فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۳ ص. ۷۱-۷۸

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر اوژنول، جزء فعال میخک، بر مهار رشد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از طریق میان‌کنش احتمالی با پروتئین PBP2a و کاهش بیان ژن *mecA*

ناهید خدادادی[۱]، سمیه عطائی جلیسه[۲*]

۱ کارشناس ارشد، بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): atayi.somayeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۳

چکیده

اوژنول، جزء اصلی روغن میخک است که به عنوان یک عامل ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدان شناخته شده است. استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا است که باعث عفونت‌های بیمارستانی و برخی مرگ‌های ناشی از عفونت‌های باکتریایی است. در این مطالعه اثر اوژنول بر بیان ژن *mecA* و اتصال با پروتئین mecA (PBP2a) در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ارزیابی شد. فعالیت ضدباکتریایی اوژنول به روش انتشار از دیسک، MIC و MBC در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. میان کنش بین اوژنول و پروتئین mecA(PBP2a) به کمک داکینگ مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن *mecA* در جدایه‌های تحت تیمار و بدون تیمار با اوژنول به روش Q-RT-PCR بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اوژنول در ۸۰ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس باعث مهار رشد به روش انتشار از دیسک شد. MIC و MBC اوژنول در اغلب جدایه‌ها به ترتیب ۵/۲۲ mg/ml و ۱۰/۴۴ mg/ml تعیین شد. آنالیز *in silico* میان‌کنش بین اوژنول و پروتئین mecA (PBP2a) را نشان داد. ژن *mecA* در جدایه‌های تحت تیمار با اوژنول (۵/۲۲ میلی‌گرم در میلی لیتر) در مقایسه با کنترل، کاهش بیان ۰/۸۴ برابری داشت. به نظر می‌رسد اوژنول هم از طریق میان کنش با PBP2a و هم از طریق کاهش بیان ژن *mecA* باعث مهار رشد جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس شود.

کلیدواژه‌ها: اوژنول، *in silico*، *mecA*، Q-RT-PCR، استافیلوکوکوس اورئوس.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین پاتوژن ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی [۱] در کودکان و بزرگسالان [۲] و علت برخی مرگ و میرهای ناشی از عفونت‌های باکتریایی است [۳]. این باکتری باعث طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها نظیر التهاب درون‌شامه قلب، عفونت خونی، عفونت‌های پوستی، عفونت‌های

بافت نرم، عفونت‌های پس از جراحی و عفونت‌های موضع زخم می‌شود [۴]. مقاومت به متی‌سیلین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک مشکل مهم در عفونت‌های کودکان در چندین دهه اخیر مطرح شده است. در ایران شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA[1]) در میان کل جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۴۹%، در کودکان بستری در بیمارستان ۵۱% و کودکان سالم ۱۴% گزارش شده است [۲].

جدایه‌های MRSA دارای ژن *mecA*، کد کننده پروتئین قابل اتصال به پنی‌سیلین 2a (PBP2a[2])، هستند که باعث ایجاد مقاومت به متی سیلین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌شود. با این حال، PBP2a برخلاف دیگر PBPها به بتالاکتام‌ها (به استثناء سفتارولین) متصل نمی شود ولی باعث مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA[3]) و مقاومت به اگزاسیلین در گونه‌های کواگولاز منفی می‌شود [۵].

اوژنول[4] (هیدروکسی فنیل پروپن[5])، در بخش روغنی [۶] چندین گیاه از جمله میخک میخک، دارچین و فلفل وجود دارد [۷]. مطالعات نشان داده که روغن میخک به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی و بی‌حسی کاربردهای متنوعی در بخش دارویی می‌تواند داشته باشد [۸]. مطالعات نشان داده که هم روغن میخک و هم اوژنول باعث مهار میکروارگانیسم‌های با منشأ غذایی از طریق مهار تشکیل بیوفیلم و بیماریزایی شدند [۹]. در مطالعه‌ای ترکیب روغنی ضروری میخک (اوژنول) باعث غیر فعال سازی سالمونلا تیفی بعد ۶۰ دقیقه شد. در این مطالعه مشخص شد که اوژنول باعث افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی می‌شود [۱۰]. همچنین اثرات ضد باکتریایی اوژنول علیه هلیکوباکتر پایلوری نیز گزارش شده است [۱۱].

