Journal of Microbial World
Volume 15, No. 4, March 2023

Original Article

Effect of silver nanoparticles on the expression of pvl and tsst genes of *Staphylococcus aureus* in Real-time PCR

Yasaman Dastgir [1], Zahra Keshtmand[2], Katayoun Borhani[3]

[1]Master of student, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor,Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Assistant Professor ,Department of Environment and Food industry Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and objective: Nowadays, research on nanoparticles as antimicrobial compounds is increasing.*Staphylococcus aureus* is an important nosocomial pathogen that produces a wide range of exotoxins that are involved in causing disease in the host.The aim of this study was to investigate the effect of silver nanoparticles (AgNPs) on the expression of pathogenic genes of pvl and tsst genes in *Staphylococcus aureus*.

Methods and methods: In this experimental study, the minimum growth inhibition concentration of silver nanoparticles was determined by Broth microdilution method. First, the lowest concentration of silver nanoparticles that inhibits bacterial growth was determined and then at a concentration lower than that, the expression of pvl and tsst genes in *Staphylococcus aureus* was studied by Real-Time PCR method. Data were analyzed using one-way ANOVA, Tukey test and P-value < 0.05.

Results: Silver nanoparticles with concentration 62.5µg/ml had growth effect on *Staphylococcus aureus* bacteria. Also at concentration 31.25 µg/ml, the expression of pvl and tsst genes in Staphylococcus aureus was significantly reduced compared to the reference gene (rpo) (P <0.001).

Conclusion: According to the results of the present study, silver nanoparticles can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria and reduce the expression of virulence genes pvl and tsst.

Keywords: Silver nanoparticles, pvl, tsst,*Staphylococcus aureus*.

Received: 30 August 2022 Revised: 11 December 2022 Accepted: 5 February 2023

Correspondence to: Zahra Keshtmand
Tel: +98 9187340515
E-mail: zkeshtmand2001@gmail.com
Journal of Microbial World 2023, 15(4): 304-313
DOI:10.30495/jmw.2022.1947177.2005

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره چهارم (پیاپی ۵۳) زمستان ۱۴۰۱
صفحات ۳۱۳-۳۰۴

Original Article

اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های pvl و tsst استافیلوکوکوس اورئوس به‌روش Real-time PCR

یاسمن دستگیر[۱]، زهرا کشتمند[۲*]، کتایون برهانی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲]استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۳]استادیار،گروه مهندسی محیط زیست و صنایع غذایی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه تحقیقات در زمینه نانوذرات به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی روبه افزایش است. استافیلوکوکوس اورئوس یک عامل مهم بیماری‌زای بیمارستانی است که طیف وسیعی از اگزوتوکسین‌هایی را تولید می‌کند که در ایجاد بیماری در میزبان نقش دارند. تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر نانوذرات نقره (AgNPs) بربیان ژن‌های بیماری‌زای pvl و tsst در استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، حداقل غلظت مهار رشد نانو ذرات نقره با روش میکرودایلوشن براث تعیین شد. در ابتدا کمترین غلظت مهار کننده رشد از نانوذرات نقره تعیین و سپس در غلظت پایین‌تر از آن، میزان بیان ژن‌های pvl و tsst در استافیلوکوکوس اورئوس با روش Real-time PCR بررسی شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از anovaیک طرفه، تست توکی و P-value کمتر از ۰/۰۵ ارزیابی شد.

یافته‌ها: نانو ذرات نقره باغلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر مهارکنندگی رشد بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشتند. همچنین در غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیان ژن‌های pvl و tsst در باکتری نام‌برده در مقایسه با ژن رفرنس (rpo) به نسبت معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر نانوذرات نقره می‌تواند سبب مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و کاهش بیان ژن‌های بیماری‌زا pvl و tsst شود.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، pvl، tsst، استافیلوکوکوس اورئوس.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۸ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۹/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که از نظر پزشکی مهم‌ترین گونه در جنس استافیلوکوک محسوب می‌شود. این باکتری یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی است که در خلال چندین دهه گذشته از جمله عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های کسب‌شده در سطح جامعه و بیمارستان بوده و می تواند موجب ایجاد طیف وسیع و متنوعی از بیماری‌ها مانند اندوکاردیت، باکتریمی، استئومیلیت، مسمومیت غذایی، سپتیسمی، عفونت‌های پوستی، عفونت‌های زخم، عفونت‌های بافت نرم، عفونت پس از جراحی و گاهی مرگ و میر در انسان گردد. تقریباً به طور ثابت در ۲۰ درصد جمعیت کلونیزه شده و

*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
تلفن: ۰۹۱۸۷۳۴۰۵۱۵ پست الکترونیک: zkeshtmand2001@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

به طور متناوب در ۵۰ درصد جمعیت نیز شناسایی شده است (۱و۲).

