



Peptide nucleic acid: the state-of-the-art toll for study and control of bacterial infections

Hanar Narenji ¹, Hossein Samadi Kafil ²

¹ Ph.D. of Medical Microbiology, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

² Associate Professor, Medical Microbiology, Drug Applied Research Center, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Abstract

The increasing emergence of antibiotic-resistant bacteria, coupled with the slow development of new therapeutic alternatives, underscores the urgent need for novel strategies to combat these pathogens. Peptide nucleic acids (PNAs) are synthetic molecules capable of binding to DNA and RNA, making them useful for a variety of applications, including gene expression inhibition and gene knockdown to suppress bacterial growth. To effectively target a selected gene, it is crucial to choose a homologous sequence with the highest activity, and the PNA sequence must be tailored to the characteristics of the target gene. By targeting conserved genes within a specific genus, it is possible to inhibit the growth of a broad spectrum of pathogens. This study reviews researches that have successfully achieved gene knockdown and bacterial growth inhibition. The findings offer a new perspective on therapeutic strategies, however, further investigations into the immunological responses, toxicity, and pharmacokinetics of PNAs are essential for their clinical application. Indeed, PNA could be used as a potential therapeutic option in future clinical applications.

Keywords: Peptide nucleic acids, gene knock down, Antibiotic resistance.

Received: 27 February 2025

Revised: 16 April 2025

Accepted: 22 May 2025

Correspondence to: Hossein Samadi Kafil

Tel: +98 09127184735

E-mail: Kafilhs@tbzmed.ac.ir

Journal of Microbial World 2025, 18 (1): 27 - 44



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.



پتید نوکلئیک اسید: ابزار نوین مطالعه و کنترل عفونت‌های باکتریایی

هنارنارنجی^۱، حسین صمدی کفیل^{۲*}

^۱ دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

^۲ دانشیار، گروه میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

در سال‌های اخیر، ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و روند کند پیشرفت در کشف داروهای ضد میکروبی جدید، کارایی روش‌های درمانی را محدود کرده است. در نتیجه، توسعه استراتژی‌های نوین برای مقابله با این باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. یکی از این راهکارها، استفاده از پتید نوکلئیک اسید است. PNA یک ترکیب سنتتیک است که قادر به اتصال به DNA و RNA بوده و کاربردهای متعددی دارد. یکی از مهم‌ترین کاربردهای این ترکیب، جلوگیری از بیان ژن است که می‌تواند مانع رشد باکتری‌ها شود. برای هدف‌گیری یک ژن خاص، انتخاب توالی همولوگ و هماهنگ با ژن، مورد نظر است. در این راستا، توالی PNA باید بر اساس ویژگی‌های خاص و وابسته به دوز انتخاب شود. همچنین، انتخاب توالی‌های محافظت‌شده در جنس‌های مختلف باکتریایی می‌تواند فعالیت ضد میکروبی با طیف گسترده را فراهم کند. در این مقاله مروری، چندین مطالعه تحقیقاتی بررسی شده است که در آن‌ها از PNAs به منظور حذف ژن‌های هدف و مهار رشد باکتری‌ها استفاده شده است. نتایج این مطالعات، چشم‌انداز جدیدی را برای درمان عفونت‌های باکتریایی ارائه می‌دهد. با این حال، انجام تحقیقات بیشتر برای ارزیابی ایمنی، سمیت و فارماکوکینتیک این ترکیبات ضروری است. در این صورت PNA می‌تواند به‌عنوان یک گزینه درمانی بالقوه در کاربردهای کلینیکی آینده مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پتید نوکلئیک اسید، حذف ژن، مقاومت آنتی بیوتیکی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۳/۱

ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۱/۲۷

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۹

مقدمه

نوکلئیک توجه بسیاری از دانشمندان علوم زیستی را به خود جلب کرده‌اند. این ترکیبات، به دلیل پتانسیل بالا در بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی، به‌عنوان ابزارهای قدرتمند در تحقیقات علمی و کاربردهای درمانی مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. از جمله مشابه‌های ساختگی اسیدهای نوکلئیک می‌توان به زنونوکلئیک اسید (Xenonucleic acid = XNA) اشاره کرد که خود شامل زیرمجموعه‌هایی مانند گلیسرونوکلئیک اسید (Glycol nucleic

گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و ظهور عفونت‌های میکروبی جدید، ضرورت تحقیقات برای شناسایی روش‌های نوین درمانی و کنترل عفونت‌ها را بیش از پیش آشکار ساخته است. طی چند دهه گذشته، مشابه (آنالوگ)‌های اسیدهای

(* آدرس برای مکاتبه: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تلفن: ۰۹۱۲۷۱۸۴۷۳۵