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر اوژنول جزء روغنی اصلی گیاه میخک بر جدایه‌های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس و بیان ژن *mecA* در شرایط *in vitro* و *in silico* در استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و شناسایی باکتری

در این مطالعه، تعداد۳۰ نمونه باکتریایی در سه ماه دی، بهمن و اسفند ۱۴۰۰ از مراکز درمانی رشت جمع‌آوری گردیدند و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، کواگولاز، کشت در مانیتول و DNAas تعیین هویت شدند. در این مطالعه بیمارانی که تحت درمان با آنتی بیوتیک خوراکی و تزریقی بودند مورد ارزیابی قرار نگرفتند.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک[6]

مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انجام تست آنتی‌بیوگرام به روش Kirby-Bauer و طبق استاندارد CLSI2021، با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین (5µg) (پادتن طب، ایران) تعیین گردید. بعد از کشت هر جدایه در محیط‌کشت مایع، سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند تهیه گردید و این سوسپانسیون روی محیط مولر هینتون آگار منتقل شد. سپس دیسکها با فاصله مشخص از هم، بوسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار داده شدند و بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری شد و نتایج طبق استاندارد CLSI2021 گزارش شد.

از دیسک بلانک برای بررسی میزان انتشار از دیسک اوژنول استفاده شد. هر دیسک به اوژنول با غلظت ۱۶۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آغشته شد. بعد از کشت سوسپانسیون میکروبی هر جدایه با غلظت نیم مک فارلند به محیط مولر هینتون آگار، دیسک آغشته به اوژنول به وسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار داده شد و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس، صورت گرفت. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل باکتری کشی (MBC)

در ۱۰ جدایه مقاوم به متی سیلین، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC[7]) در حضور اوژنول (۱۶۷mg/ml) به روش براث

[1] Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
[2] Penicillin-Binding Protein 2a
[3] Methicillin-Resistant **S. aureus**
[4] Eugenol
[5] hydroxyphenyl propene
[6] Disk diffusion
[7] Minimum Inhibitory Concentration

دایلوشن صورت گرفت. بعد از گذشت ۱۸-۲۴ ساعت از انکوباسیون در ۳۷ درجه سیلیسیوس، اولین لوله‌ای که کدورت قابل مشاهده‌ای نداشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

جهت تعیین MBC، از اولین لوله بدون کدورت تا لوله‌های با غلظت بالاتر ترکیب گیاهی، کشت در محیط آگار صورت گرفت و تعداد کلونی‌ها در هر پلیت بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سیلیسیوس، شمارش شد.

استخراج DNA و واکنش PCR

جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در محیط مولر هینتون براث به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس، انکوبه شدند. بعد از رسیدن به کدورت سلولی مناسب، از کیت DNA extraction (سیناکلون، تهران)، جهت تخلیص DNA استفاده شد. بعد از تأیید تک باند بودن DNA ی تخلیص شده در ژل آگارز ۱/۵% ، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت بررسی حضور یا عدم حضور ژن *mecA* صورت گرفت. اجزای واکنش PCR با استفاده از کیتPCR Master Mix 2x (سیناکلون، تهران)، با افزودن DNA، جفت پرایمر (20 pmol) و آب استریل به محلول PreMix آماده شد. پرایمرهای رفت و برگشتی توسط شرکت سیناکلون (تهران)، سنتز شد (جدول ۱). واکنش PCR با برنامه دمایی شامل : یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴C° بمدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل به ترتیب در دمای ۹۴ درجه سیلیسیوس بمدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه،۷۲ درجه سیلیسیوس بمدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس بمدت ۵ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر انجام شد. بعد از اتمام واکنش، محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵% الکتروفورز شدند تا از حضور یا عدم حضور محصول ژنی اطمینان حاصل شود.

