل أنابيب جامعة سعة (2ml tube collection) ومن ثم نبذت بسرعة 12000 دورة /دقيقة لمدة دقيقة واحدة ,ومن ثم تم التخلص من الراشح المترسب ونقل أنبوبة الترشيح الحاوية على الحامض النووي الى أنبوبة اختبار أخرى.

8:أضيف 500 مايكروليتر من محلول (Universal PW Solution) الى الأنبوبة و نبذت بسرعة 12000 دورة /دقيقة لمدة دقيقة واحدة ونقل أنبوب الترشيح الى أنبوبة جمع جديدة .

9: أضيف 500 مايكروليتر من محلول (Universal Wash Solution) الى الأنبوبة الجديدة ونبذت بسرعة 12000 دورة /دقيقة لمدة دقيقة واحدة ونقل أنبوب الترشيح الى أنبوبة جمع جديدة ونبذت بالسرعة نفسها لمدة دقيقتين لتجفيف غشاء ال (EZ-10 tube) ونقل الأخير الى أنبوبة جديدة سعة 1.5 مل .

10: أضيف 50-100 مايكروليتر من محلول (TE Buffer) مباشرة الى مركز غشاء ال (EZ-10 tube) وحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة بعدها نبذ بسرعة 12000 دورة /دقيقة لمدة دقيقة واحدة لتركيز الحامض النووي ,وحفظ في الثلجة في درجة حرارة 20- م° تحت الصفر لحين الاستعمال في فحص الPCR.

PCR master mix	Volume
DNA template	5µL
Master mix	5µL
Forward primer	1.5µl
Reverse primer	1.5µl
Free nucleas water	12µL
Total	25µL

الحامض
المستخلص

2:مضاعفة
النووي

Amplification DNA

تم تحضير مزيج تفاعل PCR باستخدام عدة ال (Accupower ® PCR PerMIX) المجهزة من قبل شركة ال Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة .
جدول (7) مكونات مزيج تفاعل ال PCR وحجمه

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل PCR التي ذكرت في الجدول المذكورة أنفا في أنابيب حجم 20 مل خاصة بعدة فحص ال PCR Accupower ® TLA PCR PreMix tube والحاوي على بقية مكونات تفاعل ال PCR ثم مزجت المكونات جيدا بالمازج ومن ثم وضعت هذه الأنابيب في جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل PCR لإجراء عملية تضخيم DNA على وفق الظروف المثالية للدورات الحرارية المبينة في الجدول ادناه والمتمثلة بعمليات فصل شريط DNA (Denaturation) وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل (Annealing) و تطويل سلسلة DNA (Extension) .

جدول (8) برنامج الدورات الحرارية لتفاعل ال PCR

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	5sec.
Annealing		58C	30sec
Extension		72C	45sec
Final extension	1	72C	7min
Hold	-	4C	Forever

(2001) Russell لتحضير جل الأكاروز (Agarose Gel) بنسبة 1% وذلك لقراءة نتيجة ال PCR وكما يأتي :

1: تم إذابة 1 غم من مسحوق الأكاروز في 100مل من محلول (1X TBE Buffer) وسخن المزيج حتى الغليان باستخدام المسخن الحراري لمدة 5 دقائق .

2: ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 م ° وبعدها تم إضافة 3 مايكروليتر من الصبغة المشعة (Ethidium bromide) ومزجت جيدا مع الهلام .

3: تم صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على مشط (Comb) وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية .

4: تم عملية تحميل العينات في الحفر ووضع سلم القياس (DNA ladder) في الحفرة الاولى لقياس ناتج PCR .

5: بعد اكتمال التحميل تم غمر هلام الاكاروز باستخدام محلول TBE Buffer بتركيز 1x وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 100 فولت وامبير 80 لمدة ساعة واحدة .

6: بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجية UV light source لتحديد الناتج بالمقارنة مع السلم القياسي .بعدها تم تصوير الناتج باستخدام كاميرا رقمية لملاحظة حزم ال DNA التي ظهرت بشكل حزم براقية باللون .

3-6: اختبار تأثير جزيئات الفضة النانوية والمضاد الفطري على الخميرة مختبريا:

أجري هذا الاختبار بحسب طريقة (Rakholiya & Chanda, 2012) كما يأتي :-

- 1- تم تحضير تراكيز الفضة (2%، 4%، 6%) ملغم/مل والمضاد الفطري كما ذكر في 5 من الفقرة 3-2-1، ثم وضعت فيها أقراص من أوراق الترشيح قطرها 5مليمتر والتي عقت مسبقا بالمؤصدة.
- 2- حضر عالق فطري بتركيز (6×10^6) خلية/مل ثم نقل منه 0.1 مل الى سطح SDA ونشر باستخدام الناقل ثم تركت الأطباق ليحفظ العالق .
- 3- نقلت أوراق الترشيح باستخدام ملقط معقم ووضعت على سطح الأطباق المزروعة وبواقع خمس أقراص في كل طبق وبثلاثة مكررات لكل تركيز ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة أسبوع وبعدها تم قياس قطر التثبيط لكل تركيز.

7-3:تقييم السمية الخلوية لجزيئات الفضة النانوية

تم استخدام كريات الدم الحمر للإنسان لحساب السمية الخلوية لجزيئات الفضة النانوية وحسب طريقة (1994) Xian-guo and Urasella, وكما يأتي :

تم سحب 2 مل من الدم ووضع في أنبوبة حاوية على مادة مانعة للتخثر (EDTA) وحضر تركيز 6 ملغم/مل من الفضة النانوية مع المحلول الفسيولوجي , وأستخدم كعامل سيطرة سالب محلول الملح الفسيولوجي فقط في حين أستخدم ماء الحنفية كعامل سيطرة موجب ,ثم تم أخذ 0.8 مل من محلول الفضة النانوية وأضيف الى أنبوبة اختبار معقمة تحتوي على 0.2 مل من كريات الدم الحمر ليصبح الحجم الكلي 1مل ,بعدها حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م° ولمدة ثلاث ساعات وتم مراقبتها كل ساعة لملاحظة تحلل كريات الدم الحمر (Hemolysis) وبعدها سجلت النتائج .

Infectivity of animal lab

8-3:إصابة الحيوانات المختبرية

1-8-3:تحضير عالق الخميرة

تمت تنمية الخميرة على وسط SDA وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة ثلاثة أيام ,بعدها حصدت الخميرة باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي بعدها غسلت خلايا الخميرة مرتين بالمحلول الملحي ثم خفف العالق بنفس المحلول وضبط الى التركيز النهائي (6×10^6) خلية / مل باستعمال جهاز عد الخلايا Haemocytometer (الكعبي, 2009) .

2-8-3:تصميم التجربة Experimental design

استخدمت في هذه التجربة 18 من اناث الجرذان البيض Females Albino Rat من سلالة *Rattus rattus* تم الحصول عليها من البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري –جامعة القادسية وبأعمار وأوزان متقاربة تراوحت بين (240-350) غم ووضعت في أقفاص لدائنيه وبواقع ستة جرذان في كل قفص

كما تمت تهيئة الظروف الملائمة لها من تغذية واضاءة وتهوية طيلة مدة التجربة التي استمرت لمدة 60 يوم , وقد تم تقسيمها الى ثلاثة مجاميع وكما يأتي :

المجموعة الاولى :استخدم فيها ست جرذان حقنت في غشاء الخلب ب 0.5 مل من المحلول الفسيولوجي واستخدمت كمجموعة سيطرة سالبة .

المجموعة الثانية :استخدم فيها ست جرذان حقنت في غشاء الخلب ب0.5 مل من عالق الخميرة بتركيز (6×10^6) خلية /مل واستخدمت كمجموعة سيطرة موجبة .

المجموعة الثالثة :استخدم فيها ست جرذان ثبتت مناعتها باستخدام عقار الهيدروكورتزون (Hydrocortisone) اذ حقنت الجرذان بغشاء الخلب ب0.5 مل من الهيدروكورتزون وبجرعة 129 ملغم /كغم قبل الحقن ب2,4 ايام وفي يوم الحقن وبعد الحقن ب3,5 ايام (ناجي واخرون 2006,) وحقنت بغشاء الخلب ب0.5 مل من عالق الخميرة .

ثم تم قتل جرذ واحد من كل مجموعة في اليوم 15 و 30 و60 من التجربة بعد ظهور التغيرات المظهرية والسلوكية للحيوانات التي تمثلت بفقدان الشهية وكثرة الحركة داخل القفص , للتأكد من إصابة الجرذان بالفطر ,وبعد التأكد من إصابة الجرذان بدأت عملية معالجتها التي استمرت لمدة 21 يوم , اذ قسمت المجموعتان 3,2 كل منهما الى مجموعتين احدهما تم معالجتها باستخدام جزيئات الفضة النانوية بتركيز 6 ملغم /مل و الأخرى تم معالجتها باستخدام المضاد الفطري الامفوتيرسين B وبكمية 0.25 مل عن طريق الشرب بالأنبوبة المعدية Stomach tube التي توضع في الفم مباشرة وبواقع جرعة واحدة كل يوم (ابن القيم الجوزية ,2004) .

Pathological test

9-3:اختبارات الامراضية

تم تشريح الحيوانات تحت ظروف معقمة وبحسب الاوقات المحددة بعد (15,30,60) يوم من الحقن للحصول على الأعضاء الآتية : (الرئة والدماغ) ووضعت كل منها على حدة في اطباق معقمة حاوية على المحلول الملحي الفسيولوجي ثم ازيلت منها القطع الدهنية والانسجة الرابطة من حولها ,غسلت الأعضاء عدة مرات باستخدام محقنة بلاستيكية بعدها حددت الإصابة التجريبية في الجرذان بعدة طرق منها :

1:عزل الخميرة من الأعضاء المختارة

تم الكشف عن الخميرة في الأعضاء المختارة وذلك بسحق جزء صغير من كل عضو جيدا (كل عضو على حدة) بوجود المحلول الفسيولوجي ثم تم نشر مقدار 0.5 مل على سطح وسط SDA و BHIA

وبواقع ثلاثة مكررات لكل عضو وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة أسبوع بعدها خضعت المستعمرات النامية على سطح الأوساط الى الفحوصات التأكيديّة الخاصة بالخميرة .

2: الدراسة النسيجية Histological study

اجري التقطيع النسيجي لنماذج مأخوذة من بعض أعضاء الحيوانات المستخدمة (الرئة والدماغ) في التجارب واعتمدت على طريقة (Allen and Cameron ,2004) وكما يأتي :

1:التثبيت Fixation :

ثبتت العينات في محلول الفور مالين 10% والمحضر من إضافة 10مل من الفور مالين 40% الى 90 مل من الماء المقطر ولمدة 24 ساعة .

2: الغسل Washing:

غسلت العينات بواسطة الماء لمدة ساعتين وبدل الماء كل ربع ساعة ليتم التخلص من محلول التثبيت الزائد .

3: الأنكاز Dehydration :

اجريت عملية الأنكاز بواسطة استخدام سلسلة تصاعديّة التراكيز من الكحول الأثيلي ethyl alcohol وكالاتي :70% , 80% , 90% , 95% , 100% ولمدة ساعة ونصف لكل تركيز .

4: الترويق Clearing :

روقت العينات للتخلص من الكحول الأثيلي المتبقي في النسيج بسبب عملية الانكاز فضلا عن جعل النسيج اكثر شفافية وكذلك لإزالة الدهون غير المرغوب فيها واستخدام الزايلين xylene كمروك في هذه العملية مرتين ولمدة ساعة ونصف في كل مرة .

5:التشريب Infiltration :

اجريت عملية التشريب من أجل تشبع النسيج تماما بشمع البرافين الذائب بدرجة حرارة 55-60 م° وملئ الفراغات الموجودة فيه بأكملها وأجريت العملية لمرحلتين وبواقع ساعة ونصف لكل مرحلة .

6:الطمر Embedding :

طمرت العينات في قوالب حديدية خاصة إذ° وضعت القوالب على ارض مستوية لصب قوالب الشمع مع مراعاة تعليم القوالب labeled واتجاه العينة وتركت القوالب الشمعية في التجميد لمدة 24 ساعة لكي تتصلب قبل البدء بعملية التقطيع .

7:التقطيع Sectioning :

قطعت القوالب بواسطة جهاز المشراح الدوار rotary microtome وبسمك 5 مايكرومتر وذلك لغرض تحضير المقاطع النسيجية بعدها وضعت المقاطع النسيجية في حمام مائي بدرجة حرارة 50 م° لغرض مجانسة المقاطع وازالة التجمعات والانثناءات الناتجة من التقطيع بعد ذلك حملت المقاطع على شرائح

زجاجية slides تم طلاؤها بمسحة خفيفة من مادة الالبومين ماير Meyers albumin للصقها وتركت بعدها في الفرن بصورة عمودية لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 15 م° لغرض ازالة الشمع وبذلك أصبح النسيج جاهزا لعملية الصبغ .

8:التصبغ Staining :

لأجراء عملية التصبغ تم وضع الشرائح في الزايلين لمدة دقيقتين ثم مررت بسلسلة تنازلية من الكحول الايثيلي (100%,95%,90%,80%,70%) ولمدة دقيقتين في كل تركيز وبعدها تم تصبيغها بصبغة PAS لمدة دقيقتين ثم غسلت بماء الحنفية وبعدها مررت بسلسلة تصاعدية من الكحول الايثيلي (70%,80%,90%,95%,100%) لمدة دقيقتين ثم وضعت في الزايلين لمدة دقيقتين .

9:التحميل Mounting :

بعد الانتهاء من عملية التصبغ وضعت مادة DPX على الشريحة الزجاجية ووضع فوقها غطاء زجاجي رقيق لحماية الشرائح من الجفاف والتقليل من أكسدة الصبغة وبذلك اصبحت المقاطع النسيجية جاهزة للفحص المجهرى, إذ صور الشرائح باستخدام المجهر المركب نوع (Lw scientific – USA) والمزود بكامرة رقمية وعلى قوة تكبير مختلفة لملاحظة التغيرات النسيجية المرضية .Histopathological changes

10-3 :التصنيع الحيوي لجزيئات الفضة النانوية باستخدام الفطر *Fusarium oxysporum*

تم تصنيع Ag-NPs من الفطر *Fusarium oxysporum* حسب طريقة (Ishida et al .,2014) وكما يأتي :

1- تم الحصول على الفطر *Fusarium oxysporum* من مختبر الدراسات العليا في كلية العلوم جامعة القادسية .

2 – تم تنمية الفطر *Fusarium oxysporum* على وسط PDA مضاف اليه 2 % من خلاصة الشعير malt extract و 0.5 % من خلاصة الخميرة yeast extract لمدة اسبوع بدرجة حرارة 28 م° .

3 –تم جمع الكتلة الحيوية Biomass للفطر وغسلت ثلاث مرات بالماء المقطر باستخدام المنبذة .

4- تم وزن 10 غم من الكتلة الحيوية للفطر ثم وضعت في ورق مخروطي يحتوي على 100 مل من الماء المقطر وحضنت لمدة 72 ساعة بدرجة حرارة 28 م° مع الرج .

5 – تم ترشيح العالق باستخدام اوراق الترشيح للتخلص من الكتلة الحيوية للفطر .

6 - تم إضافة 1mM من نترات الفضة $AgNO_3$ الى الراشح ثم حضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 60 يوم وتحت ظروف مظلمة . ومن ثم تم الكشف عن تكوين جزيئات الفضة النانوية باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية .

11-3: التحليل الاحصائي Statistical analysis

حللت البيانات احصائيا باستخدام برنامج التحليل الاحصائي (SPSS) نسخة 20 لجدول تحليل التباين (One Way ANOVA) باتجاه واحد , وقورنت المتوسطات والخطأ القياسي (Std.error) والتباين المعنوي باستخدام اختبار اقل فرق معنوي (LSD) Least significant difference عند مستوى احتمالية (McDonald,2009) ($P \leq 0.05$) .