استافیلوکوکوس اورئوس طیف گسترده‌ای از اگزوپروتین‌ها و توکسین‌های پروتینی را تولید می‌نماید که در روند بیماری‌زایی باکتری موثر می‌باشد، این فاکتورهای بیماری‌زا، طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها را سبب می‌شوند. برخی از این عوامل باعث اتصال باکتری به سطوح شده و برخی مانع از عملکرد سیستم ایمنی می‌شوند و همه این عوامل می‌توانند باعث ایجاد آسیب در میزبان شوند (۳).

اگزوتوکسین‌هایی از قبیل توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ (*TSST-1*) متعلق به گروهی از توکسین‌ها هستند که به‌عنوان سوپر آنتی‌ژن‌های پیروژنیک (تب‌زا) و از فاکتورهای مهم بیماری‌زایی شناخته شده اند که تاثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود دارند. بیشتر سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری سندروم شوک سمی، این توکسین را تولید می‌کنند. سوپر آنتی‌ژن‌ها با فعال‌سازی ناحیه متغیر روی گیرنده سلول‌های T(TCR) و MHC کلاس ۲ باعث تحریک سلول‌های T می‌شوند. سلول‌های T فعال شده سایتوکاین‌هایی از قبیل اینترلوکین-۱ و فاکتور تومور نکروزی آلفا آزاد کرده که این عوامل باعث ایجاد شوک و آسیب بافتی می‌شوند(٤).

یکی دیگر از عوامل بیماری‌زایی باکتری اگزوتوکسین پنتون والنتین لوکوسیدین (PVL) است که اولین بار در سال ۱۹۳۰ در *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شد (۵)، این سم دارای دو جزء است که هر دو جزء لوکوسیدین خاصیت آنتی‌ژنی دارند و قابل تبدیل به توکسوئید می‌باشند که با ایجاد مقاومت در مقابل فاگوسیتوز قدرت تهاجمی استافیلوکوک را افزایش داده، جذب گردش خون شده و با علائم بالینی موجب گرفتاری چندین عضو مختلف می‌شود. این علائم شامل تب، کاهش فشار خون، اسهال، درد عضلانی، پنومونی‌های نکروز دهنده و بثورات شبه مخملکی است. لوکوسیدین پنتون والنتین توسط اکثرسوش‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شود (٦) و موجب افزایش قدرت نفوذپذیری غشای سلولی و در نتیجه سبب لایز شدن لوکوسیت‌ها و نکروز بافت می‌شود (۷) در سال‌های اخیر مطالعات متعددی، نانوذرات فلزی را به‌عنوان ترکیبات دارای اثرات ضد باکتریایی گزارش کرده‌اند.

نانوذرات، ذرات جامد کلوئیدی اند که از ده‌ها یا هزاران اتم تشکیل شده و با اندازه ای در محدوده ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به عنوان یکی از پرکاربردترین مواد در علم نانوتکنولوژی به شمار می‌روند (۸). شناسایی بیومولکول‌ها، انتقال هدفمند داروها، واکسن‌ها و ژن‌ها، درمان برخی از بیماری‌ها، افزایش عمر سلول‌های مغزی و تولید مواد ضدمیکروبی تنها بخش کوچکی از کاربردهای نانوذرات می‌باشند همچنین فرضیات زیادی در خصوص استفاده از نانوذرات برای تشخیص و درمان بیماری‌ها ارائه شده است که برخی از آن‌ها در مراحل آزمایشگاهی با موفقیت‌هایی نیز همراه بوده است، از این رو انتظار می‌رود که نانوذرات بیشترین کاربرد را در نانوتکنولوژی پزشکی داشته باشند(۹). از میان آن‌ها، نانوذرات نقره با توجه به حجم و خواص منحصر به فرد شیمیایی و فیزیکی، فعالیت ضدمیکروبی وسیعی علیه طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها نشان داده‌اند و پتانسیل ضدباکتریایی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نیز از آن‌ها گزارش شده است (۱۰).