پست الکترونیک: Kafilhs@tbzmed.ac.ir



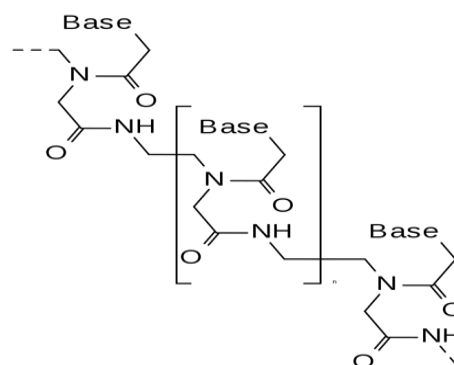
اندونوکلئازی). همچنین، PNA می‌تواند به‌عنوان بازدارنده در سطوح مختلف ژنتیکی عمل کند. یکی از کاربردهای مهم PNA، هدف‌گیری تسهیل‌کننده‌ها (Promoters) برای جلوگیری از اتصال فاکتورهای رونویسی و در نتیجه، مهار بیان ژن (ناک‌داون ژن) است. علاوه بر این، اتصال PNA به mRNA می‌تواند از ترجمه ژن جلوگیری کند (مکانیسم آنتی‌سنس). عوامل آنتی‌سنسی ضدباکتریایی معمولاً کوتاه حدود ۱۰ تا ۲۰ نوکلئوتید هستند و از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به (PNAs، لاکدونوکلئیک اسید (Locked Nucleic Acids) = LNAs) و فسفودیامیدات نوکلئیک اسید (Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers = PMOs) اشاره کرد. برخی از پروتئین‌ها و فاکتورهایی که در تنظیم بیان ژن نقش دارند به توالی‌های خاصی متصل می‌شوند، پپتید نوکلئیک اسیدهایی که حاوی این توالی‌ها باشند قادرند به‌طور اختصاصی به این فاکتورها متصل شده و آن‌ها را غیرفعال کنند (۶و۵).

۲. نفوذپذیری PNA به داخل سلول‌ها

یکی از چالش‌های استفاده از PNA، محدودیت در نفوذ به داخل سلول است. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که کژوگه کردن PNA با پپتیدهای نفوذکننده به سلول (Cell-Penetrating Peptides = CPPs) می‌تواند فعالیت آنتی‌سنسی آن را افزایش دهد. به‌عنوان مثال، پپتیدهای (RXR) 4XB و 3K (KFF) در بسیاری از پروکاریوت‌ها برای افزایش ورود PNA به سلول مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۲) (۷-۵).

CPP دارای شارژ مثبت با شارژ منفی هپاران سولفات یا فسفولیپید دولایه غشاء سلولی وارد واکنش می‌شود، این واکنش منجر به ایجاد شکاف در دیواره سلولی شده و PPNA می‌تواند از طریق این pore وارد شود. واکنش بین PNA با توالی محافظت شده (کانزرو) مثل *rpoD* باعث حذف بیان ژن می‌شود، (KFF)₃K: cell-penetrating, glycine linker, *rpoD*: RNA polymerase, subunit sigma peptide, (۷).

(Threose nucleic acid =GNA)، ترئوز نوکلئیک اسید (TNA=Hexitol nucleic acid= و هگزیتول نوکلئیک اسید (HNA) است. دسته‌ای دیگر از این مشابه‌ها، پپتید نوکلئیک اسید (Peptide Nucleic Acid =PNA) می‌باشد که جایگاه برجسته‌ای در میان آن‌ها دارد. PNA یکی از توانمندترین مولکول‌های ساختمانی است که ویژگی‌های اسیدهای نوکلئیک طبیعی را تقلید می‌کند (۲۱). این ترکیب پلیمری متشکل از واحدهای (ان-2-آمینواتیل) گلايسین است که از طریق پیوند متیل‌کربونیل به بازهای پورین و پیریمیدین متصل می‌شود (شکل ۱). پپتید نوکلئیک اسید در سال ۱۹۹۱ توسط نیلسون و همکاران سنتز شد و به دلیل برخورداری از ویژگی‌های منحصر به فرد مانند قابلیت اتصال اختصاصی به DNA و RNA طبیعی یا سایر PNAs، در بسیاری از روش‌های بیولوژی مولکولی برای تشخیص و درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. این مولکول در سال ۱۹۹۳ به‌صورت تجاری عرضه شد و هم‌اکنون، شرکت پاناژن در کره جنوبی یکی از پیشگامان تولید محصولات مبتنی بر PNA محسوب می‌شود (۳و۴).



شکل ۱: ساختار شیمیایی از پپتید نوکلئیک اسید (PNA) (۴).

۱. ویژگی‌های PNA

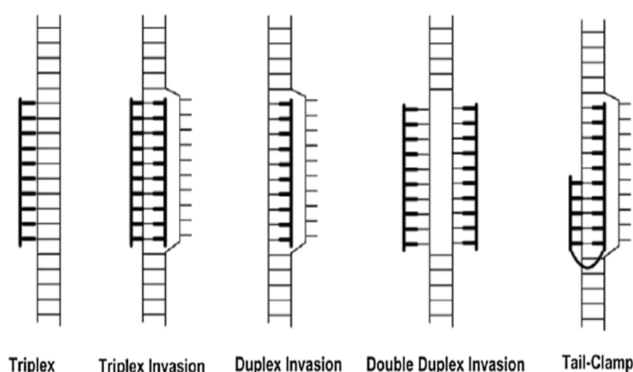
PNAs علاوه بر پایداری بالاتر در سلول نسبت به DNA، به دلیل نداشتن بار الکتریکی، ۵۰ تا ۱۰۰ برابر اتصال قوی‌تری به DNA و RNA طبیعی دارند. به‌عنوان مثال، اتصال بیوکمپلکس‌های فلزات دو ظرفیتی به PNA و انجام واکنش‌های اکسایش و کاهش می‌تواند منجر به برش اختصاصی توالی‌های خاص در DNA شود (فعالیت رستریکشن