بررسی بیان ژن *mecA* در جدایه تحت تیمار با اوژنول

RNA تام سلولی از جدایه تحت تیمار و بدون تیمار با اوژنول با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، تهران) استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (سیناکلون، تهران)، صورت گرفت. جهت بررسی بیان ژن‌ها از کیت Sina Green HS-qPCR Mix (سیناکلون، تهران)، استفاده شد. واکنش Real Time-PCR در دستگاه LightCycler® 96 System (سوئیس) با برنامه دمایی: مرحله واسرشت شدن ابتدایی (C° ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه) و ۴۰ سیکل شامل C° ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه و C° ۵۸ به مدت ۱ دقیقه وC° ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. از ژن 16srRNA به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده است. آنالیز بیان ژن‌ها به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت.

بررسی *in silico* میان‌کنش بین اوژنول و پروتئین (PBP2a)*mecA*

برای بررسی میان کنش بین ترکیب گیاهی اوژنول با پروتئین (PBP2a)*mecA* از روش داکینگ با ابزار Autodock4. 2. 1 استفاده شد. ساختار سه بعدی اوژنول از سایت PubChem (https://pubchem. ncbi. nlm. nih. gov/) دانلود و با نرم‌افزار chimera ucsf 13. 1 به فرمت pdb تبدیل شد. پروتئین mecA (PBP2a) از سایت pdb (rcsb. org) دانلود شد. بعد از حذف مولکول‌های آب از ساختار این پروتئین و افزودن اتم‌ها و پیوندهای هیدروژنی این پروتئین در غیاب محیط آبی با نرم افزار spdbv، ساختار نهایی پروتئین به فرمت pdb تبدیل شد. بعد از انجام داکینگ مولکولی، ساختار سه بعدی کمپلکس لیگاند - رسپتور و نوع پیوندهای اتصالی بین لیگاند و رسپتور با نرم‌افزار۱۶ Rstudio discovery مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR (bp)	منبع
mecA-F	5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'	198	[۱۲]
mecA-R	5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'		
16srRNA-F	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	806	[۱۳]
16srRNA-R	5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3'		

تحلیل آماری

در این مطالعه از آزمون t تست برای بررسی بیان ژن در گروههای تیمار و کنترل استفاده شد. هر آزمون حداقل دو بار تکرار شد.

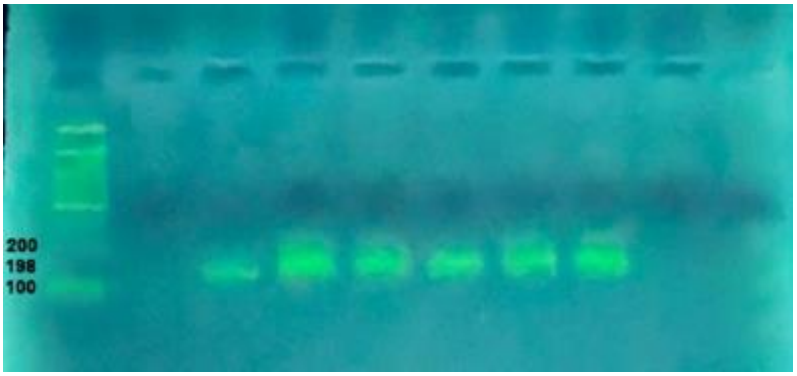
نتایج

فراوانی ژن *mecA* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این مطالعه به کمک روش PCR مشخص شد که ژن *mecA* در ۱۰ جدایه از ۳۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس حضور داشت (شکل ۱).