مکانیسم‌های مختلفی در فعالیت ضد باکتری نانوذرات نقره نقش دارند. این نانوذرات می‌توانند نفوذپذیری غشاء باکتری را تغییر داده و موجب ورود نانوذرات نقره به درون سلول گردند. میان‌کنش نانوذرات با پروتین‌های داخل سلولی، به خصوص پروتین‌های غشایی حاوی سولفور و DNA میکروبی می‌تواند با تقسیم سلولی مداخله نموده (۱۱) به‌گونه‌ای که ماده ژنتیکی توانایی همانندسازی را از دست داده و در ادامه تقسیم سلولی متوقف و منجر به مرگ سلولی شود (۱۲) از سویی نسبت سطح به حجم پایین نانوذرات، می‌تواند فعالیت ضدمیکروبی را افزایش دهد و باعث ایجاد تعامل بیشتر نانومواد با میکروارگانیسم‌ها شود. شیمی، اندازه، شکل ذرات و پتانسیل زتا از مهم‌ترین متغیرهای موثر بر فعالیت ضد باکتریایی هستند (۱۳). همچنین، مکانیسم‌های دیگری که پیشنهاد می‌شود این است که، نقره عامل تغییر در میزان نفوذپذیری غشاء سلول نسبت به یون پتاسیم است. نانوذرات نقره بر فعالیت پمپ

سدیم-پتاسیم و عملکرد میتوکندری موثر بوده، و منجر به تولید گونه‌های اکسیژن آزاد می‌شود (۱۴).

یکی از نتایج کاربردی نانوبیوتکنولوژی استفاده از نانوذرات به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی به خصوص در عفونت‌های بیمارستانی باکتریایی می‌باشد. با توجه به نقش ژنیِ باکتری‌ها در ایجاد بیماری، شناسایی ترکیباتی که بیان این ژن‌ها را در باکتری‌ها کاهش دهد می‌تواند در پیشگیری و درمان بیمارهای میکروبی به‌ویژه باکتریایی کاربرد داشته باشد. امروزه پژوهشگران در جستجوی یافتن راه‌حل‌های جدید و موثر برای کاهش و مهار این عوامل در باکتری‌های بیماری‌زا هستند. از این رو، با توجه به مکانیسم‌های تاثیرگذار شناخته شده از نانوذرات، به‌ویژه نقره، هدف از این مطالعه بررسی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر مهار رشد باکتری و تاثیر آن بر بیان ژن‌های ایجاد کننده بیماری، از جمله *pvl* و *tsst* در *استافیلوکوکوس اورئوس* است.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه نانوذرات نقره: نانوذرات نقره با قطر میانگین ۲۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان با درصد خلوص ۹۹/۹۹٪، تهیه شد.

ب) تهیه باکتری: در این مطالعه از سویه استاندارد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC25923.) خریداری شده از شرکت بهار افشان استفاده شد. باکتری روی محیط‌های کشت Muller Hinton Agar (MHA) & Muller Hinton Broth (MHB)) (Merck, Darmstadt, Germany کشت داده شد و برای ارزیابی‌های بعدی به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید.

برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی یک کلنی از کشت ۲۴ ساعته از باکتری در محیط MHA برداشته و به محیط MHB اضافه شده، پس از آن میزان جذب نوری سوسپانسیون تهیه شده در طول موج ۶۲۵nm معادل غلظت نیم مک فارلند (cells/ml) ۰/۰۸ – ۰/۰۱ تنظیم گردید. سپس سوسپانسیون تهیه شده معادل غلظت نیم مک فارلند در ابتدا تا حدود ۱:۲۰ و سپس ۱:۱۰ رقیق گردید. در نهایت از سوسپانسیونی با رقت ۱:۱۰cells/ml، ۵×۱۰^{۵} به هر یک از چاهک‌های پلیت میکروتیتر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد (۱۵).

ج) تعیین حداقل غلظت رشد نانوذرات نقره: تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) با روش رقیق‌سازی در مایع یا میکرودایلوشن‌براث بر اساس استاندارد CLSI (ClinicaLaboratory Standards Institute) انجام شد. یک سری ۹ لوله‌ای با رقت‌های ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره استفاده گردید. همچنین، به‌عنوان کنترل مثبت از لوله حاوی محیط کشت همراه با میکروب تلقیح شده و برای کنترل منفی و به منظور اطمینان از استریل بودن مراحل انجام کار و نیز سوسپانسیون نانوذرات نقره سنتز شده، در لوله دیگر محیط کشت حاوی محلول با غلظت نیم میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس نتایج خوانده شد. نهایتاً، کدورت تمام چاهک‌ها با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شدند.