۴.۲. دوبلکس PNA-DNA

در ساختار دوبلکس PNA-DNA، مولکول PNA به رشته مکمل DNA متصل شده و یک دوبلکس پایدار تشکیل می‌دهد. مطالعات پایداری حرارتی نشان داده‌اند که این ساختار نسبت به دوبلکس‌های PNA-RNA از پایداری کمتری برخوردار است (شکل ۳). این پایداری بالا امکان جابجایی سریع در رشته هدف را فراهم می‌کند (۱۱و۶).

سه فاکتور مهم در طراحی PNA که بر فعالیت ضدباکتریایی آن تأثیر می‌گذارند عبارتند از:

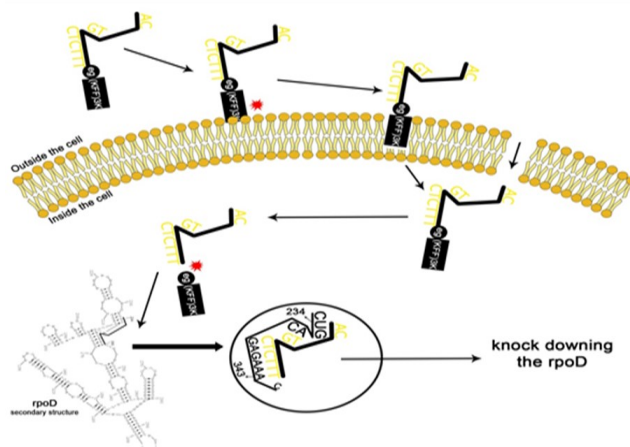
۱. طول توالی PNA معمولاً بین ۱۰ تا ۱۲ جفت باز
۲. پتید نفوذکننده به دیواره سلولی مطالعات نشان داده‌اند که انتهای ۵' پتید فعال‌تر است.
۳. وجود یا عدم وجود پیوند بین پتید کونژوگه شده به PNA (۱۱-۱۴).



۴.۳. مهار بیان ژن توسط PNA

PNA به روش‌های مختلفی در مهار بیان ژن و فعالیت‌های زیستی استفاده می‌شود:

- جلوگیری از رونویسی: تشکیل ساختارهای حلقوی PNA که به‌عنوان یک تسهیل‌کننده مصنوعی عمل کرده و رونویسی و همانندسازی را مهار می‌کند.
- مهار روند ترجمه: از طریق تشکیل کمپلکس‌های PNA-mRNA، مانع ترجمه پروتئین‌ها می‌شود.
- پایداری بیولوژیکی بالا PNA: در برابر آنزیم‌های پروتئاز و پپتیداز مقاوم است (۱۵و۱۶).



شکل ۲: مکانیسم ورود PPNA (peptide-PNA conjugate) به سلول هدف (۸و۴).

۳. مکانیسم ورود PPNA به سلول هدف

پتیدهای نفوذکننده به سلول (CPPs) که دارای بار مثبت هستند، با بار منفی هیپران سولفات یا فسفولیپیدهای غشای سلولی واکنش می‌دهند. این واکنش باعث ایجاد حفره‌هایی (Pore) در غشاء سلولی شده و در نتیجه، PPNA از طریق این منافذ وارد سلول می‌شود. سپس، PNA با اتصال به توالی‌های محافظت‌شده (کانزرو) مانند rpoD منجر به حذف بیان ژن هدف و مهار رشد باکتری می‌شود (۸).

۴. کاربردهای PNA

PNA کاربردهای گسترده‌ای در علوم زیستی دارد که شامل تغییر بیان ژن، مهار تسهیل‌کننده‌های ژنی، استفاده به‌عنوان داروی ضد عفونی‌کننده، ضد سرطان، ضد ویروسی، ضد باکتری و ضد پارازیت، ابزارهای مولکولی، پروب‌های بیوسنسور، شناسایی توالی‌های DNA و فناوری نانو است (۹و۱۰).

۴.۱. ویژگی‌های هیبرید/سیون PNA

PNA می‌تواند با DNA و RNA ترکیب شود و ساختارهای هیبریدی مختلفی را تشکیل دهد، از جمله:

- دوبلکس PNA-DNA
- 2-DNA triplexes (PNA)
- جابجایی رشته‌ای
- بیس PNA (۹).

- بستن PCR: استفاده از PNA در ترکیب با آنزیم‌های محدودکننده مصنوعی و S1 نوکلئاز به منظور مهار PCR (۱۶ و ۱۷).