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4:العزل Isolation

تم في هذه الدراسة عزل خميرة *Cryptococcus neoformans* من العينات السريرية بالاعتماد على الصفات الزرعية ، المجهرية ، البايوكيميائية والجزيئية, فمن مجموع 420 عينة التي تضمنت 350(83.33%) قشع , (12.14%) 51 حروق , (2.85%) 12 غسيل قصبي و7 عينات من سائل النخاع الشوكي وجدت الخميرة في (7.14%) 30 عينة فقط التي تضمنت (6.57%) 23 قشع , (5.88%) 3 حروق , (8.33%) 1 غسيل قصبي و(42.58%) 3 CSF , وتشير النتائج ان الخميرة وجدت بنسبة أكبر في عينات CSF مقارنة مع الأنواع الأخرى من العينات كما موضح في الجدول 9 , ويعود السبب في ذلك لأحتواء الدماغ على مركبات الكاتيكلولامينات المشجعة لنمو الخميرة وتكاثرها , وتتفق هذه النتائج مع

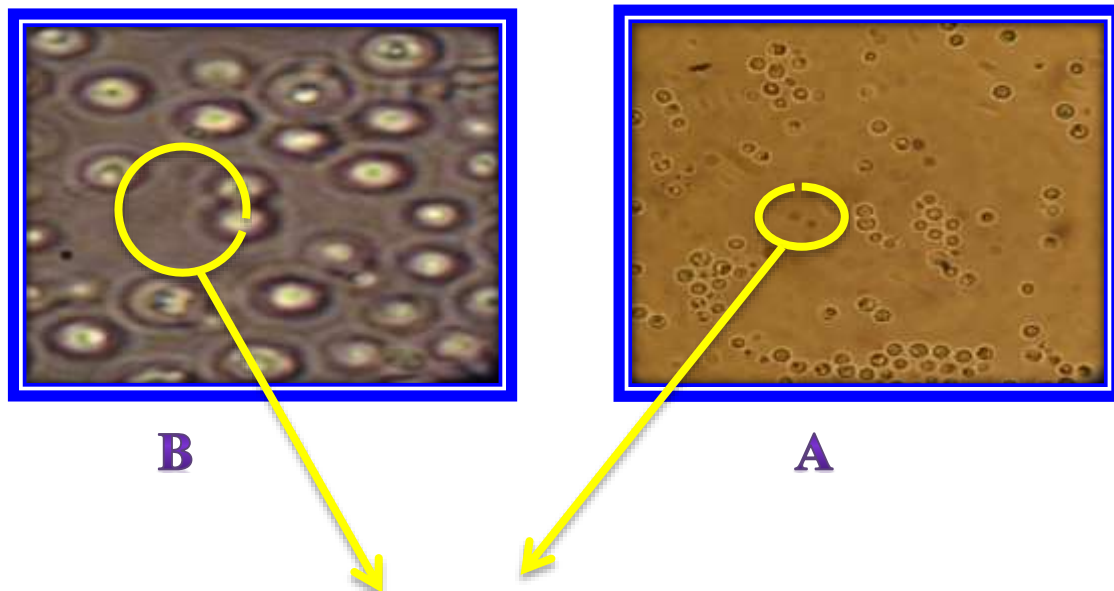
ماوجده (2014) , Lungran *et al* , (2012) ; Hagen *et al* . إذً اظهرت نتائج دراستهم ان عينات CSF تحتوي على النسبة الأكبر من الخميرة مقارنة مع الأنواع الأخرى من العينات .

جدول (9) عدد ونسبة العينات الموجبة للخميرة في العينات السريرية

عدد العينات الموجبة للخميرة		عدد العينات		نوع العينة
النسبة المئوية %	العدد	%	العدد	
6.57	23	83.33	350	قشع
5.88	3	12.14	51	حروق
8.33	1	2.85	12	غسيل قصيبي
42.58	3	1.66	7	CSF
63.36	30	99.98	420	المجموع

:2-4
التشخي
ص
Diagno
sis
-2-4
:1 الفح
ص
المجهري
Microsc
opic
examination

أظهرت نتائج الفحص المجهري للشريحة المحضرة من مستعمرات خميرة *C.neoformans* باستعمال صبغة اللاكتوفينول الزرقاء بان الخميرة ذات شكل كروي حاوية على برعم مفرد , اما عند استخدام الحبر الهندي فقد كانت خلايا الخميرة كروية متبرعمة ومحاطة بهالة (موجبة لتكوين المحفظة) , وكما في الشكل (A,B,C) 4 على التوالي , وهذه النتائج تتفق مع Sharma *et al* .,2014 ; Pal *et al* ., 2015 . ()





C

شكل (4): خلايا *C. neoformans* : A : المصبوغة بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء تحت قوة تكبير 10X , B : المصبوغة بالحبر الهندي تحت قوة تكبير 40X , C : خلية خميرة مكبرة حيث تظهر متبرعمة ومحاطة بهالة شفافة (الكبسولة) .

2-2-4: النمو على الاوساط الزرعية المختلفة

اظهرت نتائج الفحص الزرعى ان خميرة *C. neoformans* نمت على وسط SDA وبدرجة حرارة 37 م° بشكل مستعمرات دائرية بيض الى كريمة اللون ,ملساء مخاطية ,كما في الشكل (5) وهذه النتائج تتفق مع (Hetal et al ., 2011; Sharma et al ., 2014) .

اما عند نمو خميرة *C. neoformans* على وسط ستيب اكار وبدرجة حرارة 37 م° , فقد ظهرت نتائج الزرع بان الخميرة قد نمت بشكل مستعمرات كروية ,ملساء مخاطية وبنية اللون, ان تلون مستعمرات خميرة *C. neoformans* باللون البني , يعزى الى امتلاكها لأنزيم الفينول اوكسيداز phenoloxidase الذي يؤكسد المركبات الفينولية الموجودة في الوسط الزرعى مما يرسب صبغة الميلانين على جدار الخميرة مانحا اياها مستعمرات ذات لون بني مميزا وهذه النتائج تتفق مع (الدليمي وشذى, 2011, Lungran et al., 2014;).

كما تم في هذه الدراسة اختبار قدرة خميرة *C. neoformans* على النمو على أوساط محضرة لأول مرة من أزهار وأوراق نبات الداودي , وقد أظهرت النتائج ان الخميرة يمكنها النمو بسهولة , و بمواصفات مستعمراتها النموذجية على الأوساط سابقة الذكر , و يمكن تمييز مستعمراتها بسهولة من خلال تلونها باللون البني وذلك لأن نبات الداودي يعد من النباتات الحاوية في تركيبها على تراكيز عالية من المركبات الفينولية , وقد اظهرت النتائج ان مستعمرات الخميرة النامية على وسط أزهار الداودي تكون ذات لون بني غامق مقارنة مع مستعمراتها النامية على وسط ستيب اكار , أما المستعمرات النامية على وسط أوراق الداودي فتكون ذات لون بني فاتح ويمكن ان يعزى ذلك الى اختلاف تراكيز المركبات الفينولية بين الازهار والاوراق

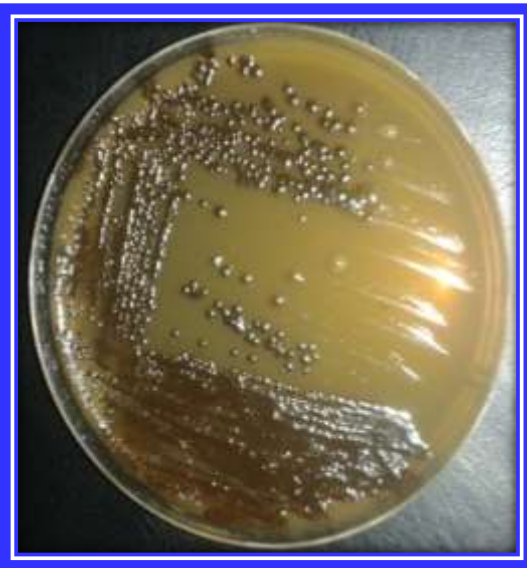
. كما في الشكل (5) ، وهذه النتائج تتفق مع (الدليمي وشذى ، 2011 ; 2011 ، Katiyar *et al.* ، 2011 ; 2011)
. من حيث استخدامهم لأوساط حاوية على مركبات فينولية . (Ajah , 2015 ; Minhas *et al.* ,2013 ;



وسط ستيب اكار



وسط SDA



شكل (5): نمو الخميرة على الاوساط الزرعية المختلفة

3-2-4:الاختبارات البايوكيميائية Biochemical tests

1-3-2-4:اختبار تخمر السكريات Sugar fermentation test

تم تنمية خميرة *C.neoformans* في وسط اختبار تخمر السكريات السائل (كلوكوز و دكستروز ومالتوز وسكروز ولاكتوز) ,واظهرت النتائج عدم قدرة الخميرة على تخمر كل السكريات سابقة الذكر وذلك لآفتقارها للأنزيمات اللازمة لأكسدة هذه السكريات وتمثيلها , إذ° ان الدليل على إيجابية الفحص هو تحول لون الوسط من الأخضر الى الأصفر وهذه النتائج تتفق مع (الكعبي, 2009) .

2-3-2-4:اختبار انتاج اليوريز Urease enzyme production test

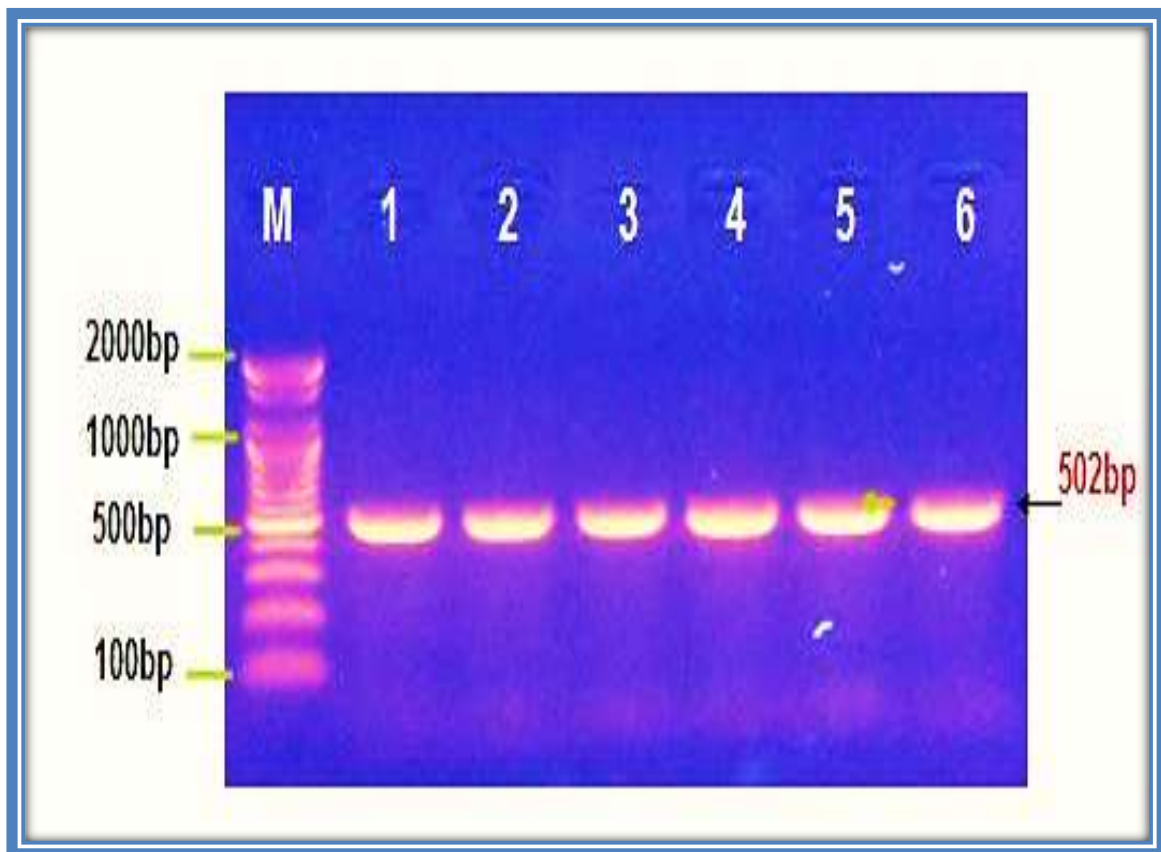
تم تنمية خميرة *C.neoformans* على وسط اكار اليوريا المائل وكذلك مرق اليوريا ,فاظهرت نتائج هذا الاختبار قدرة الخميرة على انتاج انزيم اليوريز إذ° لوحظ تغير لون الوسط من الأصفر الى الوردي والذي يدل على إيجابية الفحص ,وكما في الشكل 6 , وهذه النتائج تتفق مع (Gupta et al ., 2011) ; Khanday et al ., 2014) .



شكل (6) : قدرة *C. neoformans* على انتاج انزيم اليوريز على مرق واكار اليوريا

4-2-4:التشخيص الجزيئي ل *C. neoformans* باستعمال تقنية ال PCR

بعد تشخيص خميرة *C. neoformans* بالطرائق الروتينية بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرة وايضا الصفات المجهرية. شخصت جزيئيا بواسطة تقنية ال PCR للتأكد من صحة تشخيص الخميرة قيد الدراسة . . اذ بينت النتائج ان جميع العزلات التي شخصت على انها خميرة *C. neoformans* كان تشخيصها دقيق اذ بلغ طول الحامض النووي للخميرة 502bp كما في الشكل 7 . تمّ استخدام التشخيص الجزيئي باستخدام تقنية ال PCR لدعم وتأكيد التشخيص المعتمد على الصفات المظهرية لما تتميز به هذه التقنية من دقة وخصوصية عاليتين في التشخيص (ابراهيم, 2013). اذ اكد (Arif et al., 2012) على امكانية استخدام هذه التقنية لدعم وتأكيد التشخيص المظهري , لأنها من طرائق التشخيص القياسية المعتمدة على الحامض النووي DNA .



شكل (7): ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1%) وفولتية (80) فولت ولمدة ساعة للحامض النووي لخميرة *C. neoformans* مع البادئ ITS-1 باستخدام تقنية ال PCR حيث: (1-6) تمثل عينات الخميرة, M:DNA ladder marker (100-2000)b,

3-4: تأثير جزيئات الفضة النانوية على الخميرة

بينت نتائج الدراسة الحالية ان هناك فروقا معنوية بين جزيئات الفضة النانوية ومضاد الامفوتيرسين B الذي استخدم كعامل سيطرة موجب .

اذ اظهرت النتائج ان التركيز 6% كان اكثر التراكيز تثبيطا إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط Inhibition zone (5.46 ± 0.29) ملم في حين كان التركيز 4% متقارب معه في النتيجة إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (5.26 ± 0.13) ملم بينما كان التركيز 2% هو اقل التراكيز تثبيطا إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (2.73 ± 0.17) ملم, اما بالنسبة للمضاد الفطري فقد بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (7 ± 0.11) ملم , وكما في الشكل 8 .

يعود السبب في الفعالية التثبيطية القوية لجزيئات الفضة النانوية لأمتلاكها مساحة سطحية واسعة بالنسبة للحجم (Tolaymat et al .,2010;Kanhed et al .,2014) , وهذا الامر ادى الى قدرة جزيئات الفضة النانوية على التفاعل مع الجدار الخلوي للكائن المجهرى مما يؤدي الى حدوث خلل في النفاذية

الخلوية وعدم السيطرة على نقل الفوسفات خلال الغشاء البلازمي وبالتالي تحلل الغشاء البلازمي و تفاعلها مع الاحماض الامينية وخاصة مجاميع الثايول (-SH group) وكذلك تثبيط فعالية العديد من الانزيمات من خلال ارتباطها بالموقع الفعال للانزيم وعرقلة سير الطاقة مما يؤثر سلبا على حركة الالكترونات في السلسلة التنفسية وتثبيط السايكروومات و توليد انواع الأوكسجين التفاعلي اضافة الى تفاعلها مع DNA و RNA يؤدي الى حدوث خلل في تضاعف DNA و من ثم تثبيط نمو الكائن المجهرى Kedziora and (Sobik,2013 ;Chaloupka et al .,2010) .

وهذه النتائج تتفق مع ما وجدته Prabahu et al . (2010) الذي أظهرت نتائج دراسته ان استخدام جزيئات الفضة النانوية بتركيز (1-6 mg/ml) قد ثبت نمو (*Trichophyton mentagrophytes* , *T.rubrum* , *Microsporum canis*, *M.persicolor* and *Candida albicans*) إذ لاحظ من خلال دراسته ان جزيئات الفضة النانوية تمتلك فعالية تثبيطية عالية مقارنة مع المضادين الامفوتيرسين B والفلوكونازول .