اولین رقتی که در آن هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد و پس از کشت لوله‌های فاقد کدورت روی محیط مولر هینتون آگار، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت (۱۶).

د) بررسی بیان ژن‌های pvl و tsst به کمک Real-time PCR: ابتدا با تکنیک PCR حضور ژن‌های *pvl* و *tsst* در سویه باکتری استاندارد (ATCC25923.)تایید شد. بعد از آن در سویه آزمایش، برای بررسی بیان ژن‌های مود مطالعه از RNA استخراج شده *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت subMIC (۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نانوذرات نقره توسط دستورالعمل تهیه شده از کیت PLUS RNAX (شرکت سیناژن، ایران) استفاده شد.

غلظت RNA مورد استفاده حدود ۱ تا ۲ میکروگرم در نظر گرفته شد. برای تایید درصد خلوص RNA استخراج شده، جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه نانو دراپ

(Nanodrop Bio Tek Epoch, USA) اندازه‌گیری شد. جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای اطمینان از عدم آلودگی پروتینی و جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر برای اطمینان از عدم آلودگی نمک و سایر مواد آلی سنجیده شد که برای RNA، این نسبت جذب برابر با ۲ و قابل قبول بود. همچنین باندهای ژن‌ها نیز روی ژل آگاروز ۲درصد در دستگاه الکتروفورز مشاهده گردید (۱۷). برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده از کیت مخصوص سنتز (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea) و برای حذف آلودگی‌ها، قبل از سنتز cDNA، RNA استخراج شده ازآنزیم DNaseI (Fermentase, Waltham, USA) استفاده شد (۱۸). تست Real-time PCR با استفاده از مسترمیکس حاوی سایبر گرین (انگلستان، Applied Biosystem) و دستگاه Real-time Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Australia) انجام شد. چرخه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه بود. مرحله نهایی به منظور ترسیم منحنی ذوب به‌صورت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. *opr* به‌عنوان ژن کنترل مثبت درنظرگرفته شد و برای هر نمونه، واکنش سه مرتبه انجام گرفته و میانگین مقادیر به‌دست آمده به عنوان کمیت بیان ژن برای آن نمونه، در نظر گرفته شد.

بیان ژن با استفاده از فرمول مرجع نسبی بیان ΔΔCt انجام شد. همچنین نسبت ژن‌های هدف بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* به ژن مرجع (opr) $2^{\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (۱۹).

ΔCt نمونه تیمار نشده استاندارد − ΔCt نمونه تیمار شده با نانوذرات نقره= ΔΔCt

طراحی پرایمرها با نرم افزارهای Primer Express و Runner Gene و تایید پرایمرها، با استفاده از توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی و ابزار آنلاین BLAST در سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)، انجام شد. در جدول شماره ۱ توالی جفت پرایمرهای جلوبر و برگشتی سه ژن بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* و *rpo* مشخص شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای *rpo*B، *pvl* و *tsst* در *استافیلوکوکوس اورئوس*.

نام ژن	توالی پرایمر
*rpo*B	F5′ CTGGTATGGCTCGTGATG 3′ R5′ CTGGTATGGCTCGTGATG 3′
Pvl	F 5′ TTGCTATCCAATACAGTTGATG3 ′ R 5′ACTTATCGGAATCTGATGTTG3′
tsst	F 5′ ′TACCTACTCCAATAGAACTACCT 3′ R 5′CGCTTGAACGATATAATCCAT3′

ه) *آنالیز آماری*: در این مطالعه محاسبه آماری و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزارSPSS و آزمون واریانس یک طرفه و روش آماری تست توکی انجام گرفت. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شدند و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