۵. چالش‌ها و راهکارهای ورود PNA به سلول

یکی از محدودیت‌های استفاده از PNAs به عنوان آنتی‌بیوتیک، ساختار غیر یونی و وزن مولکولی بالای آن‌ها است که نفوذ آن‌ها را به داخل سلول دشوار می‌کند (۱۸). برای غلبه بر این مشکل، محققان ترکیب PNA با پپتیدهای نفوذکننده به سلول (CPPs) را بررسی کرده‌اند. برخی از این ترکیبات شامل: لیپیدهای کاتیونی RRRXRRXRRXRB-acid و [5-FAM] Phe-Phe-Lys-Phe-Phe-Lys-NH₂ و KFFKFFKFFK-amide و کلروکین‌ها، داخلی سازی فتوشیمیایی photochemical و internalization (PCI) و HIV-TAT که این ترکیبات، ورود PNA به سلول میزبان را تسهیل می‌کنند (۹ و ۱۶).

۶. مهار رشد باکتری‌ها با استفاده از PNA

در سال‌های اخیر، از PNA در تشخیص و درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده شده است. برخی از کاربردهای آن شامل:

- حذف بیان (ناک‌داون) ژن‌های ضروری باکتریایی
 - تشخیص باکتری‌ها با استفاده از تکنیک FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)
 - مهار بیان ژن با استفاده از PNA و PMO (Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers)
- جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی (۹ و ۲۰).

۷. کاربرد PNA در عفونت‌های باکتری‌های گرم‌مثبت

۷.۱. استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) یکی از مهم‌ترین باکتری‌های گرم‌مثبت است که در جامعه و بیمارستان‌ها باعث ایجاد عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود. از جمله گونه‌های مقاوم آن می‌توان به دو مورد زیر اشاره کرد:

- استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)

- استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: VRSA)
- این باکتری طیف وسیعی از بیماری‌ها از عفونت‌های پوستی، سپسیس، ذات‌الریه، تا استئومیلیت را ایجاد می‌کند (۲۱-۲۴).

۷.۱.۱. PNA برای مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس

PNA به عنوان یک روش درمانی نوین، ژن‌های ضروری استافیلوکوکوس اورئوس را هدف قرار داده و از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند. ژن‌های هدف شامل موارد زیر است:

- (۲۵) (بیوسنتز اسیدهای چرب) *fabI*
- (۲۶) (کدگذاری آلکالین فسفاتاز) *phoB*
- (۲۶) (بیوسنتز دیواره سلولی) *fmbH*
- (۲۶) (زیرواحد ژیراز DNA) *gyrA*
- (۲۷) (بیوسنتز اسیدهای چرب) *hmrB*
- (۲۸) (کدکننده RNA پلیمرز سیگمافاکتور) *rpoD*
- (۲۸) (ژن مقاومت به متی‌سیلین - PBP2a) *mecA*

۷.۱.۲. حذف ژن‌های *mecA* و *ftsZ* توسط PNA

در مطالعه‌ای که گو و همکاران در سال ۲۰۱۴ و شانو و همکاران نشان داده شد که PNA می‌تواند ژن‌های *ftsZ* و *mecA* را مهار کند. ژن *ftsZ* در رشد و تقسیم باکتری نقش دارد، در حالی که *mecA* عامل مقاومت MRSA به متی‌سیلین است. در این مطالعه، PNA با طراحی بر اساس توالی Shine-Dalgarno Sequence (SD) برای ژن‌های *ftsZ* و *mecA* سنتز شد. نتایج نشان داد که این PNA توانست حداقل غلظت مهار (MIC) اگراسیلین را کاهش داده و از رشد باکتری جلوگیری کند (۲۹ و ۳۰).

۷.۱.۳. نقش PNA در هدف‌گیری ژن *ftsZ*

مطالعه‌ای که لیانگ و همکاران ۲۰۱۴ در چین انجام دادند، نشان داد که مهار ژن *ftsZ* توسط PNA در غلظت‌های بالا خاصیت باکتری‌سیدال دارد. این یافته‌ها نشان دادند که فعالیت PNA وابسته به دوز بوده و بر بیان ژن تأثیر مستقیم دارد (۳۱).

۷.۱.۴. مهار RNA پلیمراز با استفاده از PNA

RNA پلیمراز یک آنزیم کلیدی در رونویسی ژن است و در میان گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کاملاً محافظت شده است. در مطالعه‌ای که عبوشها و همکاران ۲۰۱۶ در آمریکا انجام دادند، مشخص شد که PNA طراحی شده بر علیه *rpoA* RNA پلیمراز زیر واحد آلفا دارای فعالیت ضدباکتریایی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط داخل سلولی است. مهار *rpoA* باعث عملکردهای زیر می‌شود:

- اختلال در عملکرد RNA پلیمراز
- نابودی کمپلکس رونویسی
- کاهش تولید mRNA و در نتیجه مهار ترجمه پروتئین‌های حیاتی باکتری

این مطالعه نشان داد که PNA می‌تواند به عنوان یک داروی بالقوه در درمان عفونت‌های MRSA استفاده شود (۳۲). آنچه از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت این است که PNA یک روش نوین و امیدبخش برای درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. با این حال، تحقیقات بیشتری در زمینه ارزیابی ایمنی، سمیت و فارماکوکینتیک آن مورد نیاز است تا بتوان آن را در کاربردهای بالینی مورد استفاده قرار داد (۳۰).