كما تتفق هذه النتائج من حيث الاتجاه في التأثير مع ما وجدته (Nasrollahi et al . 2011) بان جزيئات الفضة النانوية تعمل كمضادات فطرية فعالة ضد نوعين من الخمائر هما *Candida albicans* و *Saccharomyces cerevisiae* إذ لاحظ من خلال الفحص بالمجهر الالكتروني (Scanning electron microscopy) حدوث تغيرات في تركيب غشاء كلا الخميرتين عند تفاعلها مع جزيئات الفضة النانوية , إذ لاحظ تكون ثقب على سطح الغشاء مما يؤدي الى موت الخلية نتيجة تكون هذه الثقوب وايضا لاحظ تثبيط عملية تكون البراعم نتيجة تحطم الغشاء وبالتالي تثبيط نمو الخميرة , ومع ما وجدته Rezaie and Shahverdi,(2011) ان استخدام جزيئات الفضة النانوية بتركيز 10 ملغم /مل قد ثبت نمو الفطر *Trichophyton rubrum* .

اشار (2013) Lee et al . ان استخدام جزيئات الفضة النانوية بتركيز (2mM) قد ثبت نمو الفطريات الممرضة للنبات مثل : (*Colletotrichum coccodes* , *Monilinia sp* and *Pyricularia sp*) , كما ذكر (2013) Xu et al . ان جزيئات الفضة النانوية اظهرت فعالية تثبيطية ضد فطر *Aspergillus ssp* ضعف فعالية مضاد الامفوتيرسين B .

كما اشار (2014) Padalia et al . الى الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية ضد الميكروبات ومنها البكتريا الموجبة لصبغة غرام (*Staphylococcus aureus* , *Bacillus cereus*) والسالبة لصبغة غرام (*E.coli*, *Pseudomonase aeruginosa*) والخمائر (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*) .

و ذكر (2012) Kim et al . و (2015) Mahdizadeh et al . بان جزيئات الفضة النانوية تعمل على تثبيط العديد من الفطريات الممرضة للنبات إذ اتضح من خلال دراستهم انها تعمل على احداث

ثقوب في سطح الخيوط الفطرية مما يؤدي الى خروج المواد الداخلة خلوية الى الخارج ومن ثم انكماش الخيوط الفطرية, كما لاحظ من خلال الفحص المجهرى تثبيطها لعملية تكوين الابواغ, اما (Khalil, 2013), فوجد ان جزيئات الفضة النانوية قد تثبتت تكوين ابواغ الفطر *A.fumigatus*.

نوع المادة	التركيز/mg/l	معدل قطر التثبيط \pm الخطا القياسي
جزيئات الفضة النانوية	2	2.73 \pm 0.17 A
	4	5.26 \pm 0.13 B
	6	5.46 \pm 0.29 B
مضاد الامفوتيرسين B	50	7 \pm 0.11 C

جدول (10) تأثير Ag-NPs والمضاد الفطري الامفوتيرسين B على الخميرة

*تدل الحروف المتشابهة على عدم وجود فروقات معنوية بينما المختلفة تشير الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية اقل من ($P \leq 0.05$).



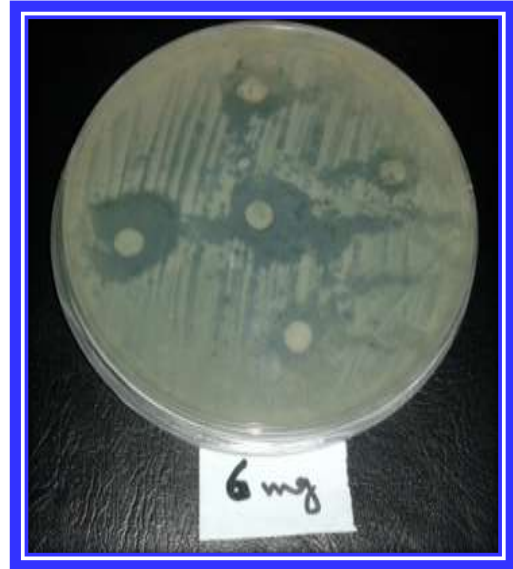
Ag-NPs



Ag-NPs



Amphotericin B



Ag-NPs

شكل (8): تأثير Ag-NPs ومضاد الامفوتيرسين B على الخميرة

أظهرت النتائج خلو جزيئات الفضة النانوية بالتراكيز المستخدمة في هذه الدراسة من أي سمية خلوية على كريات الدم الحمراء للإنسان , ويستدل من ذلك على عدم حصول أي تحلل دموي لسلسلة التراكيز المحضرة لجزيئات الفضة النانوية في هذه الدراسة , وهذه النتائج تتفق مع (Khatoon *et al* .(2015) كما موضح في الجدول ادناه.

جدول (11) نتائج حساب السمية الخلوية

التحلل الدموي	نوع المادة
+	ماء الحنفية
-	محلول الملح الفسيولوجي
-	جزيئات الفضة النانوية

*النتيجة الموجبة (+) تدل على وجود تحلل دموي .

*النتيجة السالبة (-) تدل على عدم وجود تحلل دموي .

5-4 : اختبارات الامراضية

4-5-1: عزل الخميرة من الاعضاء المختارة

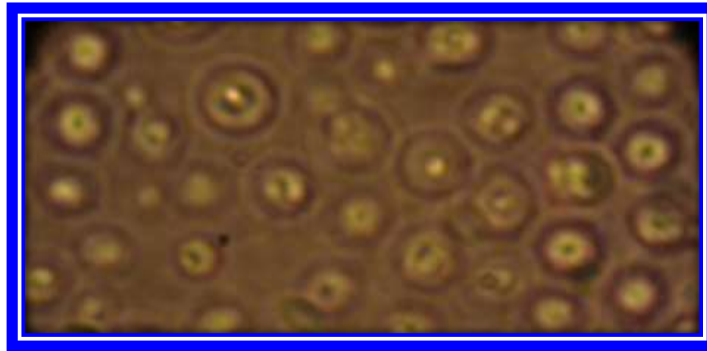
أظهرت نتائج الدراسة الحالية ايجابية الاعضاء المختارة (الرئة ، الدماغ) للخميرة , اذ ظهرت مستعمرات الخميرة على وسط SDA بشكل مستعمرات دائرية بيضاء – كريمية اللون , ملساء مخاطية كما في الشكل 9(A,B) , اما عند تصبيغها بالحبر الهندي لوحظ ان الخميرة محاطة بهالة شفافة كما في الشكل 9(C) . وبذلك اعتبرت الجرذان مصابة بالخميرة . وهذا يتفق مع ما ذكره (Gazzoni *et al* . (2014) و Xavier *et al* . (2009) الذي أشار ان الإصابة بالخميرة تشخص على أساس الدراسة النسيجية بالتوافق مع ايجابية النمو على الأوساط الزرعية .



B



A



C

شكل (9) : A : زرع الدماغ على وسط SDA , B : زرع الرئة على وسط SDA , C : خميرة *neoformans* المعزولة من هذه الاعضاء والمصبوغة بالحبر الهندي تحت قوة تكبير 40X .

4-5-2: التغيرات النسيجية

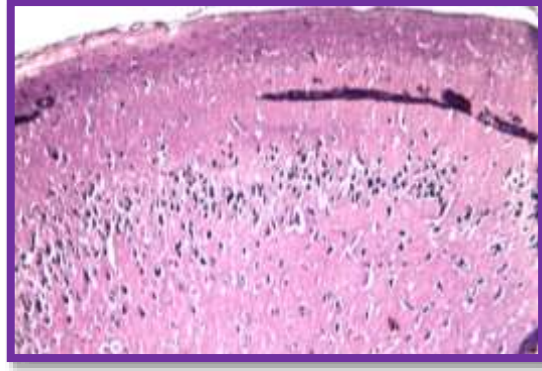
تم في هذه الدراسة استخدام 18 من اناث الجرذ الابيض والتي قسمت على ثلاث مجموعات احتوت كل مجموعة على ستة جرذان .

تعد خميرة *neoformans* . C من الكائنات المجهرية التي يمكن تمييزها نسيجيا وبكفاءة عالية , ولذلك تم تصبيغ المقاطع النسيجية المأخوذة من الرئة والدماغ بصبغة PAS , لكفاءة هذه الصبغة على

إظهار الخميرة بشكل واضح في المقاطع النسيجية إذا ما قورنت بصبغة الايوسين - هيماتوكسيلين , حيث تظهر الخميرة عند صبغ المقاطع النسيجية بهذه الصبغة بلون زهري Pink وبشكلها الكروي المميز محاطة بهالة غير مصبوغة مما أصبح تمييزها أمر بالغ السهولة (Srinivasan et al ., 2010) .

اولا: الدماغ

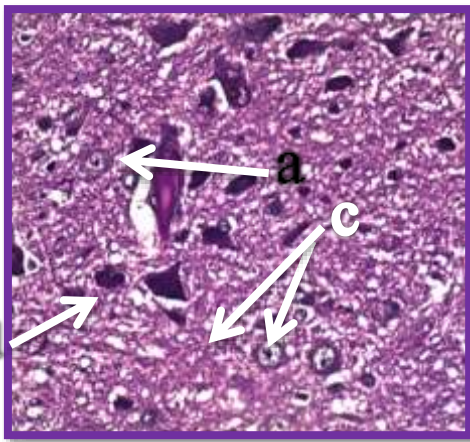
اظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من دماغ جرذان مجموعة السيطرة (A) تركيبا طبيعيا وعدم ظهور أي تغيرات مرضية كما في الشكل 10 .



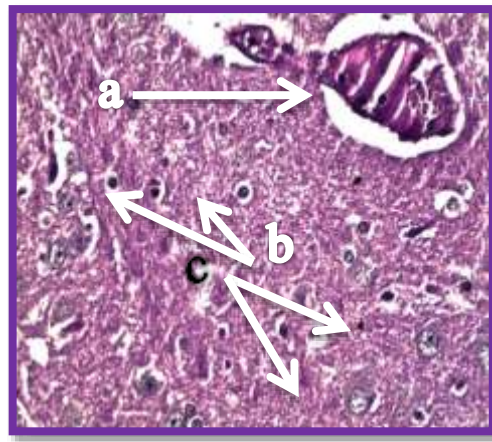
A

شكل (10) : مقطع في نسيج دماغ اناث الجرذ الابيض . المجموعة (A) : معاملة السيطرة (10x) .

بينما أظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من دماغ الجرذان المصابة من المجموعة الثانية (B) تغيرات نسيجية - مرضية واضحة بعد 15 يوم من الإصابة , تمثلت بوجود احتقان في نسيج الدماغ مع تكاثر الخلايا النجمية Astrocytes وارتشاح الخلايا الدبقية Gliosis . أما بعد 30 يوم من الإصابة كانت التغيرات مشابهة لما ذكر سابقا الا انها اشد , إذ لوحظ تنكس الخلايا العصبية في نسيج الدماغ . كما في الشكل 11a (B₁₅ , B₃₀) .



B₃₀



B₁₅

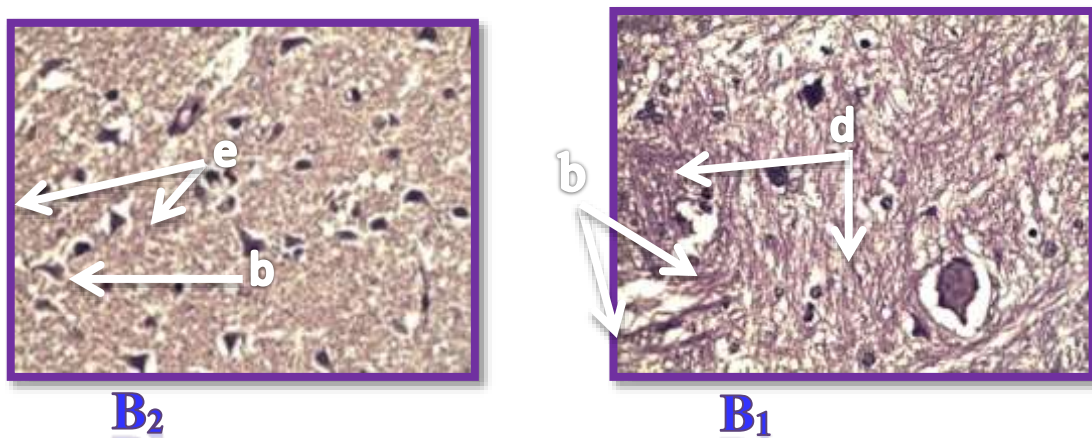
شكل (11a) : مقطع في نسيج دماغ اناث الجرذ الابيض . المجموعة (B) : معاملة بعالق الخميرة فقط وغير مثبطة مناعيا (10x) , (B₁₅) : بعد 15 يوم من الاصابة بالخميرة , (B₃₀): بعد 30 يوم من الاصابة بالخميرة .

a: احتقان دموي , b: الخلايا الدبقية , c: الخلايا النجمية , d: تنكس الخلايا العصبية .

ان حدوث تغيرات في نسيج الدماغ يمكن تفسيرها بوجود الخميرة بشكل حر في تجاويف الاوعية الدموية في الدماغ (Price and Perfect , 2011) , كما يمثل ارتشاح الخلايا الدبقية والنجمية دليلا آخر على إصابة الدماغ , حيث تمثل هذه الخلايا خط الدفاع الأول في الجهاز العصبي المركزي , ولذلك تحفز هذه الخلايا عند حدوث خلل في الدماغ للسيطرة على الإصابة لكونها تمتلك دورا مناعيا في الدماغ (Loane and Byrnes , 2010 .; Prinz and Priller , 2014) .

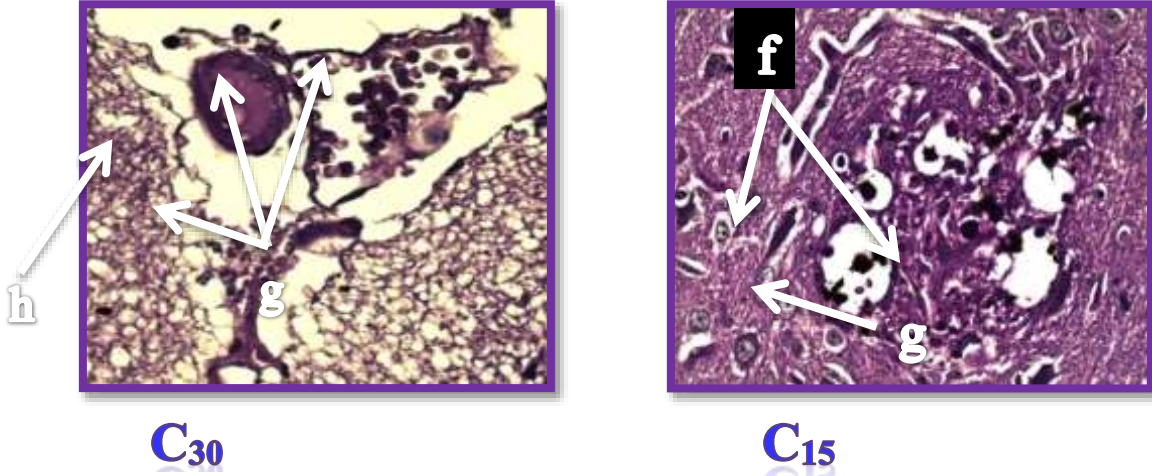
تتفق هذه النتائج مع ما وجدته Tauber et al . (2014) إذ لاحظ ان إصابة الدماغ بخميرة *C.neoformans* سبب ارتشاح كثيف للخلايا الدبقية مع تكاثر الخلايا النجمية , وتتفق مع ما لاحظته Liu et al . (2014) إذ لاحظ ان الخميرة في أدمغة الحيوانات المصابة كانت محاطة بالخلايا النجمية .

كذلك أظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من دماغ الجرذان غير المثبطة و المعالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B تغيرات مشابهة للمجاميع السابقة لكنها اشد بسبب زيادة مدة الإصابة اذا لم نلاحظ وجود اي تحسن في الجرذان المعالجة بالمضاد الفطري كما في الشكل (B₁) 11b , في حين أظهرت نتائج المقاطع المعالجة بجزيئات الفضة النانوية استجابة الجرذان للعلاج , حيث أظهرت تغيرات نسيجية – مرضية اقل مقارنة مع المجاميع السابقة تمثلت بوجود نسيج أقرب الى النسيج الطبيعي للدماغ متمثل بوجود خلايا عصبية Neuron ذات جسم Soma مثلث الشكل وذو نواة مركزية مع ارتشاح بسيط للخلايا الدبقية. كما في الشكل (B₂) 11b .



شكل(11b): مقطع في نسيج دماغ اناث الجرذ الابيض . المجموعة (B) : معاملة بعالق الخميرة فقط وغير مثبطة مناعيا (10x) , (B₁): معالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B , (B₂): معالجة بجزيئات الفضة النانوية . b : الخلايا الدبقية , d: تنكس الخلايا العصبية , e : خلية عصبية طبيعية .