تعیین قطر هاله عدم رشد اوژنول

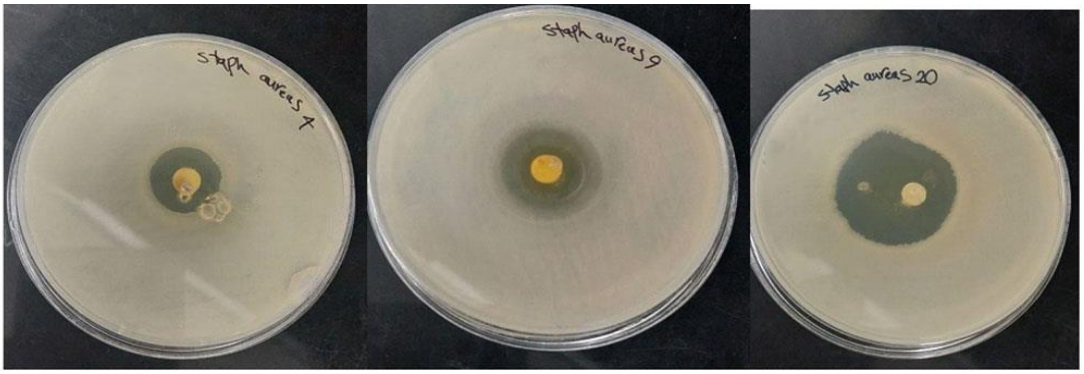
در این مطالعه مشخص شد که ۲۰% جدایه‌ها به غلظت ۱۶۷ میلی گرم در میلی لیتر اوژنول مقاوم بودند اما اوژنول باعث تشکیل هاله عدم رشد با قطرهای متفاوت برای ۸۰% جدایه‌ها شد (شکل۲ و جدول ۱). بطوریکه بیشترین هاله عدم رشد باکتری مربوط به جدایه شماره ۱ با قطر ۳۶ میلی متر اندازه گیری شد (جدول ۱).



شکل ۱. بررسی حضور ژن *mecA* در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس. چاهک اول مربوط به DNA لدر و چاهک‌های دو تا ده مربوط به چندین جدایه دارای ژن *mecA* (با طول ۱۹۸ جفت باز) یا فاقد این ژن می‌باشد.

جدول۱. قطر هاله عدم رشد جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در حضور اوژنول (۱۶۷mg/ml)

شماره باکتری	قطر هاله (mm)	شماره باکتری	قطر هاله (mm)	شماره باکتری	قطر هاله (mm)	شماره باکتری	قطر هاله (mm)	شماره باکتری	قطر هاله (mm)
۱	۳۶	۷	۱۶	۱۳	۰	۱۹	۱۴	۲۵	۲۰
۲	۲۰	۸	۱۹	۱۴	۰	۲۰	۳۰	۲۶	۳۰
۳	۱۶	۹	۱۵	۱۵	۰	۲۱	۲۷	۲۷	۳۰
۴	۱۷	۱۰	۱۹	۱۶	۳۵	۲۲	۰	۲۸	۱۶
۵	۱۶	۱۱	۲۰	۱۷	۰	۲۳	۱۵	۲۹	۳۰
۶	۲۰	۱۲	۰	۱۸	۱۶	۲۴	۱۶	۳۰	۱۷



شکل ۲. هاله عدم رشد جدایه های۴، ۹ و ۲۰ استافیلوکوکوس اورئوس در حضور اوژنول (۱۶۷ میلی‌گرم)

تعیین MIC و MBC اوژنول

نتایج MIC و MBC اوژنول در جدایه مقاوم به متی‌سیلین نشان داد که MIC اوژنول در اغلب جدایه‌ها ۵/۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و MBC اوژنول در اغلب جدایه‌ها ۱۰/۴۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد (جدول ۲).

میزان بیان ژن *mecA* در جدایه تحت تیمار با اوژنول به روش Q-RT-PCR

در این مطالعه جدایه شماره دو تحت تیمار با غلظت۵/۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (تست) و ۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (کنترل) اوژنول به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز کمی بیان ژن *mecA* در جدایه‌های تحت تیمار با اوژنول به روش Q-RT-PCR، کاهش بیان این ژن (۰/۸۴ برابر) را نسبت به جدایه بدون تیمار با اوژنول نشان داد (شکل ۳).