۷.۲. استرپتوکوکوس پایورنز

استرپتوکوکوس پایورنز (*Streptococcus pyogenes*) یکی از باکتری‌های گرم مثبت است که باعث عفونت‌های شدید تهاجمی و فارنژیت می‌شود (۳۳). به دلیل تولید بتا-لاکتاماز، مقاومت این باکتری‌ها به پنی‌سیلین به‌طور مکرر گزارش شده است (۳۴). پتید نوکلئیک اسید کانژوگه (PPNA) به عنوان یک عامل ضد میکروبی در استرپتوکوکوس پایورنز مورد بررسی قرار گرفته است. پاتنژ و همکاران در سال ۲۰۱۳ در آلمان نشان دادند که PPNA ضد *gyrA* دارای خاصیت باکتری‌کش (باکتریسیدال) علیه استرپتوکوکوس پایورنز است. آن‌ها همچنین دریافتند که PPNA کونژوگه با $3K(KFF)$ نسبت به HIV-1 Tat peptide PNAs فعالیت آنتی‌باکتریال قوی‌تری دارد. با این حال، مطالعات نشان دادند که برای مهار رشد در استرپتوکوکوس

پایورنز، به غلظت بالاتری از anti-*gyrA* PPNA در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نیاز است، اگرچه علت این امر هنوز مشخص نشده است (۳۵).

۷.۳. انتروکوکوس‌ها

انتروکوکوس‌ها (*Enterococcus* spp.) کوکسی‌های گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری هستند (۳۶). دو گونه‌ی مهم این جنس، انتروکوکوس فکالایس و انتروکوکوس فاسیوم هستند. انتروکوکوس فکالایس به عنوان یک میکروارگانیسم ساکن دستگاه گوارش انسان و همچنین ساپروفیت حفره دهانی شناخته می‌شود. این باکتری یکی از عوامل اصلی در عفونت‌های مزمن ریشه دندان است و به شرایط سخت، از جمله کمبود مواد مغذی، بسیار مقاوم می‌باشد. علاوه بر این، معمولاً از بیوفیلم‌های تشکیل شده بر روی سطوح وسایل پزشکی مرتبط با عفونت‌های مزمن جدا می‌شود (۳۷-۳۹). بیوفیلم‌ها تجمعی از سلول‌های میکروبی هستند که به یک سطح متصل شده و توسط ماتریکس خارج سلولی احاطه شده‌اند (۴۰). مراحل تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها یک فرآیند چندمرحله‌ای است. در ابتدا، باکتری‌ها به یک سطح زنده یا غیرزنده متصل می‌شوند. این اتصال اولیه غیر اختصاصی بوده و از طریق نیروهای آب‌گریز و اندروالسی و الکترواستاتیک صورت می‌گیرد. پس از استقرار اولیه، میکروارگانیسم‌ها از حالت پلانکتونیک (شناور) به فرم ثابت تغییر وضعیت می‌دهند. بیوفیلم‌ها مقاومت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، شوینده‌ها و سیستم ایمنی میزبان دارند. آن‌ها نه تنها در پاتوژن عفونت‌های مزمن مانند اندوکاردیت، عفونت‌های مجاری ادراری، سنگ کلیه و فیروز کیستیک نقش دارند، بلکه باعث عفونت‌های بیمارستانی مرتبط با وسایل پزشکی مانند کاتترها و دریچه‌های مصنوعی قلب نیز می‌شوند (۴۱ و ۴۲). باکتری‌های درون بیوفیلم، از نظر فنوتیپی با شکل پلانکتونیک خود متفاوت هستند و ویژگی‌های خاصی را از خود نشان می‌دهند. به عنوان مثال، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از باکتری‌های آزاد (پلانکتونیک)

دارد. این ژن یک فاکتور محافظت‌شده شناخته شده و مشابه در اکثر باکتری‌ها می‌باشد. این ژن در *انتروکوکوس فکالیس* ابتدا تحت عنوان ژن *divII* شناخته می‌شد که نقش مهمی در تکثیر انتروکوکوس‌ها ایفا می‌نماید (۴۷). بنابراین، تشخیص داروهای جدید علیه انتروکوکوس‌ها یک چالش برای پزشکان و محققان است که برای مهار این عفونت‌ها، پپتید نوکلئیک اسید بسیار کاربردی می‌تواند باشد که براساس هدف، ژن مورد نظر را سرکوب می‌کند و ژن‌های ضروری را مورد هدف قرار داده و باعث مهار رشد در ژن هدف می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که PNAs که به خوبی طراحی می‌شوند، می‌توانند ژن‌ها را “حذف بیان (knockdown)” کنند، یعنی بیان یک یا چندین ژن کاهش یابد (۴۷).