في حين أظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من دماغ الجرذان المصابة وال المثبطة مناعيا بعقار الهيدروكورتزون (C) تغيرات نسيجية – مرضية شديدة بعد 15 يوم من الإصابة , تمثلت بوجود خبزب odema في نسيج الدماغ والذي يحتوي على خلايا الخميرة مع ارتشاح الخلايا الدبقية والنجمية . اما بعد 30 يوم من الاصابة فقد كانت التغيرات مشابهة لما سبق إلا انها أكثر شدة اذ لوحظ وجود خثرة داخل الاوعية الدموية مع وجود خبزب حولها , كما تم ملاحظة وجود أعداد كبيرة من الخميرة في الفراغات حول الاوعية الدموية وفي نسيج الدماغ بشكل مفرد او تجمعات محاطة بفراغ يمثل المكان الذي كانت تشغله المحفظة التي انكشفت اثناء مراحل التثبيت والتمرير . كما في الشكل 12a (C₁₅ , C₃₀) .



شكل (12a) : مقطع في نسيج دماغ اناث الجرذ الابيض .المجموعة (C): معاملة بعالق الخميرة ومثبطة مناعيا بعقار الهيدروكورتزون (10x) , (C₁₅) : بعد 15 يوم من الاصابة بالخميرة , (C₃₀) : بعد 30 يوم من الاصابة بالخميرة . f: خبزب حول الوعاء الدموي , g :خلايا الخميرة , h : خثرة داخل الوعاء الدموي .

يؤدي تراكم السكريات المتعددة المكونة لمحفظة الخميرة الى زيادة اوزموزية سوائل الدماغ مما يؤدي الى ظهور الوذمة (ارتشاح السوائل) . اما حدوث خثرة في الاوعية الدموية في نسيج الدماغ , فيعود لامتلاك الخميرة لأنزيم الهيمولايسين الذي يحلل كريات الدم الحمراء , و يعزى سبب تحلل الخميرة لكريات الدم الحمر لحاجة الخميرة الى الحديد ,حيث تؤكسد الخميرة Fe⁺² الموجود في صبغة الهيموغلوبين بواسطة الانزيم المؤكسد للحديد Iron oxidase الى Fe⁺³ وتستخدمه كمصدر للحديد الذي يعد أحد العناصر المغذية الدقيقة micronutrient الاساسية التي تحتاجها الخميرة كباقي الاحياء المجهرية (Jung et al , 2009 ; Choi et al.,2012) . لذلك تتكون الخثرة داخل الوعاء الدموي والتي تعد عملية دفاعية يقوم بها الجسم لتفادي نزف الدم المستمر .

ويعود اتساع الفراغات حول الاوعية الدموية الى أمثلائه بمواد جيلاتينية ناتجة من تجمع السكريات المتعددة المخاطية المكونة لمحفظة الخميرة , وهذا يتفق مع ما أشار اليه (Vieira et al . (2013) إذ

لاحظ وجود افات في ادمغة مرضى نقص المناعة المكتسب HIV- positive patients على شكل اكياس صغيرة تحوي على مواد جيلاتينية مع وجود خلايا الخميرة بكثرة في الفراغات حول الأوعية الدموية وفي المناطق المجاورة لها .

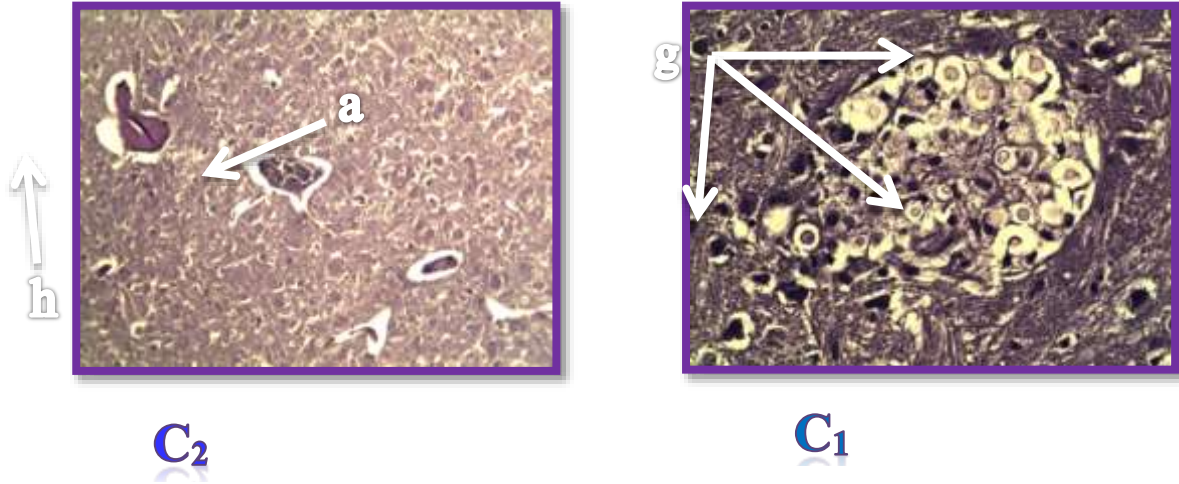
تبتلع الخميرة عند وصولها الى حاجز الدم – الدماغ (Blood – Brain Barrier (BBB) بواسطة الخلايا الدبقية الدقيقة و الخلايا النجمية المحيطة بالأوعية الدموية , Stanimirovic and Friedman (2012) ويمكن للخميرة ان تعيش وتتكاثر بعد التهامها داخل الخلية الدبقية الدقيقة , وتحرر الخميرة بعد تحلل تلك الخلايا بينما يكون من الصعب على الجهاز المناعي ان يتغلب على الاصابة حينما تكون الخميرة داخل الخلية الدبقية الدقيقة (Loane and Byrnes, 2010) . وهذا يفسر كيفية وصولها الى نسيج الدماغ .

ونتيجة لامتلاك الخميرة لأنزيم اللاكيز والمسمى ايضا بالفينول اوكسيديز والمسؤول عن تحول هذه المركبات الى ميلانين , لذلك يمكن ان تمثل هذه المركبات مواد اساسية لعملية صنع الميلانين , اذ ان استغلال الخميرة للكاتيكولامين في الدماغ في انتاج الميلانين يحميها من ضرر الاكسدة Oxidative damage وذلك بإزالة الجذور الحرة Scavenging free radicals . وهذا يفسر سبب ميل الخميرة لإصابة الجهاز العصبي المركزي Neurotropism , كما يفسر سبب نموها وتكاثرها في نسيج الدماغ (Galanis et al ., 2012 ; Ngamskulrungraj et al ., 2010) .

وتوافقت نتائج التغيرات النسيجية – المرضية في هذه الدراسة مع ملاحظات الكعبي , (2009) بعد دراسة نسيجية أجراها على الفئران البيض , والتي أكدت حدوث تغيرات نسيجية – مرضية في الدماغ تمثلت باحتقان الأوعية الدموية مع ارتشاح الخلايا الالتهابية ووجود أعداد كبيرة من الخميرة في نسيج الدماغ .

كما تتفق مع (Loyse et al ., 2010) الذي لاحظ من خلال دراسته التي أجراها على خمس اشخاص مصابين بال Cryptococcosis , ان التغيرات النسيجية – المرضية تمثلت بارتشاح الخلايا الالتهابية ووجود خلايا الخميرة بأعداد كبيرة في الدماغ وفي الفراغات حول الأوعية الدموية .

كما أظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من دماغ الجرذان المثبطة و المعالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B تغيرات مشابهة للمجاميع السابقة لكنها أشد بسبب زيادة فترة الاصابة اذا لم نلاحظ وجود أي تحسن في الجرذان المعالجة بالمضاد الفطري , إذ لوحظ انتشار الخميرة بشكل كبير في نسيج الدماغ . كما في الشكل 12b(C₁) . في حين اظهرت نتائج المقاطع المعالجة بجزيئات الفضة النانوية استجابة الجرذان للعلاج لكن الاستجابة كانت افضل في المجموعة غير المثبطة , إذ اظهرت تغيرات نسيجية – مرضية اقل مقارنة مع المجاميع السابقة , تمثلت بوجود احتقان قليل مع خثرة صغيرة داخل الأوعية الدموية في الدماغ مع تكاثر الخلايا الدبقية . كما في الشكل 12b(C₂) .



شكل (12b) : مقطع في نسيج دماغ اناث الجرذ الأبيض . (C) : معاملة بعالق الخميرة ومثبطة مناعيا بعقار الهايدروكورتزون (10x) , (C₁) : معالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B , (C₂) : معالجة بجزيئات الفضة النانوية .

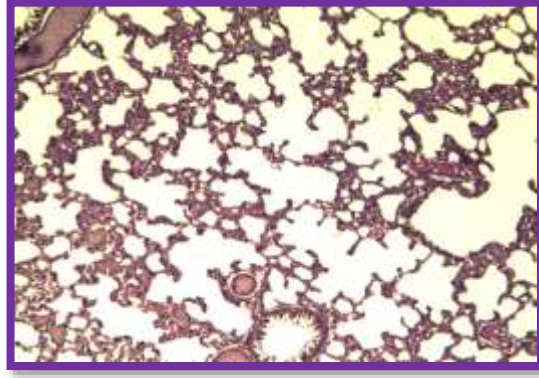
a : احتقان دموي , g : خلايا الخميرة , h : خثرة داخل الوعاء الدموي .

يعزى سبب عدم فعالية المضاد الفطري في العلاج الى عدم قدرة المضاد على اختراق الجهاز العصبي المركزي وخاصة حاجز الدم – الدماغ (BBB) (Laniado-Laborin and Vargas , 2009) . وهذا يتفق مع ما اشار اليه Boulware *et al* . (2010) ان الوفاة تحصل في مرضى الايدز بنسبة من 30- (100%) حتى مع العلاج بالمضادات الفطرية ويعود السبب في ذلك الى عدم قدرتها على اختراق اغشية الدماغ .

كما تتفق نتائج دراستنا هذه مع ما لاحظته Akila and Nanda , (2012) إذ وجدوا ان جزيئات الفضة النانوية قد عملت على شفاء جروح الجرذان المصابة بصورة أسرع وأفضل من الأدوية المستخدمة لعلاج هذه الجروح .

ثانيا: الرئة

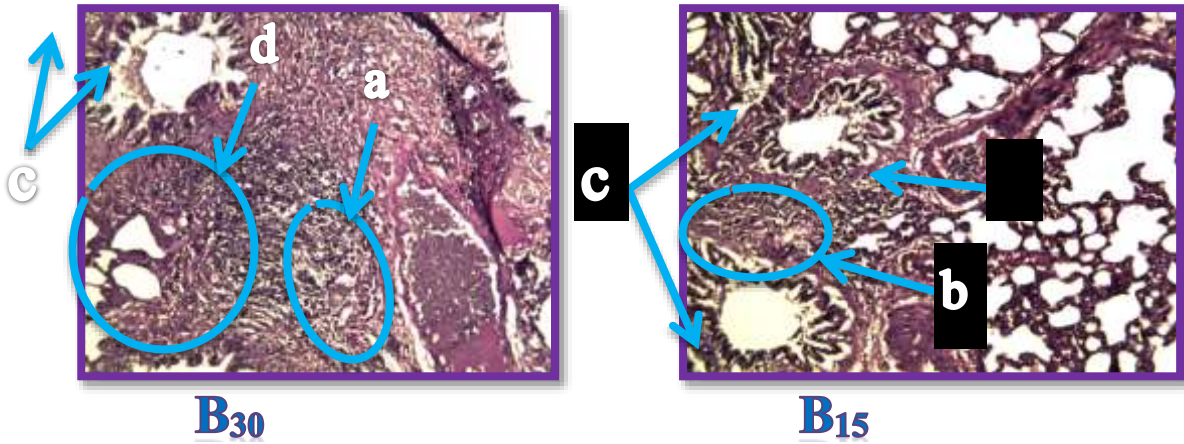
اظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من رئة جرذان مجموعة السيطرة (A) تركيبا طبيعيا وعدم ظهور اي تغيرات مرضية . كما في الشكل 13 .



A

شكل (13) : مقطع في نسيج رئات اناث الجرذ الابيض . المجموعة (A) : معاملة السيطرة (10x) .

بينما اظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من رئة الجرذان المصابة من المجموعة الثانية (B) تغيرات نسيجية- مرضية واضحة بعد 15 يوم من الاصابة , إذ لوحظ ارتشاح الخلايا الالتهابية في النسيج البيني للرئة مع احتقان الأوعية الدموية وتوسف (Desquamation) في الخلايا الظهارية المبطنة للقصبات . اما بعد 30 يوم من الاصابة فقد كانت التغيرات مشابهة لما سبق الا انها اكثر شدة , إذ لوحظ وجود افة ورم حبيبي granulomatous lesion والتي تتميز بارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية. كما في الشكل 14a(B₁₅ , B₃₀) .



B₃₀

B₁₅

شكل (14a) : مقطع في نسيج رئات اناث الجرذ الابيض . المجموعة (B) : معاملة بعالق الخميرة فقط وغير مثبتة مناعيا (10x) , (B₁₅) : بعد 15 يوم من الإصابة بالخميرة , (B₃₀): بعد 30 يوم من الإصابة بالخميرة . a : احتقان دموي , b : آرتشاح الخلايا الالتهابية , c: تنكس الخلايا العمودية المبطنة للقصبات , d: افة ورم حبيبي .

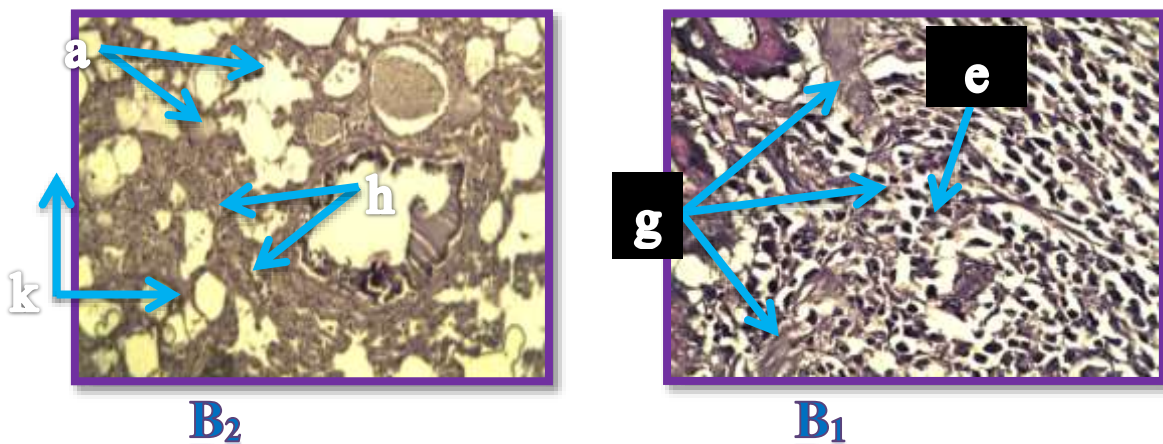
ان حصول ارتشاح الخلايا الالتهابية دليل على الاستجابة السريعة للجسم ضد الخميرة . ويعود السبب في الارتشاح الكثيف للخلايا الالتهابية نتيجة اصابة الخميرة لنسيج الرئة والتي تعمل على تحفيز الاستجابة

الالتهابية واحداثها من خلال تأثيرها في تحفيز إفراز عوامل الجذب الكيميائي Chemotactic factor الخاصة في بادئ الأمر بالخلايا العدلة والتي فشلت في القضاء على الخميرة , نظرا لما تمتلكه من عوامل ضراوة مثل : الكبسولة والميلانين والذان يعملان على تثبيط عملية البلعمة (Shi et al ., 2010 ; Janbon and Doering , 2011) .

اما سبب احتقان الأوعية الدموية فيحصل بسبب محتوى العالق الجرثومي من الإفرازات الفطرية مثل امتلاك الخميرة لأنزيم الهيمولايسين الذي يحلل كريات الدم الحمر مما يسبب حصول زيادة في ضغط الدم داخل الشعيرات الدموية Microcirculation ومن ثمَّ زيادة نفاذية الشعيرات الدموية مما يؤدي الى انسلاها خارج الوعاء الدموي بعملية يطلق عليها النضح .

في حين يعزى سبب حدوث تغيرات تنكسية و نخرية في الخلايا المبطنة للقصبات الى قدرة الخميرة على إنتاج انزيمات البروتياز Protease والفوسفولايبيز التي تعمل على تحلل اغشية هذه الخلايا مما يؤدي الى تحرر الجسيمات الحالة ذات الفعل النخري على الانسجة (Vu et al .,2014) . اما تكون الورم الحبيبي فيعدّ دليلا على الاستجابة المناعية في الجسم ومحاولته للسيطرة على الإصابة من خلال وجود انواع مختلفة من الخلايا الالتهابية .