نتایج داکینگ مولکولی میان کنش اوژنول و پروتئین mecA(PBP2a)

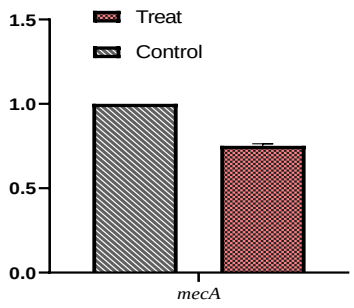
در این مطالعه به روش آنالیز داکینگ مولکولی مشخص شد بین اوژنول و بعضی اسیدهای آمینه در پروتئین mecA (PBP2a) میان‌کنش وجود دارد (شکل ۴). این میان‌کنش می‌تواند در میزان فعالیت PBP2a در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تاثیرگذار باشد.

بحث

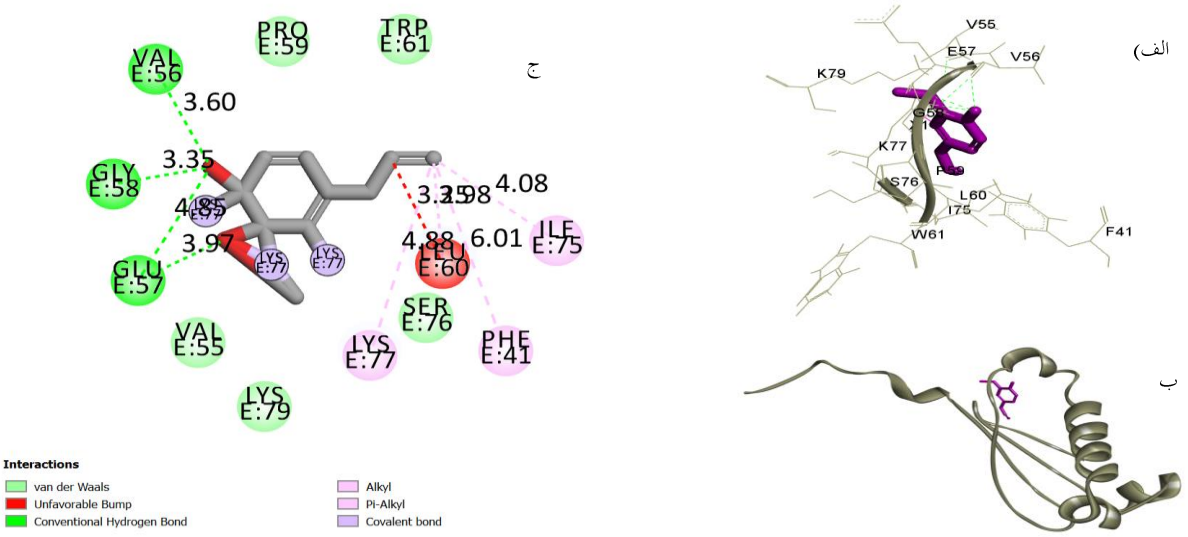
اوژنول یا هیدروکسی فنیل پروپن به طور طبیعی در اسانس چند گیاه متعلق به خانواده‌های Lamiaceae، Lauraceae، Myrtaceae و Myristicaceae وجود دارد [۸]. اوژنول جزء اصلی روغن میخک با خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است [۱۴] خواص ضد باکتریایی ترکیبات گیاهی مختلف از جمله کورکومین از گیاه زردچوبه [۱۵, ۱۶]، آویشن [۱۷, ۱۸]، سیلیبین از گیاه خارمریم [۱۹, ۲۰]، سفارانال از گیاه زعفران [۲۱]، کارواکرول از گیاه نعناع [۲۲] در مطالعات مختلف شناسایی شده است. در مطالعات مختلف مشخص شده که یکی از مکانیسم‌های عمل اوژنول، تخریب غشا سلولی و در نتیجه مرگ باکتری است [۲۳, ۲۴]. همچنین مشخص شده که اوژنول قادر به تخریب DNA و کاهش تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس است [۲۵]. در این مطالعه سعی شد خواص ضد باکتریایی ترکیب اوژنول از گیاه میخک بر چندین جدایه بیمارستانی استافیلوکوکوس اوروئوس مورد بررسی قرار گیرد. نتایج ما نشان داد که اوژنول خاصیت کاهش رشد باکتری، خاصیت کشندگی باکتری و کاهش بیان ژن مسبب مقاومت به متی سیلین (*mecA*) را دارد.