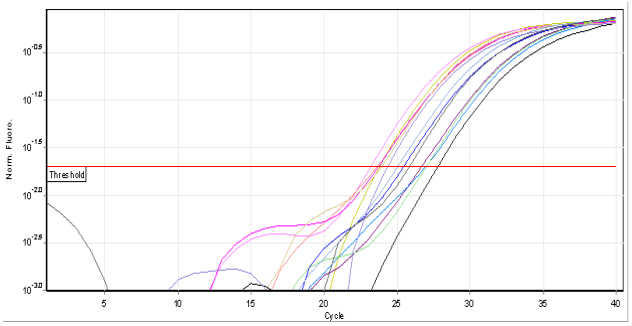
یافته‌ها

به‌منظور بررسی حداقل غلظت مهارکننده رشد نانوذرات نقره، غلظت‌های مختلف (۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کمترین غلظتی بود که در حضور آن کدورتی مشاهده نشد و به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده (MIC) در نظر گرفته شد، همچنین برای بررسی تاثیر غلظت نانو ذرات نقره بر بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* از بالاترین غلظت زیر مهار رشد (subMIC) (۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد.

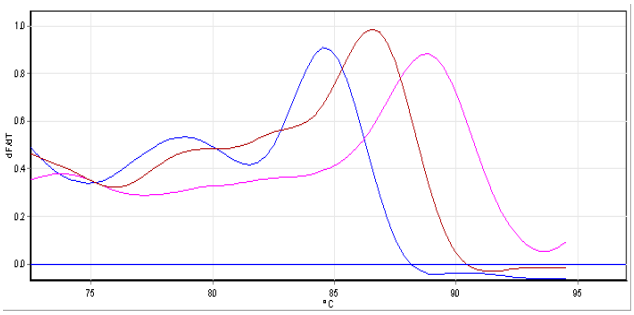
در شکل ۱ نتایج حاصل از تکثیر بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* در *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره با غلظت (۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داده شده است. همچنین به‌منظور تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده از منحنی ذوب حاصل از واکنش Real time PCR استفاده شد (شکل ۲).

بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره با غلظت (۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر

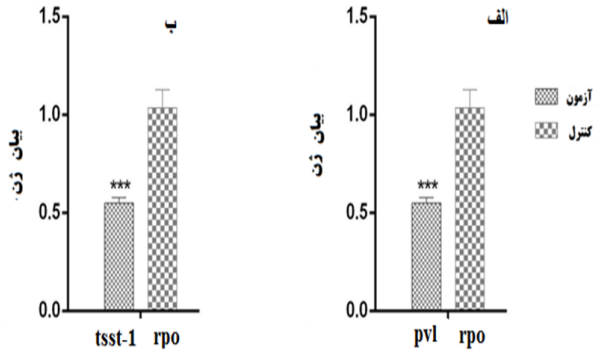
میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه کنترل ژن *rpo* کاهش معناداری نشان داد.(P<۰۰۱/۰) (شکل ۳ الف، ۳ب) که در واقع نشانه‌ی تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر کاهش بیان این دو ژن در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است.



شکل ۱: تکثیر ژن‌های*rpo* (نمودار آبی)، *tsst* (نمودار ارغوانی) و *pvl* (نمودارقرمز) در *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره.



شکل ۲: منحنی ذوب ژن‌های *opr* در دمای ۵/۸۴ ، *tsst* در دمای ۸۸/۸۸ و *pvl* در دمای ۸۶/۵۰



شکل ۳: مقایسه میزان بیان ژن‌های اگزوتوکسین *pvl* (الف)و *tsst-1* (ب) *استافیلوکوکوس اورئوس تیمار* شده با غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیترنانو ذرات نقره. مقادیر براساس میانگین± خطای انحراف معیار است. *** سطح اختلاف معنی‌دار P<۰/۰۰۱ با ژن فرنس*rpo*.

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که فاکتورهای بیماری‌زای متنوعی را تولید می‌کند که در ایجاد عفونت اهمیت دارند، از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به دو ژن *pvl* و *tsst* اشاره کرد. مطالعه حاضر با هدف تعیین کمترین غلظت مهار رشد نانوذرات نقره بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و بررسی غلظت پایین‌تر از غلظت مهار رشد باکتری بر بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت.

امروزه با پیشرفت فناوری نانو و مطالعات انجام شده درباره کاربردهای نانوذرات، استفاده از آن‌ها در علوم پزشکی به‌ویژه بخش درمان و دارویی اهمیت خاصی پیدا کرده است و از آنجا که نانوذرات فلزی در مقایسه با یون‌های فلزی از سمیت کمتری برخوردار بوده، قابلیت تجویز در بدن موجودات زنده را داشته و دارای تأثیر طولانی مدت می‌باشند، از این رو بررسی تاثیر نانوذرات بر بیان ژن‌های بیماریزا در باکتری‌ها احتمالا بتواند گام موثری در کاهش بیماری‌های مرتبط با این باکتری‌ها داشته باشد (۱۴).