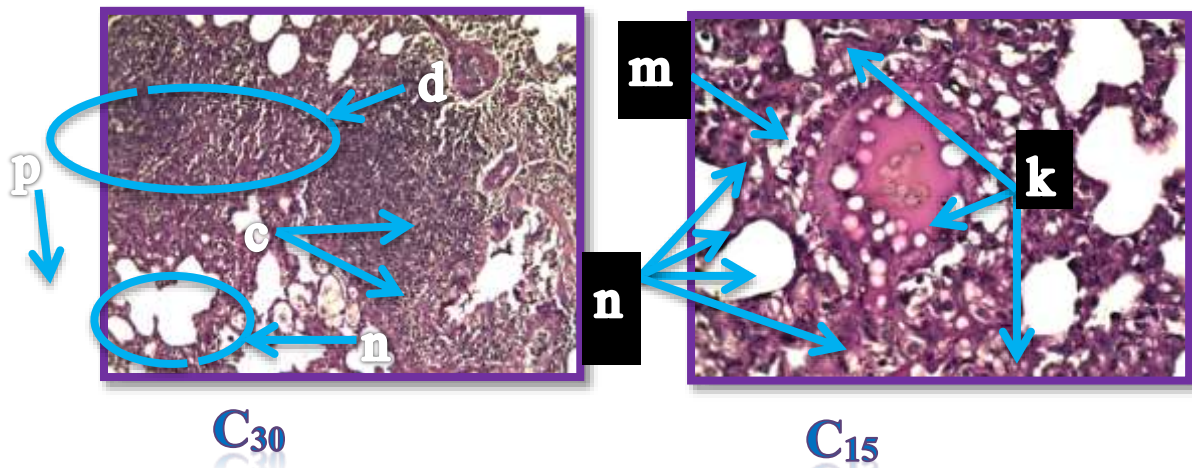
كما اظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من رئات الجرذان غير المثبطة و المعالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B عدم وجود تحسن في الجرذان المعالجة بالمضاد الفطري , إذ لوحظ وجود تغيرات مشابهة للمجاميع غير المعالجة الا انها اشد بسبب زيادة مدة الإصابة والتي تمثلت بوجود واضح لافه الورم الحبيبي الذي يتميز بوجود كثيف للخلايا الالتهابية مع وجود الخلايا الظهرانية Eethelioid cells والتي تحيط بمركز الافة , في حين أظهرت نتائج المقاطع المعالجة بجزيئات الفضة النانوية استجابة الجرذان للعلاج , إذ اظهرت تغيرات نسيجية – مرضية أقل مقارنة مع المجاميع السابقة , تمثلت بوجود نسيج أقرب الى النسيج الطبيعي في الرئة ماعدا بعض التثخن البسيط في النسيج البيني و احتقان الأوعية الدموية , اما القصبات فتظهر طبيعية ومبطنة بخلايا عمودية مهدبة مع ارتشاح قليل للخلايا الالتهابية . كما في الشكل 14b(B₁ , B₂) .



شكل (14b) : مقطع في نسيج رئات اناث الجرذ الابيض . المجموعة (B) : معاملة بعالق الخميرة فقط وغير مثبطة مناعيا (10x) , (B₁): معالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B , (B₂): معالجة بجزيئات الفضة النانوية . a : احتقان دموي , e : الخلايا الظهرانية , g : الخلايا البلعمية , h : خلايا عمودية طبيعية مهدبة , k : تتخن النسيج البيني للرئة .

ان ارتشاح الأورام الحبيبية بالخلايا الظهرانية , يعود الى الضراوة العالية للخميرة والتي أدت الى تحول الخلايا البلعمية الى الخلايا الظهرانية ذات الكفاءة العالية في القضاء على المسببات المرضية (Crabtree et al ., 2012) .

كذلك اظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من رئة الجرذان المصابة والمثبطة مناعيا بعقار الهايدروكورتزون (C) تغيرات نسيجية – مرضية شديدة بعد 15 يوم من الإصابة , تمثلت بارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية وخاصة من نوع البلعم الكبير, كذلك يلاحظ تكون الخثرة داخل الاوعية الدموية لنسيج الرئة مع وجود خلايا الخميرة فيها وكذلك تتخن النسيج البيني للرئة . اما بعد 30 يوم من الإصابة فقد كانت التغيرات مشابهة لما سبق الا انها أشد , حيث تمثلت بتواجد كثيف لخلايا الفطر في نسيج الرئة مع تنكس وتخر في الخلايا الظهارية العمودية المبطننة للقصبات . كما يلاحظ وجود النفاخ الرئوي emphysema Pulmonary ووجود خلايا الخميرة في بعض الاسناخ . كما في الشكل , 15a(C₁₅ , C₃₀) .

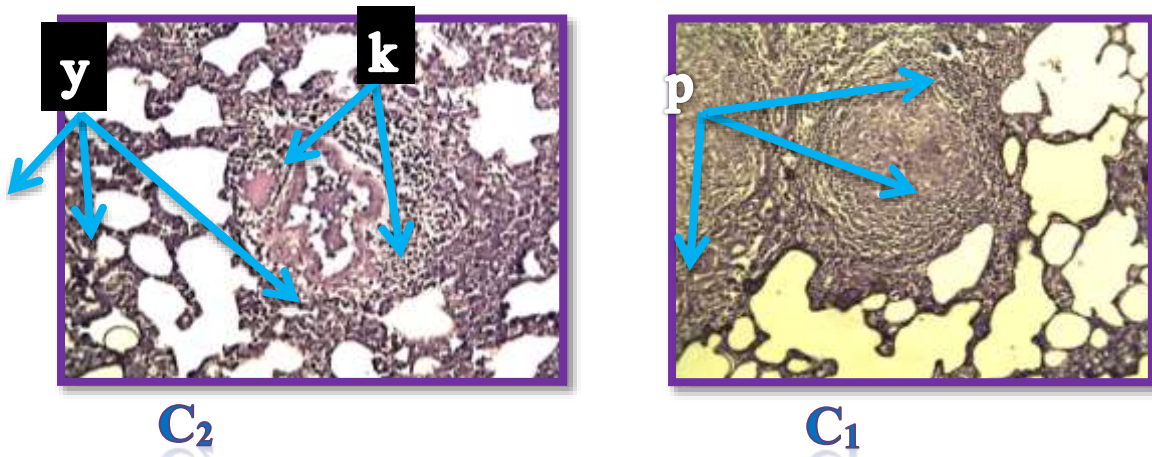


شكل (15a) : مقطع في نسيج رئات اناث الجرذ الابيض . المجموعة (C): معاملة بعالق الخميرة ومثبطة مناعيا بعقار الهايدروكورتزون (10x) , (C₁₅) : بعد 15 يوم من الاصابة بالخميرة , (C₃₀) : بعد 30 يوم من الاصابة بالخميرة . c : تنكس الخلايا العمودية المبطننة للقصبات , d : افة ورم حبيبي , k : تتخن النسيج البيني للرئة , m : خثرة كبيرة داخل الوعاء الدموي , n : خلايا الخميرة , p : انتفاخ الاسناخ الرئوية .

ان حدوث خثرة داخل الاوعية الدموية في نسيج الرئة , فيعود لامتلاك الخميرة لأنزيم الهيمولايسين الذي يحلل كريات الدم الحمر , و يعزى سبب تحلل الخميرة لكريات الدم الحمر لحاجة الخميرة الى الحديد , حيث تؤكسد الخميرة Fe^{+2} الموجود في صبغة الهيموغلوبين بواسطة الانزيم المؤكسد للحديد Iron oxidase الى Fe^{+3} وتستخدمه كمصدر للحديد الذي يعتبر احد العناصر المغذية الدقيقة micronutrient الأساسية التي تحتاجها الخميرة كباقي الاحياء المجهرية (Jung et al .,2009 ; Choi et al.,2012) . لذلك تتكون الخثرة داخل الوعاء الدموي والتي تعد عملية دفاعية يقوم بها الجسم لتفادي نزف الدم المستمر .

ويعود حدوث النفاخ الرئوي لامتلاك الخميرة لانزيم الفوسفولايباز الذي يحلل الأواصر الاسترية الموجودة في مركبات الدهون المفسفرة (Chrisman et al ., 2011) , وهذا يفسر سبب تحلل جدران الاسناخ الرئوية نظرا لآحتوائها على الدهون الفوسفاتية مما يؤدي الى انفثاخ الاسناخ بعضها على بعض مكونة النفاخ الرئوي .

كما أظهرت نتائج الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية المأخوذة من رئات الجرذان المثبطة و المعالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B عدم وجود تحسن في الجرذان المعالجة بالمضاد الفطري , إذ لوحظ وجود تغيرات مشابهة للمجاميع غير المعالجة الا أنها أشد والتي تمثلت بوجود ليفي غزير حول الافة بالإضافة الى تكاثر النسيج البيني للرئة مما أدى الى آختفاء بعض الاسناخ الرئوية بينما تظهر الاخرى منتفخة ومنفجرة ومفتوحة بعضها على بعض . كما في الشكل 15b(C₁) . في حين أظهرت نتائج المقاطع المعالجة بجزيئات الفضة النانوية آستجابة الجرذان للعلاج لكن الاستجابة كانت افضل في المجموعة غير المثبطة , إذ أظهرت تغيرات نسيجية – مرضية أقل مقارنة مع المجاميع السابقة , فقد لوحظ وجود فرط تنسج بسيط حول القصبات , مع آرتشاح بسيط للخلايا الالتهابية و آستعادة الاسناخ الرئوية شكلها الطبيعي مع وجود انتفاخ رئوي بسيط في بعض الاسناخ . كما في الشكل 15b(C₂) .



شكل (15b) : مقطع في نسيج رئات إناث الجرذ الأبيض . المجموعة (C): معالجة بعالق الخميرة ومثبطة مناعيا بعقار الهايدروكورتزون (10x) , (C₁): معالجة بالمضاد الفطري الامفوتيرسين B , (C₂): معالجة بجزيئات الفضة النانوية .

k: تثخن النسيج البيني للرئة , p: انتفاخ الاسناخ الرئوية , y: اسناخ رئوية طبيعية .

يعزى سبب عدم تحسن الجرذان المعالجة بالمضاد الى عدم كفاءة ارتباط المضاد بالكوليسترول الموجود في أغشية خلايا اللبائن , بالإضافة الى قلة ذوبانه بالماء والذي يسهم بشكل كبير في الحد من اصاله بشكل فعال الى الأعضاء الأخرى في الجسم .

توافقت نتائج التغيرات النسيجية في دراستنا هذه مع ملاحظات (2009) *Gazzoni et al* . بعد دراسة نسيجية أجراها على 13 حالة من الأشخاص المصابين بالـ *Cryptococcosis* , والتي اكدت تكون افة ورم حبيبي مع تنخر مركز الافة وأحتوائه على أنواع مختلفة من الخلايا الالتهابية . كما تتفق مع (2010) *Gazzoni et al* . بعد دراسة نسيجية أجراها على عشرة أشخاص مصابين بالـ *Cryptococcosis* , والتي أكدت حدوث افات حبيبية وتنخر في الانسجة المصابة .

ذكر (2011) *Chen et al* . بعد دراسة أجراها على شخص مصاب بداء المستخفية الرئوية ان التغيرات النسيجية تمثلت بنتنخن الحواجز بين الأسناخ الرئوية مع وجود الخميرة فيها . ومع ما ذكره *Ye et al* (2012) . بعد دراسته التي أجراها على 76 شخص مصاب بداء المستخفيات الرئوية الاولية *Primary Pulmonary Cryptococcosis* وغير مثبطين مناعيا حيث لاحظ تكون افة ورم حبيبي مع وجود الخميرة في نسيج الرئة .

قام (2013) *Suwatanponched et al* . بدراسة نسيجية أجراها على 12 حالة من الاشخاص غير المثبطين مناعيا ومصابين بـ *Pulmonary Cryptococcosis* , إذ لاحظ ان التغيرات النسيجية- مرضية تمثلت بوجود آفات أورام حبيبية مع وجود خلايا الخميرة في النسيج البيني الرئة . وتتفق مع ما وجده (2013) *Zhou et al* . عندما درس ايضا حالة شخص مصاب بداء المستخفية الرئوية إذ لاحظ انتفاخ الأسناخ الرئوية مع وجود الخميرة فيها وفي النسيج البيني للرئة .

أوضح (2012) *Guzman et al* . تأثير *Ag-NPs* على ثلاثة أنواع من البكتريا *E.coli* و *S.aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* فأتضح له انها ثبتت الأنواع الثلاثة بنسبة 90 % . كما درس (2012) *Das and Ahmed* , تأثير *Ag-NPs* في تركيب الجدار الخلوي لخميرة *S.cerevisiae* فلاحظ حدوث خلل في تركيب الجدار الخلوي لخلايا الخميرة المعاملة بـ *Ag-NPs* مقارنة مع الخلايا غير المعاملة .

أشار (2013) *Jain and Sharma* , الى الفعالية التثبيطية لـ *Ag-NPs* المصنعة من الاسبرجلس ضد الميكروبات الممرضة الشائعة في اصابة الفم مثل : *S.mutans* , *C.glabrata* , *C.albicans* , *Pseudomonas aeruginosa* فبينت نتائج دراسته انها قادرة على تثبيط نمو هذه الميكروبات اذ بلغ قطر منطقة التثبيط لكل منها (23mm,22mm ,16mm ,21mm) على التوالي .

وذكر Pulit *et al* . (2013) ان استخدام Ag-NPs بتركيز 50ppm قد ثبت نمو الفطر *A.niger* بنسبة 70 % والفطر *Cladosporium cladosporoides* بنسبة 90 % .

بحث Kamikawa *et al* . (2014) تأثير Ag-NPs على الكانديدا الفموية *oral candida* فلاحظ انها تعمل على تقليل التصاق الكانديدا بالمضيف .

كما بين Kannan *et al* . (2014) تأثير Ag-NPs على خمسة أنواع من البكتريا الممرضة للإنسان والمقاومة للمضادات الحياتية *E.coli* , *B.subtilis* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Shigella flexneri* , *Klebsiella pneumoniae* فاتضح له ان لـ Ag-NPs تأثير كبير في تثبيط هذه الأنواع من البكتريا .

حقق Wady *et al* . (2014) في تأثير Ag-NPs على الكتلة الحيوية Biomass لبكتريا *S.aereus* ونوعين من خميرة *Candida* هما *C.glabrata* و *C.tropicalis* فلاحظ نقصان واضح في الكتلة الحيوية للأحياء المذكورة، إذ بلغ التركيز المثبط الأدنى للـ *S.aereus* 1.95 mg/ml ولنوعي الكانديدا 3.91 mg/ml و 15.63mg/ml على التوالي .

في حين ذكر Singh *et al* . (2014) ان استخدام Ag-NPs بتركيز 80ml قد ثبت نمو بكتريا *E.coli* بقطر 17mm في حين ثبت بكتريا *S.aureus* بقطر 16mm .

كما قام Rao *et al* . (2014) بدراسة تأثير Ag-NPs المصنعة من الليمون على نوعين من البكتريا هما *E.coli* و *B.subtilis* فلاحظ ان Ag-NPs لها القدرة على تثبيط نوعي البكتريا بقطر بلغ 3mm لكل منهما .