جدول۲. تعیین MIC و MBC اوژنول

شماره باکتری	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	شماره باکتری	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
۱	-	۵/۲۲	۲۰	۵/۲۲	۱۰/۴۴
۲	۵/۲۲	۱۰/۴۴	۲۱	۵/۲۲	۱۰/۴۴
۶	۵/۲۲	۱۰/۴۴	۲۷	۵/۲۲	۱۰/۴۴
۱۴	-	-	۲۹	-	۵/۲۲
۱۶	۵/۲۲	۱۰/۴۴	۳۰	۵/۲۲	۱۰/۴۴



شکل۳. میزان بیان کمی ژن *mecA* در جدایه‌های تحت تیمار (۵/۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بدون تیمار (کنترل) با اوژنول به روش Q-RT-PCR



شکل۴. تصویر سه بعدی میان کنش بین اوژنول و پروتئین mecA (PBP2a)

در مطالعه جعفری ثالث و همکاران [۲۶] مشخص شد ۷۵% جدایه‌های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس در شهر تبریز، مقاوم به متی سیلین بودند. حضور ژن *mecA* در ۶۸% جدایه ها، گزارش شد. در مطالعه زره ساز و همکاران (۲۷) در ۴۶/۰۴% از جدایه‌های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس از چندین بیمارستان در شهر تهران دارای ژن *mecA* بودند. در مطالعه نائبی و همکاران (۲۸) در بیمارستان ولی عصر تبریز از ۹۸ جدایه بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۶ جدایه مقاوم به متی‌سیلین بودند و ۱۳ جدایه دارای ژن *mecA* بودند. در مطالعه حاضر ۱۰ جدایه بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس (۳۳/۴%) مقاوم به متی‌سیلین و دارای ژن *mecA* بودند. به نظر می‌رسد تفاوت در فراوانی این ژن و دیگر ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به متی‌سیلین در جدایه‌ها، در ایجاد فراوانی جدایه‌های مقاوم در مناطق مختلف کشور و نیز در سال‌های مختلف تاثیرگذار باشد.

در مطالعه Chambers [۲۹] مشخص شد که حضور ژن *mecA* باعث مقاومت به متی سیلین شده، در حالیکه در سویه‌های فاقد *mecA*، مقاومت به متی‌سیلین کاهش می‌یابد. در مطالعه Beha و همکاران [۳۰] با تاثیر نانوذرات طلا حاوی اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس علیه *mecA*، کاهش رشد جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس و کاهش بیان ژن *mecA* نشان داده شد. در مطالعه Rashid و همکاران [۳۱] مشخص شد که بیان ژن *mecA* در جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس تحت تیمار با نانوذرات نقره در مقایسه با جدایه‌های بدون تیمار با نانوذرات کاهش یافت و کاهش رشد جدایه‌ها گزارش شد. در مطالعه حاضر کاهش بیان ژن *mecA* و کاهش رشد و کشندگی اوژنول در جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند کاهش بیان ژن *mecA* یکی از اهداف ضد باکتریایی اوژنول در این جدایه‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که اوژنول می‌تواند حداقل از طریق ۱) کاهش بیان ژن *mecA* و ۲) اتصال بالقوه مهاری به پروتئین mecA در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس اثرات مهار رشد داشته باشد.

منابع

[1] Tafaroji J, Aghaali M, Heydari H. An Investigation of the Frequency of Staphylococcus aureus Nasal Carriers and its Antibiotic Susceptibility Pattern in the Staff of Different Wards of Qom Hazrat Masumeh Hospital, 2015, Iran. Qom University of Medical Sciences Journal. 2017; 10(11): 79-84.