لکوسیدین پنتون ولنتین (*PVL*) یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس*، یک گاما توکسین است که توسط یک باکتریوفاژ حمل می‌شود و قابلیت انتقال به سایر استافیلوکوک‌ها را نیز دارد. این توکسین علیه غشای خارجی سلول‌های پلی مورفونوکلئار، مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای انسانی عمل کرده و بسته به غلظت توکسین، باعث باز شدن کانال‌های کلسیم، نکروز و آپوپتوزیس لکوسیت‌های انسانی می‌شود (۲۰).

عامل بیماری‌زای دیگر در *استافیلوکوکوس* توکسین سندروم شوک توکسیک (*TSST-1*) است که از فاکتورهای بیماری‌زایی بسیار مهم و جزء سوپر آنتی‌ژن‌ها بوده و اثرات بسیار مهمی بر میزبان خود دارد. بیشتر سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری سندروم شوک سمی، توکسینی تولید می‌کنند که به عنوان *TSST-1* شناخته شده است. ژن ***tsst*** که عامل ترشح این توکسین است، می‌تواند در میان سویه‌های

استافیلوکوکوس‌اورئوس در جامعه به راحتی منتقل شود(۲۱).

خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره در پروژه‌های تحقیقاتی زیادی مورد مطالعه قرار گرفته و دلایل متنوعی برای این پدیده ذکر شده است. از این رو استفاده از نانوذرات با فرضیه تاثیرگذاری بر بیان ژن‌های بیماری‌زا می‌تواند در جلوگیری از ایجاد بیماری توسط این باکتری‌ها نقش موثری داشته باشد که برای اولین بار در این مطالعه اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌روش Real-time PCR بررسی شد.

نتایج تست MIC نشان داد که کمترین غلظت باکتری‌کشی نانوذره نقره ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* در *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱) که در واقع نشانه‌ای بر تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر کاهش رشد این باکتری است.

رشید (Rashid) و همکارانش در ۲۰۱۹ اثرنانوذرات نقره بر بیان ژن *mecA* در نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را بررسی و تاثیر نانوذره بر بیان ژن *mecA* را به صورت معنادار گزارش دادند (۲۲). همچنین Chaudhari و همکاران تاثیر نانو ذرات نقره برکاهش بیان ژن‌های بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان دادند (۲۳).

در سال۲۰۱۹ توسط جعفری (Jafarei) و همکاران خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره و عصارهٔ متانولی گیاه گل همیشه بهار (*Calendula officinalis*) بر باکتری‌های پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش داده شد (۲۴).

در سال ۲۰۱۸ توسط شاندیز (Shandiz) و همکاران ،اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر بیان برخی ژن‌های القا کننده بیماری توسط جدایه‌های *استرپتوباکتر رومانی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک نشان داده شد (۲۵). نتایج پژوهش حاضر نیز، همسو با مطالعات پیشین است.

برای خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره مکانیسم‌های احتمالی پیشنهاد شده و گزارشات نشان می‌دهد که تغییر مورفولوژی غشای باکتریایی باعث افزایش نفوذپذیری نانوذرات نقره می‌شود و نفوذ غیرقابل کنترل نانوذرات نقره به درون سلول اتفاق می‌افتد (۲۶و۲۷). نانوذرات نقره با عبور از غشا و وارد شدن به سلول، سبب القا آسیب در غشای سلول باکتری شده که به نوبه خود فعالیت برخی آنزیم‌های غشا را مهار و منجر به غیرفعال کردن و مهار LDH، نشت پروتین‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها از جمله توکسین‌ها شده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌گردد (۲۸).