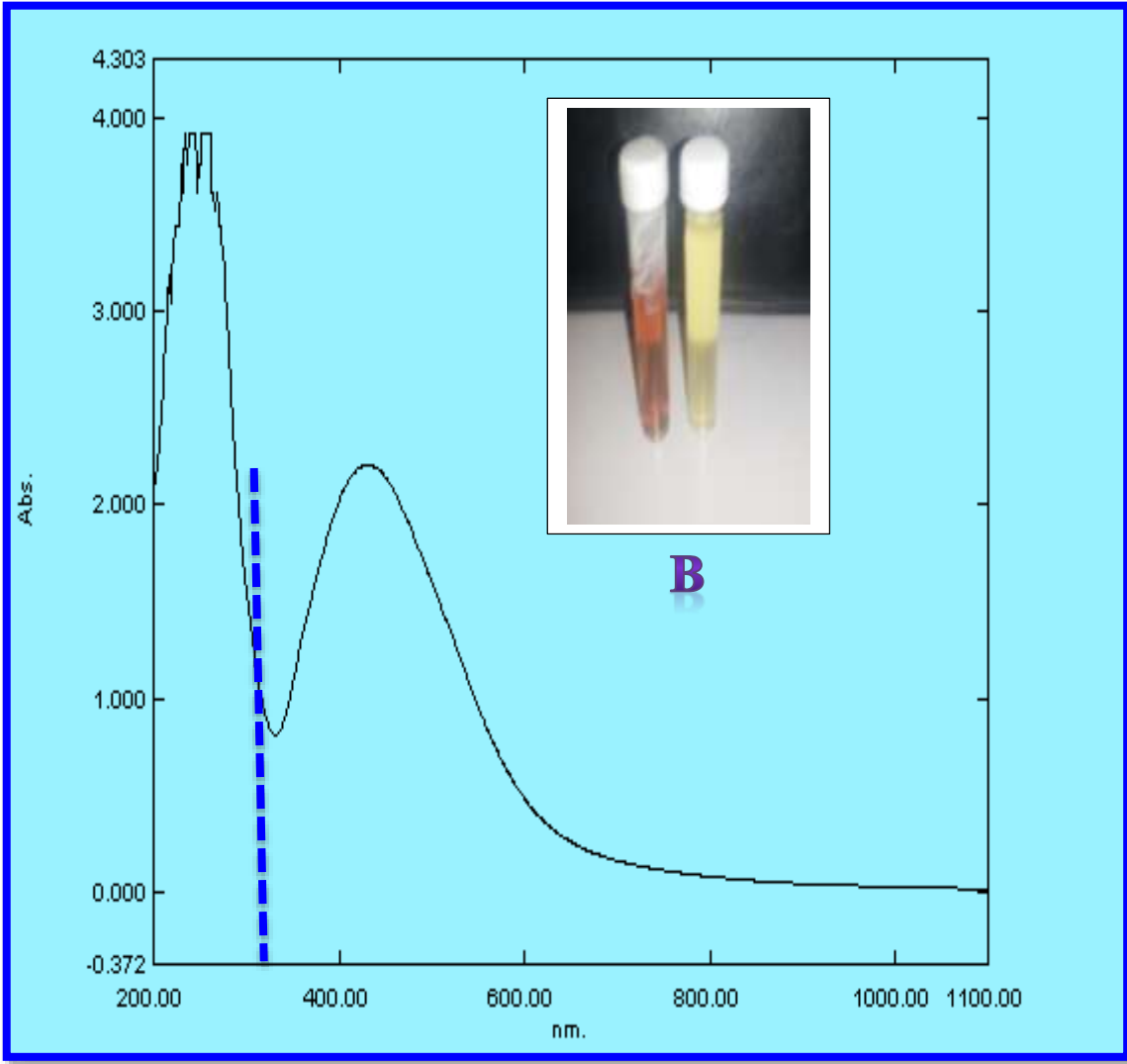
واوضح Singh *et al* . (2015) تأثير Ag-NPs في تثبيط نمو خمسة انواع من البكتريا *E.coli* , *B.anthraxis* , *S.aureus* , *Salmonella enterica* , *Vibrio parahaemolytica* و نوع واحد من الخمائر *C.albicans* فاتضح له ان Ag-NPs تمتلك فعالية عالية في تثبيط نمو البكتريا والخميرة المستخدمة في الدراسة .

4-6: التصنيع الحيوي لجزيئات الفضة النانوية من الفطر *Fusarium oxysporum*

تناولت هذه الدراسة تصنيع Ag-NPs حيويًا باستخدام الفطر *Fusarium oxysporum* . والذي تمّ عن طريق تفاعل أيونات الفضة الناتجة من نترات الفضة مع المستخلص المائي للفطر والذي استمر لمدة 60 يوم , حيث يتم التأكد من إنتاج Ag-NPs بشكل أولي عن طريق تغير اللون من الأصفر إلى البني الغامق , وفي هذه الدراسة تم تغير اللون إلى البني وهذا دليل على إنتاج Ag-NPs , وبشكل تأكدي عن طريق قياس امتصاصية الـ Ag-NPs باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية UV-vis Spectrophotometry إذ بلغ الطول الموجي لها في هذه التجربة تقريبًا 425nm . كما في الشكل 16 .

تتفق هذه النتائج مع ما وجدته (Birla et al . (2013) ان الطول الموجي لـ Ag-NPs المصنعة من الفطر *Fusarium oxysporum* كان حوالي 420nm . في حين ذكر (Ishida et al . (2014) ان الطول الموجي لـ Ag-NPs المصنعة من الفطر نفسه قد بلغ 440nm .

وتتفق أيضا مع (Nithya and Ragunathan , (2014) الذي أشار ان الطول الموجي لـ Ag-NPs المصنعة من الفطر *Aspergillus niger* قد بلغ 427nm . ومع ما وجدته (Singh et al . (2014) إذ وجد ان الطول الموجي لـ Ag-NPs المصنعة من الفطر *Penicillium sp* قد بلغ 422nm .



A

شكل

(16) : A : الكشف عن جزيئات الفضة النانوية باستخدام UV- vis . B : صورة توضح تغير اللون من الاصفر الى البني .

اولا : الاستنتاجات

- 1: ان خميرة *C.neoformans* وجدت بنسبة أكبر في العينات المأخوذة من سائل النخاع الشوكي CSF مقارنة مع الأنواع الأخرى من العينات .
- 2 : تفوق وسطي أزهار وأوراق نبات الداودي المحضر لأول مرة في هذه الدراسة في تشخيص الخميرة مقارنة مع الأوساط المعروفة و المستخدمة في تشخيصها مثل وسط ستيب اكار .
- 3: أظهرت نتائج الدراسة قدرة الخميرة على احداث الاصابة في كل من الجرذان المثبطة وغير المثبطة مناعيا مع الاختلافات بشدة الاصابة .
- 4: أظهرت جزيئات الفضة النانوية مختبريا فعالية تثبيطية عالية للخميرة مقارنة مع المضاد الفطري Amphotericin B و خصوصا عند التركيزين (4,6%) .
- 5 : أعطت جزيئات الفضة النانوية تأثيرا متميزا كعلاج تجريبي ولأول مرة في الحيوانات المصابة بالخميرة من خلال تقليل الأضرار النسيجية المرضية مقارنة مع المضاد الفطري المستخدم .
- 6: امكانية تصنيع جزيئات الفضة النانوية حيويا باستخدام الفطريات مثل الفطر *F. oxysporum* .

- 1: استخدام وسطي أوراق وأزهار نبات الداودي في تشخيص خميرة *C. neoformans*.
- 2: إجراء دراسات سريرية لتثبيت امكانية استخدام جزيئات الفضة النانوية في علاج الإصابات التي تسببها خميرة *C. neoformans* وخصوصا التهاب السحايا كبديل عن المضادات الفطرية وإجراء دراسات باستخدام تقنيات حديثة مثل المجهر الإلكتروني لتأكيد التأثير الإيجابي لهذه الجزيئات.
- 3: إجراء دراسة مستفيضة حول فعالية Ag-NPs المصنعة حيويًا من الفطر *F. oxysporum* ضد الخميرة في المختبر وفعاليتها في علاج الحيوانات المختبرية المصابة بالخميرة.
- 4: دراسة التأثير التازري لـ Ag-NPs مع المضاد الفطري الامفوتيرسين بي وبقية المضادات الأخرى المستخدمة في علاج *Cryptococcosis*.
- 5: إجراء دراسات حول التأثيرات الجانبية و السمية للجزيئات النانوية للفضة عند استخدامها ومقارنتها بالتأثيرات الجانبية التي تسببها المضادات الفطرية.

أولاً: المصادر العربية

- ابراهيم , مصطفى رعد جواد . (2013) . التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير .كلية العلوم – جامعة القادسية .ص:99.
- ابن القيم الجوزية , شمس الدين ابي عبدالله محمد بن ابي بكر الزرعي الدمشقي . (2004) . شرح الطب النبوي .الجزء الاول – الناشر : المكتبة العصرية للطباعة والنشر – بيروت . ص:143-149.
- الاسكندراني , محمد شريف . (2010) . تكنولوجيا النانو من اجل غد افضل .مجلة عالم المعرفة ,العدد(6374) .
- الكعبي , حيدر طعمة . (2009) . عزل خميرة *C. neoformans* من براز الحمام ودراسة بعض جوانب امراضها في الفئران .مجلة جامعة كربلاء العلمية . المجلد السابع . العدد الثاني .
- الدليمي , حمزية علي عجة وشذى علي شفيق . (2011) . استخدام ثمار بعض النباتات لتحضير اوساط زرعية لعزل وتشخيص خميرة *Cryptococcus neoformans* . مجلة علوم المستنصرية . 3(1):251-262 .

ناجي , و داد , محمد صبري وحسنين خليل . (2006) . دراسة لبعض التغيرات النسيجية للفئران المصابة تجريبيا ببعض الفطريات المعزولة من مرضى التدرن الرئوي البشري .مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية .المجلد(12) ,العدد(3) .

ثانيا: المصادر الاجنبية

Ajah , H . A . (2015) . New culture medium , Fava bean (*Vicia faba*) agar for cultivation and identification of *C.neoformans* . *I . J . Advan . Res .* **3** (7) : 964 – 971 .

Akila , S . and Nanda , A . (2012) . In vivo wound healing activity of silver nanoparticles : an investigation . *I . j . s . r .* **3**(7):2319-7064 .

Allen , D . C. and Cameron , R . I . (2004) . Histopathology specimen .Clinical , Pathological and Laboratory Aspects .Spring – Vela London Limited.

Arif , M .; Chawla , S.; Zaidi , N . W .; Rayar , J . K .; Variar , M . and Singh , U . S . (2012) . Development of specific primer for genus *Fusarium* and *F.solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1a) gene . *Afri . J. B .* **11** (2) : 444-447.

Baddley , J . W. and Dismukes , W. E . (2003) . Cryptococcosis .chapter 12 In: Clinical Mycology .Ed . W.E . ; Dismukes ,P.G. ; Pappas and J.D.; Sobel . Exford University Press .PP.519.

- Baram - Pinto , D .; Shukla , S .; Perkas , N .; Gedanken , A .; Sarid , R .** (2009).Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate . *Bioconjug . Chem .* **20** : 1497-1502.
- Barnett , J . A .** (2010) . A history of research on yeasts 14 :Medical yeasts part 2 ,*Cryptococcus neoformans* , yeast . **27** :875-904.
- Bennt , T. B .; Cavanagh , K .; Hristovski , J . D .; Posner and P .; Westerhoff .** (2010) .The release of nanosilver from consumer products used in the home . *J. E. Q .* **39**:1875.
- Birla , S.S .; Gaikwad , S .C. ; Gade , A . K.; Rai , M .K.** (2013) .Rapid synthesis of silver nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by optimizing physiocultural conditions . *S.W.J.* 1-13 .
- Bose , I .; Reese , A .J .; Ory ,J .J . Janbon ,G.;Doering , T . L .**(2003) . A Yeast under cover:the capsule of *Cryptococcus neoformans* . *A .S . M .* **2**(4):655-663.
- Boulware , D . R .; Bonham , S . C .; Meya , D . B .; et al .** (2010) . Paucity of initial cerebrospinal fluid inflammation in cryptococcal meningitis is associated with subsequent immune reconstitution inflammatory syndrome . *J . Infect . Dis .* **202**(6): 962 – 970 .
- Boxall , A . B . A .; Chaudhry , Q .; Sinclair , C . ; Jones , A .; Aitken , R .; Jefferson , B .; Watts , C.** (2007) .Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles . *Sand , Hulston , York , UK : central science laboratory .*
- Bratton , E . W .; El-Husseini , N .; Chastain , C . A .; et al .**(2012) .Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis :HIV-infected , solid organ transplant , and HIV-negative /non-transplant . *PLOS one .* **7**.

- Brizendine , K . D . ; Baddley , J .W . ; Pappas , P . G .** (2013) . Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status . *PLOS one* , **8**.
- Brown , S . M . ; Campbell , L . T . and Lodge , J . K .** (2007) . *Cryptococcus neoformans* , a fungus under stress . *Curr . Opin . Microbiol* . **10**:320-325.
- Cadieux , B . ; Lian , T . ; Hu , G . ; Wang , J . ; Biondo , C . ; Teli , G . , et al .** (2013) . The mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* . *J . Infect . Dis* . **207**:1339-1347.
- Chaloupka , K . Y . ; Malam , A . M . ; Seifalian .** (2010) . Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical application . *Trends in Biotechnology* . **28**(11) :580-588.
- Chang .W. C . ; Tzao , C . ; Hsu , H . H . , et al .** (2006) . Pulmonary cryptococcosis : Comparison of clinical and radiographic characteristics in immunocompetent and immunocompromised patients . *chest* . **129**:333-340 .
- Chaturvedi , V . ; Wang , B . and Newman . S . L .** (1996). Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils . Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates . *J . Immunol* . **156** :3836-3840 .
- Chayakulkeeree , M . ; Perfect , J . R .** (2006) . Cryptococcosis . *Infect . Dis . Clin . N . Am* . **20** :507-544 .
- Chen , J . ; Varma , A . ; Diaz , M . R . , et al .** (2008) . *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China . *Emerg . Infect . Dis* . **14**: 755–76.
- Chen , L . C . ; Blank , E . S . and Casadevall , A .** (1996) . Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans* . *Clin . Diagn . Lab . Immunol* . **3**:570-574.

- Chen , Y .; Lin , T .; Lin , G .; Lin , J .** (2011) . Pulmonary Cryptococcus infection after mono – chemotherapy with gemcitabine . *Respir Care* . **56**(3) : 339-341 .
- Choi , J . N .; Kim , J .; Jung , W . H . and Lee , C . H .** (2012) . Influence of iron regulation on the metabolism of *Cryptococcus neoformans* . *PloS One* . **7**.
- Chrisman , C . J .; Albuquerque , P .; Guimaraes , A . J .; Nieves , E . and Casadevall , A .** (2011) . Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interaction with amoebae and macrophages . *Plos Pathogens* . **7**.
- Coelho , C .; Bocca , A . L . and Casadevall , A .** (2014) .The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans* . *Advan . Appl . Microbiol* . **8787**:1-41.
- Cordero , R . J .; Pontes , B .; Guimaraes , A . J .; Martinez , L . R .; Rivera , J .; Fries , B . C ., et al .** (2011) .Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans* . *Infet . Immun.***79**:4990-5000 .
- Cox , G . M .; McDade , H . C .; Chen , S . C .; Tucker , S . C .; Gottfredsson , M .; Wright , L . C ., et al .** (2001) . Extracellular phospholipase activity is avirulence factor for *Cryptococcus neoformans* . *Mol . Microbiol* .**39**:166-175 .
- Crabtree , J . N .; Okagaki , L . H .; Wiesner , D . L .; Strain , A . K .; Nielsen , J . N . and Nielsen , K .** (2012) . Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans* . *Infect . immun* . **80**: 3776 – 3785 .
- Crump , J . R .; Elnor , S . G .; Elnor , V . M . and Kauffman , C . A .** (1992) . Cryptococcal endophthalmitis : case report and review . *Clin . Infect . Dis* . **14**:1069-1073 .
- Dadachova , E .; Bryan , R . A .; Howell , R . C .; Schweitzer , A . D .; Aisen , P .; Nosanchuk , J . D ., et al .** (2008) .The radioprotective properties of

fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment cell and melanoma Research* .**21**:192-199.

Das , D . and Ahmed , G . (2012) . Silver nanoparticles damage yeast cell wall . *J . Biotech* . **3**(3):37-39.

Dirienzo , M . (2006) . New applications for silver .The LBMA precious metal conference 2006, Montreux.

Dubchak , S .; Ogar , A .; Mietelski , J .W .; Turnau , K . (2010) . Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in helianthus annuus . *Span . J . Agric . Res* . **8**(1):103-108.

Eisenman , H . C . and Casadevall , A . (2012) . Synthesis and assembly of fungal melanin . *Appl . Microbiol . Biotechnol* . **93**(3) : 931-940 .

Ellis , D . H . (1994) . Clinical Mycology: The human opportunistic Mycosis . Gillingham printers . Pty. Ltd. Australia .

Ellis , D .; Stephen , D .; Helen , A .; Rosemary , H . and Roben , B . (2007) . Description Of Medical Fungi . Second Edition .

Eshar , D .; Mayer , J .; Parry , N . M .; Williams – Fritze , M . J . Bradway , D . S . (2010) . Disseminated , histologically confirmed *Cryptococcus* ssp infection in a domestic ferret . *J . Am . Vet . Med . Assoc* . **236**(7) : 770-774.