[2] Sarrafzadeh F, Sohrevardi SM, Abousaidi H, Mirzaei H. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Iranian children: a systematic review and meta-analysis. Clin Exp Pediatr. 2021; 64(8): 415-21.

[3] Al-Talib HI, Yean CY, Al-Jashamy K, Hasan H. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus nosocomial infection trends in Hospital Universiti Sains Malaysia during 2002-2007. Ann Saudi Med. 2010; 30(5): 358-63.
[4] Jafari-Sales A, Jafari B. Evaluation of the Prevalence of mec A Gene in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Clinical Specimens of Hospitals and Treatment Centers. Pajouhan Scientific Journal. 2019; 17(3): 41-7.
[5] Williams MC, Dominguez SR, Prinzi A, Lee K, Parker SK. Reliability of mecA in Predicting Phenotypic Susceptibilities of Coagulase-Negative Staphylococci and Staphylococcus aureus. Open Forum Infectious Diseases. 2020; 7(12).
[6] Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Crit Rev Microbiol. 2017; 43(6): 668-89.
[7] Khalil AA, Rahman Uu, Khan MR, Sahar A, Mehmood T, Khan M. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. RSC Advances. 2017; 7(52): 32669-81.
[8] Shafira KF, Azad AK, Labu ZK, Helal Uddin ABM, editors. Extraction and Quantification of Eugenol from Clove Buds Using HPLC2020.
[9] Hu Q, Zhou M, wei S. Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field. Journal of Food Science. 2018; 83(6): 1476-83.
[10] Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. Journal of Ethnopharmacology. 2010;130(1):107-15.
[11] Elbestawy MKM, El-Sherbiny GM, Moghannem SA. Antibacterial, Antibiofilm and Anti-Inflammatory Activities of Eugenol Clove Essential Oil against Resistant Helicobacter pylori. Molecules. 2023; 28(6): 2448.
[12] Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(11): 6489-94.
[13] Machtelinckx T, Van Leeuwen T, Van De Wiele T, Boon N, De Vos WH, Sanchez J-A, et al. Microbial community of predatory bugs of the genus Macrolophus(Hemiptera: Miridae). BMC Microbiology. 2012; 12(1): S9.
[14] Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. Critical Reviews in Microbiology. 2017; 43(6): 668-89.
[15] Rahbar Takrami S, Ranji N, Sadeghizadeh M. Antibacterial effects of curcumin encapsulated in nanoparticles on clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa through downregulation of efflux pumps. Molecular Biology Reports. 2019; 46(2): 2395-404.
[16] Imani Pirsaraei B, Ranji N, Asadpour L. Investigation the Effect of Micelle Nanoparticles Containing Curcumin on Ciprofloxacin Resistant Isolates of Pseudomonas Aeruginosa and on mexC and mexD Genes Expression. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2018 ;21(2): 10-20.
[17] Salehzadeh A, Hashemi Doulabi MS, Sohrabnia B, Jalali A. The Effect of Thyme (Thymus vulgaris) Extract on the Expression of norA Efflux Pump Gene in Clinical Strains of Staphylococcus aureus. Journal of Genetic Resources. 2018; 4(1): 26-36.
[18] Ashabani A, Raissy M, Sharafati Chaleshtori R. Enhancing Antibacterial Properties: Thymus daenensis Oil in Nanostructured Delivery Systems Versus Traditional Form. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2024; 33(229): 14-26.
[19] Ahmadi Roudbaraki Z, Ranji N, Soltani Tehrani B. Deregulation of Mexb Gene in Ciprofloxacin Resistant Isolates of Pseudomonas Aeruginosa Treated with Silibinin-Encapsulated in Nanoparticles. Babol-Jbums. 2017; 19(11): 42-9.
[20] Fekri Kohan S, Nouhi Kararoudi A, Bazgosha M, Adelifar S, Hafezolghorani Esfahani A, Ghaderi Barmi F, et al. Determining the potential targets of silybin by molecular docking and its antibacterial functions on efflux pumps and porins in uropathogenic E. coli. International Microbiology. 2024.
[21] Naim N, Bouymajane A, Oulad El Majdoub Y, Ezrari S, Lahlali R, Tahiri A, et al. Flavonoid Composition and Antibacterial Properties of Crocus sativus L. Petal Extracts. Molecules. 2022; 28(1).
[22] Wijesundara NM, Lee SF, Cheng Z, Davidson R, Rupasinghe HPV. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against Streptococcus pyogenes through cell membrane damage. Scientific Reports. 2021; 11(1): 1487.
[23] Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by