در مطالعه نارنجی و همکاران از *انتروکوکوس فکالیس* ۲۹۲۱۲ ATCC استفاده و PNAs بر علیه نواحی کدون آغازین ژن‌های *efaA* و *ftsZ* طراحی شد، این PNAs به RNA مکمل متصل شده و آن را بلوکه می‌کنند. برای انتقال داخل سلولی PNA ضد ژن *ftsZ* از تکنیک الکتروپوریشن و به منظور برآورد تغییرات رشد باکتری از روش spot-plating استفاده شد. برای بررسی اثرات مهار PNAs *anti-efaA* بر روی تشکیل بیوفیلم از روش سنجش بیوفیلم و برای بررسی بیان ژن از روش Real-time PCR استفاده شد. بعد از مواجهه PNA علیه ژن *ftsZ* هیچ رشدی از باکتری *انتروکوکوس فکالیس* در محیط آگار مشاهده نشد و PNA علیه ژن *efaA* که در تشکیل بیوفیلم نقش داشت، بیان ژن را ۹۵ درصد کاهش داد و تولید بیوفیلم را پایین آورد. به علاوه، در MTT assay هیچ گونه سمیتی برای PNAs (*anti-ftsZ*, *anti-efaA*) روی سلول‌های MCF7 مشاهده نشد (۴۸).

۷.۴. سایر باکتری‌های گرم مثبت

هاتاموتو و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ژاپن از PNA بر علیه *باسیلوس ساب‌تیلیس* (*Bacillus subtilis*) استفاده کردند و نشان دادند که PNA کنژوگه با Cell-penetrating peptides (CPPs) می‌تواند رشد را مهار کند (۴۹). همچنین موندهی و همکاران

است. علاوه بر این، بیوفیلم‌ها محیطی مناسب برای تبادل مواد ژنتیکی فراهم می‌کنند که موجب گسترش ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت‌های باکتریایی می‌شود (۴۳). تخمین زده می‌شود که بیش از ۸۰ درصد از عفونت‌های انسانی توسط بیوفیلم‌ها ایجاد می‌شوند. بیوفیلم‌ها می‌توانند روی ابزارهای پزشکی ایمپلنت‌شده در بدن مانند دریچه‌های قلب مصنوعی، مفاصل مصنوعی، کاتترها و ضربان‌سازها رشد کرده و منجر به عفونت‌های خطرناک شوند. در مطالعاتی مشخص شده است که جدایه‌های انتروکوکوس فکالیس جداشده از موارد اندوکاردیت، به طور معنی‌داری بیوفیلم بیشتری نسبت به سویه‌های غیراندوکاردیتی تولید می‌کنند (۴۴). ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و عفونت‌های میکروبی نوظهور، نیاز به تحقیقات بیشتر برای توسعه روش‌های درمانی جدید و استراتژی‌های کنترل این عفونت‌ها را ضروری ساخته است.

متأسفانه، در سال‌های اخیر، با وجود تلاش‌های صورت گرفته، درمان عفونت‌های وابسته به بیوفیلم به دلیل مقاومت بسیار بالای باکتری‌ها به داروهای آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده، به چالشی جدی تبدیل شده است. همچنین، با ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، درمان عفونت‌های انتروکوکوسی از جمله چالش‌های عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. به همین دلیل، دانشمندان و محققان در پی یافتن راه‌های جدید و شاید متفاوت برای مبارزه با این معضل هستند. یکی از این راه‌ها، انجام تحقیقات مولکولی در خصوص چگونگی بیان ژن‌های مؤثر در ویروالانس و نحوه تغییر بیان این ژن‌ها در مجاورت با مواد و یا شرایط مختلف است (۴۵ و ۴۶). برای مثال، تحقیقات نشان می‌دهد ژن *efaA* که فاکتور اندوکاردیت *انتروکوکوس فکالیس* می‌باشد، در بیماران مبتلا به اندوکاردیت انتروکوکی بیان بالایی دارد و سومین ژن از اپرون *efaCBA* می‌باشد که نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم ایفا می‌کند (۴۶).

امروزه، پروتئین‌هایی که در تقسیم سلولی نقش دارند، مورد توجه و هدف آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گرفته‌اند. یکی از مهم‌ترین ژن‌ها، ژن *ftsZ* است که نقش مهمی در تقسیم سلولی باکتری

(۵۶و۵۵). یکی از ژن‌های اساسی مایکوباکتریوم توبریکلوسیس که در بیوستنز لیپیدی نقش دارد، ژن *inhA* است که باعث مقاومت به ایزونیاژید و ایتوناامید در مایکوباکتریوم می‌شود. کولت و همکاران در سال ۲۰۰۵ در سوئد نشان دادند که PNASs ضد ژن *inhA* باعث تغییرات در مورفولوژی سلول و مهار رشد در مایکوباکتریوم/اسمگماتیس به‌عنوان یک مایکوباکتریوم سریع‌الرشد و غیر بیماری‌زا در انسان می‌شوند. در مطالعه یاد شده، باکتری‌های تیمار نشده با PNASs ضد ژن *inhA* ظاهر نرمال و سطح صاف داشتند، در حالی که باکتری‌های مواجهه‌شده با PNASs ظاهر خردشده داشتند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که PNASs ضد ژن *inhA* ممکن است برای درمان سل بسیار مفید باشند و می‌توانند به‌عنوان یک داروی آنتی‌مایکوباکتریال مورد استفاده قرار گیرند (۵۷) (جدول ۲).