Fonseca , A .; Boekhout , T .; Fell , J .W. (2011) . *Cryptococcus* Vuillemin , p 1661-1738 In Kurtzman CP , Fell JW , Boekhout T , editors . (ed) , The yeasts , a taxonomic study , 5th ed Elsevier , Amsterdam , The Netherlands .

Galanis , E .; Macdougall , L .; Kidd , S . and Morshed , M . (2010) . Epidemiology of *Cryptococcus gattii* , British Columbia , Canada . *Emerg . Infect . Dis* . **16**: 251 – 257 .

Gavanji , S .; Shams , M .; Shafagh , N .; Jalali Zand , A .; Larki , B .; Doost Mohammadi , M .; Taraghian , A . H .; Niknezhad , S . V . (2012) .

Destructive effect of silver nanoparticles on biocontrol agent fungi *Trichoderma viride* and *T.harzianum* . *C . J . A . S . R .* **1**(12):83-90.

Gazzoni , A . F . ; Oliveira , F . M . ; Salles , E . F . ; Mayayo , E . ; Guarro , J . ; Capilla , J . and Saverio , L . C . (2010) . Unusual morphologies of *Cryptococcus* ssp in tissue specimens : report of 10 cases . *Rev . Inst . Med . Trop . Sao . Paulo* . **52** (3) : 145-194 .

Gazzoni , A . F . ; Severo , C . B . ; Salles , E . F . ; Severo , L . C . (2009) . Histopathology , Serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis . *Rev . Inst . Med . trop . S . Paulo* . **51**(5) : 255-259 .

Gazzoni , F . A . ; Elsemann , R . B . ; Conde , A . ; Galafassi , D . ; Gazzoni , A . F . (2014) . Updating : Cryptococcosis diagnostic aspects . *J . AIDS . Clin . Res* . **5**:391 .

Graybill , J . R . ; Soble , J . ; Saag . M . The NIAID Mycoses study group and AIDS cooperative treatment groups . , *et al* . (2000) . Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis . *Clin . Infect . Dis* . **30** :47-54 .

Gupta , P . ; Malik , S . ; Khare , V . ; Banerjee , G . ; Mehrotra , A . ; Mehrotra , S . ; Singh , M . (2011) . Afatal case of meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var . *grubii* in an immunocompetent male . *J . Infect . Dev . Ctries* . **5**(1) : 071-074 .

Guzman , M . ; Dille , J . ; Godet , S . (2012) . Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram –negative bacteria . *Nanomedicine : Nanotechnology , B . Med* . **8**(1) :37-45 .

Hagen , F . ; Zaragozi , M . ; Meis , J . ; Chew , W . ; et al . (2012) . Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population . *J . Clin . Microbiol* . **50**(6): 1918-1926.

Harris , J . R . ; Lockhart , S . R . ; Debess , E . ; Marsden –Haug , N . ; Goldoft , M . ; Wohrle , R . , et al .(2011) . *Cryptococcus gattii* in the United States :

clinical aspects of infection with an emerging pathogen . *Clin . Infect . Dis* .
53:1188-1195 .

Heiss , C .; Skowrya , M . L .; Liu , H ., et al . (2013) . Unusual galactofuranosemodification of a capsule polysaccharide in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* . *J. Biol . Chem* . **288**: 10994–11003.

Heitman , J .; Kozel , T . R .; Kwon –chung , K . J .; Perfect , J . R .; Casadevall , A . (2011) . *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast . ASM Press :Washington DC .

Hetal , S .; Disha , P .; Mahendra , V. (2011) . Evaluation of conventional and serological methods for rapid diagnosis of Cryptococcal meningitis in HIVseropositive patients at tertiary care hospital . *N . J . Com . Med* .**2**(3) : 354-357 .

Hibbett , D . S .; Binder , M .; Bischoff , J . F .; Blackwell , M .; Cannon , P . F .; Eriksson , O . E and other coauthors . (2007) . A higher – level phylogenetic classification of the fungi . *Myco . R* . **111**:509-547 .

Ishida , K .; Cipriano , T . F .; Rocha , G ., et al . (2014) . Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum* : nanoparticle characterization and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts . *Mem . Inst . Oswaldo . Cruz* .**109**(2) : 1-11 .

Islam , N .; Miyazaki , K . (2009) . Nanotechnology innovation system .Understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories .*Technological forecasting and social change* .**76**:128-140 .

Jain , P .; Sharma , A . (2013) . Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from *Aspergillus* species against common oral pathogens . *J . C . P . R .C5* . **5**(2) :14-17 .

Janbon , G .; Doering , T . L . (2011) . Biosynthesis and genetics of the cryptococcal capsule . In *Cryptococcus : from human pathogen to model yeast*

, Heitman , J .; Kozel , T .; Kwon – chung , J .; Perfect , J .; *et al* (eds) .
ASM Press : Washington . 27 – 42 .

Jarvis , J . N .; Casazza , J . P .; Stone , H . H .; Meintjes , G .; Lawn , S . D .;
Levitz , S . M ., *et al* . (2013) .The phenotype of the *Cryptococcus* –specific
CD4 memory T-cell response is associated with disease severity and outcome
in HIV-associated cryptococcal meningitis . *J . infect . Dis* . **207** :1817-1828
.

Jesus , M . D .; Nicola , A . M .; Chow , S . K .; Lee , I . R .; Nong , S .; Specht ,
C . A ., *et al* . (2010) . Glucuronoxylomannan , galactoxylomannan and
mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of
Cryptococcus neoformans .*Virulence*.**1**:500-508 .

Jung , W . H .; Hu , G .; Kuo , W .; *et al* . (2009) . Role of ferroxidases in iron
uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans* . *Eukaryotic cell* . **8**(10):
1511 – 1520 .

Junior , A . M .; Santos , B . F .; Carvalho , F . D .; *et al* . (2013) . Biological
activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical
and environmental isolates . *J . Bras . Patol . Med . Lab* . **49** (3) : 160-168 .

Kamikawa , Y .; Hirabayashi , D .; Nagayama , T ., *et al* . (2014) . In vitro
antifungal activity against oral candida species using adenture base coated
with silver nanoparticles . *J . nanomater* .1-6 .

Kandile , N . G .; Zaky , H .T .; Mohamed , M . I .; Mohamed , H . M . (2010) .
Silver nanoparticles effect on antimicrobial and antifungal activity of new
heterocycles . *Bull . Korean chem* .**31**(12):3530-3538.

Kanhed , P .; Birla , S .; Gaikwad , S .; Gade , A .; Seabra , A . B .; Rubilar , O
.; Duran , N.and Rai , M . (2014) . In vitro antifungal efficacy of copper
nanoparticles against selected crop pathogenic fungi .*Materials letters*
. **115**:13-17.

- Kannan , N .; Shekhawat , M . S .; Ravindran , C . P .; Manokari , M .** (2014) . Preparation of silver nanoparticles using leaf and fruit extracts of *Morinda coreia* Buck.,Ham –Agreen approach . *J . S . I . R .* **3**(3) :315-318 .
- Katiyar , R .; Deorukhkar , S . C . Saini , S .** (2011) . Comparison of different media for the pigment production of *C.neoformans* .
- Kedziora , A . and Sobik , K .** (2013) . Opornosc bakterii na srebro-problem stary , Czy nowy?kosmos . 62(inpress) .
- Khalil , N . M .** (2013) . Biogenic silver nanoparticles by *Aspergillus terreus* as a powerful nanoweapon against *A spergillus fumigatus* . *J . Microbiol .* **7**(50):5645-5651.
- Khanday , M . F .; Sivakumaar , P . K . and Kumar , S . V.** (2014) . A study on the virulence factors of *C.neoformans* isolated from pigeon dropping . *Gol . Res . Tho .* **3**(7) : 1-8 .
- Khaton , N .; Mishra , A .; Alam , H .; Manzoor , N and Sardar , M .** (2015) . Biosynthesis , Characterization and antifungal activity of silver nanoparticles against pathogenic *Candida* sp . *Bio. Nano . Sci .* **4**(4) .
- Kim , K . J .; Sung ,W . S .; Moon , S . K .; Kim , J . G .; Lee , D . G .** (2008 a) . Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes . *J . Microbiol . Biotechnol .* **18** (8) :1482-1484.
- Kim , S . H .; Lee , H . S .; Ryu , D . S .; Choi , S . J. and Lee , D . S .** (2011) . Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *E. coli* . *J. Microbiol . Biotechnol .* **39** (1) : 77-85.
- Kim , S . W .; Jung , J . H .; Lamsal , K .; Kim , Y . S .; Min , J .S .; Lee ,Y. S .** (2012) . Antifungal effect of silver nanoparticles against various plant pathogenic fungi . *Mycobiology .* **40**:53-58.

- Kim , S . W . ; Kim , K . S . ; Lamsal , K . ; Kim , Y. J . , et al .** (2009) . An In vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on Oak wilt pathogen *Raffaelea* sp . *J . Microbiol . Biotechnol* .**19**(8) :760-764 .
- King , J . W .** (2001) . Cryptococcosis . *e Medicine J* . 2 (5) .
- King , J . W .** (2013) . Cryptococcosis . Medscape reference .
- Koneman , E . W . ; Allen , S . D . ; Jawa , W . M . and Sachreckeber , P . C .** (1992) . Color Atlas and Textbook of diagnostic microbiology . 4th ed . Philadelphia. P:838-855 .
- Korbekandi , H . ; Asghari , G . ; Jalayer , S . S . ; Jalayer , M . S . ; Bandegani , M .** (2013) . Nanosilver particles production using *Juglans regia* (*L Walnul*) leaf extract . *J . Nat Pbarm . Prod* .**8**:20-26.
- Kreger-Van, N. J.**(1984). The yeast: A taxonomic study. 3rd ed. Elsevier science publishers. B.V. Amsterdam. Netherlands.
- Kwon – chung , K . J . and Bennet , J . E .** (1992) . Medical Mycology . Lea and Febiger , Philadelphia .
- Kwon-Chung , K . J . and Varma , A .** (2006) . Do major species concepts support one , two or more species within *Cryptococcus neoformans* . *FEMS Yeast Res* .**6**:574-587 .
- Laniado-Laborin , R . and Cabrales-Vargas , M . N .** (2009) . Amphotericin B: side effects and toxicity . *Rev . Iberoam . Micol* . **26**(4):223 – 227 .
- Lazera , M . S . ; Wanke , B . and Nishikawa , M . M .** (1993) . Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from sources in the city of Rio de Janeiro , Brazil . *J . Med .Vet .Mycot* . **31**:449-454 .
- Lee , K . J . ; Park , S . H . ; Govarathanan , M . ; Hwang , P . H . ; Seo , Y . S . ; Cho . ; Lee , W . H . ; Lee , J .Y . ; Kamala-Kannan , S . and Oh , B . T .** (2013) . Synthesis of silver nanoparticles using cow milk and their antifungal activity against phytopathogens . *Materials Letters* . **105**:128-131.

- Lev , S .; Desmarini , D .; Li , C .; Chayakulkeeree , M .; Traven , A .; Sorrell , T . C ., et al .** (2013) . Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase . *Infect . Immun* .**81**:1245-1255 .
- Liu , H . L .; Dai , S . A .; Fu , K . Y .; Hsu , S . H .** (2010) . Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane . *I . J. Nanomed* .**5**:1017-1028 .
- Liu , G . Y . and Nizet , V.** (2009) . Color meads .Microbial pigments as virulence factors . *Trends in Microbiology* .**17** :406-413.
- Liu , T . B .; Subbian , S .; Pan , W .; Eugenin , E .; Xie , J . and Xue , C .** (2014) . Cryptococcus inositol utilization modulates the host protective immune response during brain infection . *Cell Commun Signal* . **12**: 51.
- Loane , D . J . and Byrnes , K . R .** (2010) . Role of microglia in neurotrauma . *Neurotherapeutics* . **7**: 366 – 377 .
- Loyse , A .; Wainwright , H .; Jarvis , J . H .; et al .** (2010) . Histopathology of the arachnoid granulations and brain in HIV-associated cryptococcal meningitis : correlation with cerebrospinal fluid pressure . *AIDS* . **28** ; **24**(3) : 405 – 410 .
- Lu , L .; Sun , R . W .; Chen , R .; Hui , C . K .; Ho , C . M .; Luk , J . M .; Lau , G . K .; Che , C . M .** (2008) . Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication . *Antivir . ther*.**13** : 253-262.
- Lungran , P .; Devi , A .V .; Singh , W . S .; Damroulien , S .; Mate , H .; Golmei , A .** (2014) . Cryptococcosis :Its prevalence and clinical presentation among HIV positive and negative patients in Rims , Manipur .*JOSR-JDMS* . **13**(7) :38-41.

- Mahdizadeh , V .; Safaie , N . and Khelghatibana , F .** (2015) . Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum* . *J .Crop . Prot .* **4**(3):291-300.
- Makadzange , A . T and McHugh , G .** (2014) . New approaches to the diagnosis and treatment of cryptococcal meningitis . *Semin Neurol .* **34**:47-60 .
- Manivasagan , P .; Venkatesan , J .; Senthilkumar , K .; Sivakumar , K . and Kim , S .** (2013) . Biosynthesis , Antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using anovel *Nacardiopsis* sp . *MBRC-1* . 1-9 .
- Maruvada , R .; Zhu , L .; Pearce , D ., et al .** (2012) . *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier . *Cell Microbiol .* **14**(10) :1544-1553 .
- McDonald , J . H .** (2009) . Handbook of Biological Statistics . 2nd ed ., Sparky House Publishing , Baltimore , Maryland .
- Mcfadden , D . C .; De Jesus , M . and Casadevall , A .** (2006) .The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction . *J . Biol . Chem .* **281**:1868-1875.
- McGinnis , M . R .** (1980) . Laboratory hand book of medical Mycology. Academic press . New Yorck .
- Meyohas , M . C .; Roux , P .; Bollens , D ., et al .** (1995) . Pulmonary cryptococcosis . localized and disseminated infections in 27 patients with AIDS . *Clin . Infect . Dis .* **21**:628 -633.
- Minhas , N .; Patil , S .; Sharma , P .C.** (2013) . Novel preparation of culture media for cultivation of *Cryptococcus neoformans* with extracts of different plant products . *Int . J . Pharm . Sci . Rev . Res .* **24**(1) : 70-75 .
- Missall , T . A .; Moran , J . M .; Corbett , J . A . and Lodge , J . K .** (2005) . Distinct stress responses of tow functional laccases in *Cryptococcus*

neoformans are revealed in the absence of the thiol –specific antioxidant Tsa1 . *Eukaryotic cell* . **4**:202 -208 .

Mitchell , T . G . and Perfect , J . R . (1995) . Cryptococcosis in the ear of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans* . *Clin . Microbiol . Rev* . **8**(4) :515 -548 .

Mortensen , K . L .; Jensen , R . H .; Johansen , H . K .; Skov , M .; Pressler , T ., et al. (2011) . Aspergillus species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J . Clin. Microbiol* . **49**:2243-2251.

Mukherjee , P . K .; Chandra , J .; Kuhn , D . M . and Ghannoum , M . A . (2003) . Mechanisms of Fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms :phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols . *Infect . Immun* . **71**(8) : 4333-4340 .

Nano –Health solutions . [http:// www.fulvic . org/html/nanosilver . html](http://www.fulvic.org/html/nanosilver.html) . (2010) .

Nasrollahi , A .; Pourshamsian , K . H .; Mansourkiaee , P . (2011) . Antifungal activity of silver nanoparticles on some fungi . *Int . J . Nano . Dim* . **1**(3):233-239.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) . (2003) . Performance standard for disk susceptibility testing ; approved standard , 6th ed . M 100-S13 . NCCLS , Wayne , Pa .

Ngamskulrungrroj , P.; Chang , Y .; Sionov , E .; et al . (2012) . The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model . *mBio* . **3**(3): 10-12 .

Nithya , R . and Ragunathan , R . (2014) . In vitro synthesis , characterization and medical application of silver nanoparticles by using a low fungi . *J . S* . **21**(6):922-928.