disrupting the cellular membrane. J Ethnopharmacol. 2010; 130(1): 107-15.
[24] Jeyakumar GE, Lawrence R. Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against Escherichia coli. Journal of Herbal Medicine. 2021; 26: 100406.
[25] Bai J, Li J, Chen Z, Bai X, Yang Z, Wang Z, et al. Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens. LWT. 2023; 173: 114249.
[26] Jafari-Sales A, Jafari B. Evaluation of the Prevalence of mec A Gene in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Clinical Specimens of Hospitals and Treatment Centers. umsha-psj. 2019; 17(3): 41-7.
[27] Zerehsaz J, Najar Peerayeh S. Prevalence of mecA, tsst1, and pvl, as Well as agr Specific Groups in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus from Patients Admitted to Hospitals in Tehran, Iran. muq-journal. 2020; 14(9): 59-68.
[28] Naebi S, Ghiamirad M. The Prevalence of Methicillin Resistance and the Presence of mecA and pvl Genes in Staphylococcus aureus Isolated from Valiasr Hospital, Tabriz, Iran. Journal of Isfahan Medical School. 2021; 39(645): 778-85.
[29] Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clinical Microbiology Reviews. 1997; 10(4): 781-91.
[30] Beha MJ, Ryu JS, Kim YS, Chung HJ. Delivery of antisense oligonucleotides using multi-layer coated gold nanoparticles to methicillin-resistant S. aureus for combinatorial treatment. Materials Science and Engineering: C. 2021; 126:112167.
[31] Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on mecA gene expression in methicillin-resistant samples of Staphylococcus aureus. New Cellularand Molecular Biotechnology Journal. 2020; 11(41): 67-82.

Journal of Developmental Biology
Vol. 16, No.2, Spring 2024

Eugenol effect, active compound of clove oil, on growth inhibition of methicillin resistant isolates of *Staphylococcus aureus* through potential interaction with PBP2 and downregulation of *mecA* gene

Khodadadi N.[1], Ataei-e Jaliseh S.[2 *]

[1] Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2] Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

* (Corresponding author): atayi. somayeh@yahoo.com

Received: February.2024 Accepted: June.2024

Abstract

Background and Objectives: Eugenol is the major constituent of clove essential oil, which is known as an antibacterial and anti-oxidant agent. *Staphylococcus aureus* is most common pathogens that caused nosocomial infections and some bacterial infections death. In this study, the effect of Eugenol on the expression of *mecA* gene and the interaction with mecA protein (PBP2a) was evaluated in methicillin resistant isolates of *S. aureus*.

Materials and methods: Antibacterial activity of eugenol was investigated in isolates of *Staphylococcus aureus* with DISC diffusion, MIC and MBC. Interaction between Eugenol and mecA protein (PBP2) was evaluated with molecular docking. The expression of *mecA* gene was assessed in Eugenol treated and untreated isolates by Q-RT-PCR.

Results: The results of this study showed that eugenol in 80% of *Staphylococcus aureus* isolates inhibited growth with DISC diffusion method. MIC and MBC of Eugenol in the most isolates were determined 5. 22 mg/ml and 10. 44 mg/ml, respectively. *In silico* analysis showed interaction between eugenol and PBP2. *mecA* gene downregulated 0. 84 fold in Eugenol treated isolates (5. 22 mg/ml) in compared to control.

Conclusion: It seems that eugenol led to growth inhibition of *S. aureus* isolates through both interaction with PBP2 and *mecA* gene downregulation.

Keywords: Eugenol, *In silico, mecA*, Q-RT-PCR, *Staphylococcus aureus*