هم‌چنین یکی دیگر از دلایل اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره می‌تواند آزادسازی یون‌های نقره باشد که به اکسیژن، گوگرد و نیتروژن مولکول‌های زیستی در سلول متصل و منجر به مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شود. هم چنین نانوذرات نقره می‌توانند باعث تولید رادیکال‌های سمی اکسیژن در سلول‌های باکتریایی شده و بر DNA اثر گذاشته و باعث آسیب آن شوند (۲۹). بنا به گفته محققان نانوذرات اکسیدنقره می‌توانند با DNA سیتوپلاسمیِ باکتری و پروتین‌های باکتریایی و به خصوص در مراحل حیاتی با آنزیم‌هایی که در زنجیره انتقال الکترون شرکت دارند و همچنین با پپتید و گلیکان‌های دیواره سلولی و غشای پلاسمایی واکنش داده و باعث تخریب کامل غشای باکتری شوند (۳۰).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نتایج بررسی قدرت بازدارندگی رشد باکتری و بیان ژن‌های *pvl* و *tsst* نشان داد که نانوذرات نقره به عنوان عامل مهارکننده رشد باکتری تاثیر معناداری بر بیان این ژن‌ها دارند. از سویی با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی لازم است از داروهای جایگزین مناسب و با عوارض جانبی کمتر استفاده شود و از آنجا که نانوذرات، فعالیت ضدمیکروبی را با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی از جمله تاثیر بر بیان ژن‌های بیماریزا اعمال می‌کنند این ویژگی محققان را قادر ساخته تا بررسی‌های بیشتری از تاثیر نانوذرات برای پیشگیری، تشخیص و درمان عفونت‌ها و همچنین کنترل

بیوفیلم‌ها و توکسین‌ها انجام دهند. با این حال، لازم است مطالعات گسترده‌ای در مورد تاثیر نانومواد بر بیان ژن‌های ویرولانس باکتری‌ها انجام شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی ازپایان‌نامه دانشجویی درمقطع کارشناسی ارشد با کدپایان‌نامه ۱۰۱۳۰۵۶۰۹۷۲۰۱۰می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی اجرا شده است.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1.Beik J.Abed Z.Ghoreishi FS.Hosseini-Nami S. Mehrzadi S.Shakeri-Zadeh A.et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. J Control Release.2016; 235: 205-221.

2.Havaei SA.Azimian A. Fazeli H.Naderi M.Ghazvini K.Samiee S.Genetic characterizatio of methicillin Resistant and sensitives Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* strains isolated from different iranian hospital. Microbiol. 2012;50:3581-3585.

3. Ranjkesh A. Salari Z. Nejat M. Behboudi E. Ramezani A. Zandi M.et al. Identification of Panton-Valentine leukocidin virulence gene in methicillin—resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens of burn patients in Zare Hospitals of Sari. Iran. J Acute Dis . 2020: 9(3):121-125.

4.Arabestani MR.. Rastiany S Mousavi SF . Ghafel S. Alikhani MY. Identification of toxic shock syndrom and exfoliative toxin genes of *Staphylococcus aureus* in carrier persons. resistant and susceptible methicillin. Tehran Univ Med J . 2015;73(8):554-560. [In persion]

5. Budzy ´nska. A. Skowron. K. Kaczmarek. A.Wietlicka-Piszcz. M. Gospodarek-Komkowska. E. Virulence Factor Genes and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Blood and Chronic Wounds. Toxins 2021: 13(491);1-13.

6. Larsen SAH.Kyhl K.Baig S.Petersen A. av Steinum M.R.Clemmensen S. et al. Life-Threatening Necrotizing Pneumonia with Panton–Valentine LeukocidinProducing. Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* in a Healthy Male Co-Infected with Influenza B. Infect Dis Rep. 2022: 14; 12–19.

7. Bruna T. Maldonado-Bravo F. Jara P. Caro N.Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications.Int J Mol Sci. 2021; 22(13): 7202.

8.Abdal Dayem. A.Hossain M. Lee S. Kim K. Saha S. Yang G. et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. Int J Mol Sci. 2017; 18(120):1-21.

9. Egbuna C . Parmar VC. Jeevanandam J. Ezzat Sh. Kingsley CIwuanyanwu P. et al. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. J Toxicol. 2021: 2021:1-17.

10. Rai M.K.Deshmukh S.D. Ingle AP.Gade AK.Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria .J Appl Microbiol. 2012; 112(5):841-852.

11.Dakal TC. Kumar A. Majumda RS. Yadav V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. Front. Microbiol. 2016;7: 1–17.

12.Li Y. Qin T. Ingle T. Yan J. He W. Yin JJ.et al. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. Arch Toxicol. 2017; 91:509–519.

13.Ávalos A.Haza AI. Morales P. Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukaemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts. Folia Biol. 2015; 61(1): 33–42.