۹. کاربرد PNA در عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی

۹.۱. اشریشیاکلی

اشریشیاکلی یکی از باکتری‌های گرم منفی است که باعث ایجاد عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان می‌شود (۵۸و۵۹). این ارگانسیم متعلق به خانواده/نتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*) است و تولید بتا لاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBL)، کرباپنماز و β -New Delhi metallo- (NDM) lactamase توسط این عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شود و به طور قابل توجهی باعث چالش‌های بزرگی در درمان می‌شود (۶۰و۶۱). این باعث عدم درمان موفقیت‌آمیز عفونت‌ها، بستری طولانی‌مدت در بیمارستان، افزایش هزینه‌های درمانی و همچنین افزایش مرگ‌ومیر در این عفونت‌ها می‌شود (۶۲و۶۳). بایی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در چین با مطالعه دیگری نشان دادند که PNA بیان *rpoD* (کد کننده سیگما فاکتور RNA پلیمراز) در سویه‌های اشریشیاکلی را مهار می‌کند. علاوه بر این، σ^{70} ژن‌های نظیر *prfB*، *ftsZ*، *mazF*، *rpoS*، *seqA*، *turfB* و *ygiD* را تنظیم می‌کند. در این مطالعه بیان ژن‌های پایین دست مانند *prfB*، *ftsZ*، *mazF*، *rpoS*، *turfB*، *seqA* و *ygiD*

در سال ۲۰۱۴ در لندن نشان دادند که PNA ضد *ftsZ* می‌تواند رشد سلولی در باسیلوس سابیلیس را مهار کرده و خاصیت ضدباکتری داشته باشد (۵۰) (جدول ۱).

جدول ۱: اهداف ژنتیکی مورد استفاده برای PNASs در پاتوژن‌های گرم مثبت.

PNASs توسعه یافته	عملکرد ژن	منبع
<i>استافیلوکوکوس‌ها:</i>		
<i>FabI</i>	نقش در بیوستنز اسیدهای چرب	(۲۶)
<i>PhoB</i>	تولید آلکالین فسفاتازها	(۲۷)
<i>FmhB</i>	ساخت دیواره سلولی	(۲۷)
<i>GyrA</i>	تولید DNA ژیراز	(۲۷)
<i>HmrB</i>	تولید اسیدهای چرب	(۲۷)
<i>RpoA</i>	تولید زیر واحد آلفا RNA پلیمراز	(۸۶)
<i>RpoD</i>	تولید زیر واحد سیگما RNA پلیمراز	(۸۷)
<i>MecA</i>	تولید PBP2 و مقاومت به متی سیلین	(۲۸و۸۸)
<i>FtsZ</i>	مشارکت در تقسیم سلولی	(۸۸و۸۹)
<i>استریتوکوکوس‌ها:</i>		
<i>GyrA</i>	تولید زیر واحد A از DNA ژیراز	(۱۵)
<i>انتروکوکوس فکالیس</i>		
<i>efaA</i> <i>ftsZ</i>	آنتی ژن اندوکاردیتیس و تشکیل بیوفلم تقسیم سلولی	(۴۸)
<i>باسیلوس سوبیلیس:</i>		
<i>16sRNA</i>	تولید 16s رنای ریبوزومال	(۹۰)
<i>FtsZ</i>	مشارکت در تقسیم سلولی	(۹۱)
<i>کوریneb باکتریوم‌ها:</i>		
<i>16SrRNA</i>	تولید 16s رنای ریبوزومال	(۹۱)

۸. مایکوباکتریوم‌ها

مایکوباکتریوم توبریکلوسیس یک باسیل اسید فسفات است که باعث ایجاد بیماری سل می‌شود. درمان عفونت سل دشوار است زیرا این ارگانسیم دارای پوشش ضخیم و حاوی اسیدهای چرب زنجیره‌ای طولانی مانند اسید مایکولیک و سایر لیپیدها مانند آسیل گلیکولیپید، سولفولیپیدها و غیره می‌باشد (۵۱و۵۲). این ساختارها منجر به نفوذ ناپذیری این باکتری به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های موجود می‌شود (۵۳). سل با مقاومت در برابر چند دارو (MDR-TB) یکی از مشکلات اصلی برای درمان این عفونت است (۵۴). سازمان بهداشت جهانی (WHO) گزارش داده است که در سال ۲۰۱۵ بیش از ۴۸۰/۰۰۰ نفر در جهان مبتلا به سل مقاوم در برابر چند دارو بودند و بیش از ۱۰۰/۰۰۰ مورد مبتلا به سل مقاوم به ریفامپین گزارش شده است

جدول ۲: اهداف ژنتیکی مورد استفاده برای PNAS در پاتوژن‌های گرم منفی و مایکوباکتریوم‌ها.