- Nowack , B .** (2010) . Nanosilver revisited downstream science .**330**:1054-1055 .
- O’Meara , T . R . and Alspaugh , J . A .** (2012) . The *Cryptococcus neoformans* capsule : a sword and a shield . *Clin Microbiol Rev* . **25**: 387–408 .
- Odds , F . C .** (1991) . Sabaraud (s) agar . *J. Med . Vet . Mycolo* . **29**(6):355-359.
- Okagaki , L . H .; Strain , A . K .; Nielsen , J . N .** (2010) . Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity . *PLOS Pathog* . **6**:e1000953 .
- Padalia , H .; Moteriya , P .; Chanda , S .** (2014) . Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential . *Arab . J . Chem* . **11**:1878-5352.
- Pal , D .; Das , A .; Pal , S .; Chatterji , S .; Ghosh , M . K .; Naskar , A .; Mallik , S . and Chakrabarty , A .** (2015) . An unusual presentation of disseminated cryptococcosis in a middle aged femals . **3**(2) : 2329 – 9088 .
- Panepinto , J .; Komperda , K .; Frases , S .; Park , Y .; Djordjevic , J . T .; Casadevall , A . and Williamson , P . R .** (2009) . Sec6 – dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans* . *Mol . Microbiol* . **71**:1165-1176 .
- Park , B . J .; Wannemuehler , K . A .; Marston , B . J .; Govender , N .; Pappas , P .G .; Chiller , T . M .** (2009) . Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS . *AIDS* . **23**:525-530.
- Perfect , J . K .; Dismukes , W . E .; Dromer , F ., et al .** (2010) .Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal diseases :2010 updata by the Infectious Diseases society of America . *Clin . Infect . Dis* . **502**:291-322.
- Perfect , J . R .** (2006) . *Cryptococcus neoformans* : the yeast that likes it hot . *Fems Yeast Research* .**6**:463-468.

- Phadhy, A. and Ajello, L.** (1977).The taxonomic status of the hedgehog fungus *Trichophyton erinacei*. *Sabouraudia*. 15: 103 – 114.
- Prabahu , N .; Ayisha , S . S .; Yamuna , G . K . and Divya , T . R .** (2010) . Antifungal activity of silver nanoparticles anovel therapeutic approach . *Arch . pharm . Res* .2:355-359.
- Price , M . S . and Perfect , J . R .** (2011) . Host defenses against cryptococcosis . *Immunol . Invest* . **40**: 786 -808 .
- Prinz , M . and Priller , J .** (2014) . Microglia and brain macrophages in the molecular age : from origin to neuropsychiatric disease . *Nat . Rev . Neurosci* . **15**: 300 – 312 .
- Pulit , J .; Banach , M .; Kowalski , Z .** (2011) . Nanosilver making difficult decisions . *Ecol . Chem . Eng . S* . **18**:185-196.
- Pulit , J .; Banach , M .; Szczyglowska , R .; Bryk , M .** (2013) . Nanosilver against fungi . Silver nanoparticles as an effective biocidal factor . *Actabp* . **60**(4) :795-798.
- Qian , Y .; Yu , H .; He , D .; Yang , H .; Wang , W .; Wan , X . and Wang , L** . (2013) . Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi . *Bioprocess and Biosystem Engineering* .**48**:1-7.
- Rae , P .; Chandraprasad , M . S .; Lakshmi , Y. N .; Rao , J .; Aishwarya , P .; Shetty , S .** (2014) . Biosynthesis of silver nanoparticles using lemon extract and its antibacterial activity . *I . J . M . C . R* . 2321-3124.
- Rakholiya , K .; Chanda , S .** (2012) . In vitro interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extract against some pathogenic bacterial strains . *Asian Pac . J . Trop . Biomed* . 876-880.
- Ramkillawan , Y .; Dawood , H . and Ferreira , N .** (2013) . Isolate cryptococcal osteomyelitis in an immunocompetent patient host :a case report . *Int . J . Infect . Dis* . **17**:e1229-e1231 .

- Ramos , C . L . ; Fonseca , F . L . ; Rodrigues . ; Guimaraes , A . J . ; Cinelli , L . P . ; Miranda , K . , et al .** (2012) . Chitin –like molecules associate with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan to form a glycan complex with previously unknown properties . *Eukaryotic cell* . **11**:1086 -1094 .
- Rezaie , S . and Shahverdi , A . R .** (2011) . Antifungal effect of silver nanoparticle alone and with combination of antifungal drug on dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum* . *I . Biochem . Bioinform* . **5**:364-367.
- Rippon , J . W .** (1988) . Medical Mycology :the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes . 3rd ed . Philadelphia , W B Saunders .
- Robert , G . D .** (1990) . Laboratory method for basic Mycology .In Baily and Scotts : Diagnostic Microbiology (Ed . E . J . Barron and S . M . Finegold) . The C . V . Mosby Co .
- Rodrigues , M . ; dos Reis , F . ; Puccia , R . ; Travassos , L . and Alviano , C .** (2003) . Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase . *Microb . Pathog* . **34**:65-71.
- Roduner , E .** (2006) . size matters : Why nanomaterials are different . *Chem . Soc . Rev* . **35** :583 -592 .
- Roy , S . ; Mukherjee , T . ; Chakraborty , S . and Das , T . K .** (2013) . Biosynthesis , Characterisation and antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876 . *J . Nanomater . Biostruct* . **8**(1):197-205.
- Saag , M . S . ; Powderly , W . G . ; Cloud , G . A . The NIAID Mycoses study group and the AIDS clinical Trials group . , et al .** (1992) . Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS associated cryptococcal meningitis . *N . Engl . J . Med* . **326** :83-89 .
- Saha , S . ; Chattopadhyay , D and Acharya , K .** (2011) . Preparation of silver nanoparticles by bio-reduction using *Nigrospora oryzae* culture filtrate and its antimicrobial activity . *D. J . Nano . Bio* . **6**(4) :1526-1535 .

- Saha , S .; Sarkar , J .; Chattopadhyay , D .; Patra , S .; Chakraborty , A and Acharya , K .** (2010) . Production of silver nanoparticles by a phytopathogenic fungi *Bipolaris nodulosa* and its antimicrobial activity . *D. J .Nano .Bio .* **5**(4):887-895 .
- Sambrook , J . and Russell , D . W .** (2001) . Molecular cloning . Alaboratory manual . 3th ed . cold spring Harbor (NY) : cold spring Harbor laboratory press , N .Y.
- Sampaio , R . N .; Medeiros , B .; Milfort , M .; Alves , G . F .; Reis , C . M . and Campbell , I . T.** (1999) . systemic cryptococcosis with solitary cutaneous lesion in an immune competent patient . *I . J . Dermatol .* **38** .
- Schabes Retchkiman , P .; Canizal , G .; HerreraBecerra , R .; Zorrilla , C .;Lui , H . B . and Ascencio , J . A .** (2006) . Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles . *Optical materias .* **29**(1) : 95 – 99 .
- Senjen , R .** (2007) . Nanosilver –athreat to soil , water and human health . Friends of the Earth Australia .
- Sharama , R . ; Das , A .; Duggal , N .; Hans , C .** (2014) . Cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient . *Sch . J . Med .* **2**(6):414-416.
- Shi , M .; Li , S . S .; Zheng , C .; Jones , G . J .; Kim , K . S .; Zhou , H ., et al** . (2010) . Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cyptococcus neoformans* in mouse brain . *J . clin . Invest .* **120**:1683-1693 .
- Sidrim , J . J .; Costa , A . K .; Cordeiro , R . A .; Brilhante , R . S . and Moura , F . E ., et al** . (2010) . Molecular methods for the diagnosis and characterization of cryptococcus : Areview . *Can . J . Microbiol .* **56**:445-458.
- Singh , D .; Rathod , V .; Ningnanagouda , S ., et al** . (2014) . Optimization and characterization of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium* sp . Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and application studies against

MDR *E. coli* and *S. aureus* . *Bioinorganic Chemistry and Applications* .
1-8 .

Singh , M . ; Kumar , M . ; Kalaivani , R . ; Manikandan , S . and Kumaraguru , A . (2013) . Metallic silver nanoparticle : atherapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen . *Bioprocess and Biosystems Engineering* . **36**:407-415.

Singh , P . S . and Vidyasagar , G . M . (2014) . Biosynthesis , Characterization and antidermatophytic activity of silver nanoparticles using raamphal plant (*Annona reticulate*) aqueous leaves extract . *I . J . M . S* . 1-5.

Singh , P . ; Kim , Y . J . ; Singh , H . ; Mathiyalagan , R . ; Wang , C . and Yang , D . C . (2015) . Biosynthesis of anisotropic silver nanoparticles by *Bhargavaea indica* and their synergistic effect with antibiotics against pathogenic microorganisms . *J . Nanomater* . 1-10 .

Sionov , E . ; Lee , H . ; Chang , Y . C . and Kwon – Chung , K . J . (2010) . *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes

Slavin , M . A . ; Chen , S . C . (2013) . Cryptococcosis , lymphoproliferative disorders and modern day chemotherapy regimens . *Leuk Lymphomia* . **54**:449-450 .

Springer , D . J . and Chaturvedi , V . (2010) . Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii* . *Emerg . Infect . Dis* . **16**(1) :14-20 .

Srinivasan , R . ; Gupta , N . ; Shifa , R . ; Malhotra , P . ; Rajwanshi , A . ; et al . (2010) . Cryptococcal lymphadenitis diagnosed by fine needle aspiration cytology : a review of 15 cases . *Acta . Cytol* . **54** : 1- 4 .

Staib , F . ; Seibold , M . ; Antweller , E . ; Frohlich , B . ; Weber , S . and Blisse , A . (1987) . The Brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis , control and epidemiology of *C . neoformans* in AIDS patients . *Zbl . Bakt . Hyg . A* **266**:167-177 .

- Stanimirovic , D . B . and Friedman , A .** (2012) . Pathophysiology of the neurovascular unit : disease cause or consequence . *J .Cereb . Blood . Flow . Metab .* **32**: 1207 – 1221 .
- Stensberg , M . C .; Wei , Q .; Mclamore , E . S .; Porterfield , D . M . Wei , A . and Sepulveda , M . S .** (2011) . Toxicological studies on silver nanoparticles :challenges and opportunities in assessment , monitoring and imaging . *Nanomedicine .* **6**:879-898.
- Stevanovic , M . M .; Skapin , S . D .; Bracko , I .; Milenkovic , M .; Petkovic , J .;Filipic , M .** (2012) . Poly (lactide –co –glycotide) / silver nanoparticles : synthesis , characterization , antimicrobial activity , cytotoxicity assessment and ROS-inducing potential . *Polymer .* **53** :2818 – 2828 .
- Suwatanapongched , T .; Sangsatra , W .; Boonsarngsuk , V .; Watcharananan , S . P . and Incharoen , P.** (2013) . Clinical and radiologic manifestations of pulmonary cryptococcosis in immunocompetent patients and their outcomes after treatment . *Diagn . Interv . Radiol .* **19**: 438-446 .
- Tauber , S . C .; Eiffert , H .; Kellner , S .; Lugert , R .; Bunkowski , S .; Schutze , S .; et al .** (2014) . Fungal encephalitis in human autopsy cases is associated with extensive neuronal damage but only minimal repair . *Neuropathol . Appl . neurobiol .* **40**: 610 – 627 .
- Tejamaya , M .; Romer , I .; Merrifield , C . R .; Lead , R . J .** (2012) . Stability of citrate , PVP , and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media . *Environ . S . Technol .* **46**:7011-7017 .
- Terada , T.** (2010) . Cryptococcosis in the central nervous system in a 36 year old Japanese man :an autopsy study . *Tohoku J . Exp . Med .* **222**:33-37.
- Thomber , R .; Fenali , P .; Parvathi , L .; Glory , F .** (2012) . Studies on antibacterial and antifungal activity of silver nanoparticles synthesized using *Artocarpus heterophyllus* leaf extract . *Biotechnol . Bioinf . Bioeng .* **2**(1):632-637.

- Tolaymat , T .; El –Badawy , A .; Genaidy , A .; Scheckel , K .; Luxton , T .; Suidan , M .** (2010) . ANevidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in synthesis and applications :Asystematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers . *sci .Tol . Environ .* **5**(408) :999 -1006 .
- Tucker , S . C . and Casadevall , A .** (2002) . Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm . *Proc . Natl . Acad . Sci . USA .* **99**:3165-3170 .
- U . S . FDA .** (2010) . Us food and Drug Administration . [http:// www.Fda.gov /Science Research /Special Topics /Nanotechnology /Ucm 153723 . htm .](http://www.Fda.gov/Science%20Research/Special%20Topics/Nanotechnology/Ucm153723.htm) Data accessed Feb-2010 .
- Vall , J . S .; Nacente , M . S . and Coll , M . S .** (1999) . Handbook of Microbiology culture media . 5th . ed . Williams and Wilkins . Philadelphia .
- Vecchiarelli , A .; Pericolini , E.; Gabrielli , E ., et al .** (2013) . Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule . *Future Microbiol .* **8**: 1107–1116.
- Vieira , M . A .; Costa , C . H .; Ribeiro , J . C .; Nunes –Filho , L . P .; Rabelo , M . G . and Almeida –Neto , W . S .** (2013) . Soap bubble appearance in brain magnetic resonance imaging : cryptococcal meningoencephalitis . *Rev . Soc . Bras . Med . Trop .* **46**: 658 -659 .
- Visnegarwala , F .; Graviss , E . A .; Lacke , C . E ., et al .** (1998) . Acute respiratory failure associated with cryptococcosis in patients with AIDS:analysis of predictive factors . *Clin . Infect . Dis .* **27** :1231-1237 .
- Vu , K .; Eigenheer , R . A .; Phinney , B . S .; Gelli , A .** (2013) . *Cryptococcus neoformans* promotes its transmigration into the central nervous system by inducing molecular and cellular changes in brain endothelial cells . *Infect . Immun .* **81**: 3139-3147 .

- Vu , K .; Tham , R .; Uhrig , J . P .; Thompson , R . III .; Pombejra , S . N .; Jamklang , M .; Bautos , J . M . and Gelli , A .** (2014) . Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease . *Mbio* . **5**:e01101-14.
- Wady , A . F .; Machado , A . L .; Foggi , C . C .; Zamperini , C . A . , et al .** (2014) . Effect of silver nanoparticles solution on *Staphylococcus aureus* and *Candida* ssp . *J . nanomater* . 1-6 .
- Warkentien , T .; Crum –Cianflone , N . F .** (2010) . An update on *Cryptococcus* among HIV-infected patients . *Int J STD AIDS* . **21**:679-684.
- Wijnhoven , S . W . P .; Peijnenburg , W . J . G . M .; Herberts , C . A .; Hagens , W . I .; et al .** (2009) . Nanosilver areview of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment , *Nanotoxicology* . **3**(2):109-138 .
- Xavier , M . O .; Oliveira , Fde . M .; Severo , L .C .** (2009) . Chapter 1 : laboratory diagnosis of pulmonary mycoses . *J . Bras . Pneumol* . **35**: 907 – 919 .
- Xian-guo , H . and Urasella , M .** (1994) . Antifungal compound from *Solanum nigrum* . *J . Ethno* . 43: 173-177
- Xu , Y .; Gao , C .; Li , X .; He , Y .; Zhou , L .; Pang , G .; Sun , S .** (2013) . In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi . *J . Ocul . Pbarmacol . Tber* . **29**:270-274.
- Yasin , S .; Liu , L .; Yao , J .** (2013) . Biosynthesis of silver nanoparticles by bamboo lesves extract and their antimicrobial activity . *J .Fiber . Bioeng . Informal* . **6**:77-84.
- Ye , F .; Xie , J .; Zeng , Q .; Chen , G .; Zhong , S . and Zhong , N .** (2012) . Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis . *S .S .B .Med* . **190**: 339 -346 .

- Yu , J . Q . ; Tang , K . J . ; Xu , B . L . ; Xie , C . M . and Light , R . W .**
(2012) . Pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients . *Infect . Dis .* **16** :
531-539 .
- Zaragoza , O . ; Garcia-Rodas , R . ; Nosanchuk , J . K . , et al .** (2010) .
Fungal cell gigantism during mammalian infection . *PLOS Pathog*
.6:e1000945 .
- Zaragoza , O . ; Rodrigues , M . L . ; de Jesus , M . ; Frases , S . Dadachova , E .
and Casadevall , A .** (2009) . The capsule of the fungal pathogen
Cryptococcus neoformans . *Advan . Appl . Microbiol .* **68**:133-216 .
- Zhou , H . X . ; Ning , G . Z . ; Feng , S . Q . ; Jia , H . W . ; Liu , Y . ; Feng , H .
Y . , et al .** (2013) . Cryptococcosis of lumbar vertebra in a patient with
rheumatoid arthritis and scleroderma case report and literature review . *BMC .
Infect . Dis .* **13** :128.
- Zhou , Q . ; Hu , B . ; Shao , C . ; Zhou , C . ; Zhang , X . ; Yang , D . and Li , C .**
(2013) . A case report of pulmonary cryptococcosis presenting as
endobronchial obstruction . *J . Thorac . Dis .* **5**(4) : 170 -173 .