14. Li W.Sun T. Zhou S.Ma Y. Shi Q. Xie X. et al. A comparative analysis of antibacterial activity.dynamics. and e_ects of silver ions and silver nanoparticles against four bacterial strains. Int Biodeterior Biodegrad .2017; 123:304–310.

15.Kavyani B. Alikhani MY. Arabestani MR. Moradkhani SH. Taheri M.The effect of garlic extract on the expression of genes elastase andexotoxin A in Pseudomonas aeruginosa. Tehran Univ Med Sci . 2016; 74(8): 584-590.

16. Platania V. Kaldeli-Kerou A. Karamanidou T. Kouki M.Tsouknidas A. Chatzinikolaidou M. Antibacterial Effect of Colloidal Suspensions Varying in Silver Nanoparticles and Ions Concentrations. J Nanomater. 2022; 12(31);1-14.

17.Pirigharaghie T shandiz AS. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on Bap Gene Expression in Antibiotic-Resistant Acientobacter bumanni Isolates using Real-Time PCR. J. Ilam Univ Med Sci.2018;26(4):175-185. [In persion]

18. Tong Zh . Qu Sh. Zhang J. Wang F . Tao J . Gao Zh. Zhang Zh. Modified protocol for RNA extraction from different peach tissues suitable for gene isolation and Real-Time PCR analysis. Mol Biotechno. 2012; 50(3):229-236.

19.Azizi O. Shahcheraghi F. Salimizand H.Modarresi F. Shakibaie MR. Mansouri S.Ramazanzadeh R. et al. Molecular analysis and expression of bap gene in biofilm forming multi drug-resistant Acinetobacter baumannii. Rep Biochem Mol Biol .2016; 5(1):68-74.

20.Cupane L. Pugacova N. Berzina D. Cauce V. Gardovska D. Miklasevics E. Patients with Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. Int J Mol Epidemiol Genet. 2012; 3(1): 48-55.

21. Mohammad Jani F. Amini K.Detection of Virulence (etA. etB and tst) and AntibioticResistance (mecA) Genes in *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated from Clinical Samples Using Multiplex-PCR Method. Payavard salamat J. 2017;11(6):610-617.

22.Rashid A. Molavi F. Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on mecA gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*. NCMBJ. 2020; 11 (41):67-82. [In persion]

23.Chaudhari PR. Masurkar SA. Shidore VB. Kamble SP. Effect of biosynthesized silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* biofilm quenching and prevention of biofilm formation. Nano-Micro Lett. 2012; 4(1): 34-39.

24.Jafari B. monadi sefidan AR. Comparative study on the effects of silver nanoparticles and methanolic extracts of Calendula officinalis on pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*. Bacillus cereus. Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa under laboratory conditions. J Sabzavar Univ Med Sci .2019; 27 (2): 165-171. [In persion]

25.Shandiz SA. Pirigharaghie T. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on Bap Gene Expression in Antibiotic-Resistant Acientobacter bumanni Isolates using Real -Time PCR. J Ilam Univ Med Sci. 2018; 26(4): 175-85. [In persion]

26.Miri A. Sarani M. Biosynthesis. characterization and cytotoxic activity of CeO2 nanoparticles.Ceramics International.2018; 44(11): 12642-12647. [In persion]

27.Ghadimi Asiabar F . Mirzaie A . Arasteh J.Antibacterial and cytotoxicity of synthesized silver nanoparticles using Erica carnea extract on breast cancer cell line (MCF-7) and analysis of its apoptotic effects. Rafsanjan Univ Med Sci .2019;26(6):84-94. [In persion]

28.Moulaie S . Mirzaie A. Aliasgari E. Antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles fabricated by the Artemisia scoparia extract against lung cancer cell line (A549). Feyz. J Kashan Univ Med Sci. 2018; 22(5): 487-496. [In persion]

29. Bayrami A. Mohammadi Arvanagh F. Zahri S. Bayrami M. Characterization and Evaluation of Antimicrobial Effects of ZnO/Ag Nanoparticles Synthesized by Milk Thistle Seed Extract (Silybum marianum): A Short Report. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2020; 19(5) :539-548. [In persion]

30.Mohamadzade Jahani P. Azizi H. Khatami M. Yaghobi H. Optimization of effective parameters on the suspension durability of green synthesis silver nanoparticles and evaluation their antimicrobial effect. J Torbat Heydariyeh Uni of Med Sci. 2020;8(1):36-47. [In persion]