منبع	عملکرد ژن	PNAs توسعه یافته	منبع	عملکرد ژن	PNAs توسعه یافته
		<i>سالمونلا انتریکا سرووار</i>			<i>استافیلوکوکوس‌ها:</i>
		تبیغی موریوم:	(۲۶)	نقش در بیوسنتز اسیدهای چرب	<i>FabI</i>
(۱۹)	تولید زیر واحد A از RNA پلیمراز	<i>RpoA</i>	(۲۷)	تولید آلکالین فسفاتازها	<i>PhoB</i>
(۱۹)	تولید زیر واحد سیگما از RNA پلیمراز	<i>RpoD</i>	(۲۷)	ساخت دیواره سلولی	<i>FmhB</i>
(۱۹)	تولید زیر واحد A از DNA لیگاز	<i>LigA</i>	(۲۷)	تولید DNA زیراز	<i>GyrA</i>
(۱۹)	مشارکت در بیوسنتز ریبوزومال	<i>EngA</i>	(۲۷)	تولید اسیدهای چرب	<i>HmrB</i>
(۱۹)	مشارکت در بیوسنتز پروتئین‌ها	<i>Tsf</i>	(۸۶)	تولید زیر واحد آلفا RNA	<i>RpoA</i>
(۱۹)	مشارکت در تولید LPS	<i>KdtA</i>		پلیمراز	<i>RpoD</i>
(۹۹ و ۹۱)	مشارکت در بیوسنتز دیواره سلولی	<i>MurA</i>	(۸۷)	تولید زیر واحد سیگما RNA	
(۹۹ و ۹۱)	مشارکت در تقسیم دیواره سلولی	<i>FtsZ</i>		پلیمراز	
		<i>سودوموناس‌ها:</i>	(۸۸ و ۲۸)	تولید PBP2 و مقاومت به متی	<i>MecA</i>
				سیلین	
			(۸۹ و ۸۸)	مشارکت در تقسیم سلولی	<i>FtsZ</i>
					<i>استرپتوکوکوس‌ها:</i>
(۱۰۰)	مشارکت در تقسیم سلولی	<i>FtsZ</i>		تولید زیر واحد A از DNA	<i>GyrA</i>
(۱۰۰)	مشارکت در بیوسنتز اسیدهای چرب	<i>AcpP</i>	(۱۵)	ژیراز	
(۱۰۱)	مشارکت در سنتز LPS	<i>LptD</i>			<i>انتروکوکوس فکالیز</i>
(۱۰۱)	مشارکت در سنتز پروتئین‌های سطحی	<i>LepB</i>	(۴۸)	آنتی ژن اندوکاردیتیس و تشکیل بیوفیلم، تقسیم سلولی	<i>(ftsZ) (efaA)</i>
(۱۰۱)	مشارکت در سنتز دیواره سلولی	<i>MraY</i>			<i>باسیلوس سویبتیلیس:</i>
(۱۰۱)	مشارکت در سنتز پروتئین‌های غشایی	<i>PA1303</i>	(۹۰)	تولید 16s رنای ریبوزومال	<i>16S rRNA</i>
(۱۰۲)	مشارکت در تشکیل بیوفیلم	<i>MotA</i>	(۹۱)	مشارکت در تقسیم سلولی	<i>FtsZ</i>
		<i>آسیتوباکتری‌ها:</i>			<i>کوریneb باکتریوم‌ها:</i>
(۱۰۴ و ۱۰۳)	تولید زیر واحد A از RNA پلیمراز	<i>(GyrA) (AdeB)</i>		تولید 16s رنای ریبوزومال	<i>16S rRNA</i>
	انتقال دهنده غشایی افلاکس پمپ‌ها				<i>مایکوباکتریوم اسمگماتیس:</i>
		<i>هموفیلوس آنفولانزا:</i>	(۹۲)	مشارکت در تولید لیپیدها	<i>InhA</i>
(۱۰۵)	مشارکت در سنتز اسیدهای چرب	<i>AcpP</i>			<i>اشریشیا کلی:</i>
		<i>بروسلا‌ها:</i>	(۹۳)	تولید فاکتور سیگما از RNA	<i>RpoD</i>
(۱۰۶)	مشارکت در تکثیر DNA	<i>DnaG</i>	(۹۳ و ۹۴)	پلیمراز	
(۱۰۶)	تولید DNA پلیمراز I	<i>PolA</i>	(۹۰)	تولید 16s رنای ریبوزومال	<i>16S rRNA</i>
(۱۰۶)	تولید زیر واحد A از DNA ژیراز	<i>GyrA</i>	(۹۷)	تولید 23s رنای ریبوزومال	<i>23S rRNA</i>
(۱۰۶)	مشارکت در پوشش سلولی	<i>Asd</i>	(۹۸)	مشارکت در تکامل tRNA	<i>RNase P (P15 loop region)</i>
(۱۰۶)	مشارکت در تولید LPS	<i>KdtA</i>	(۹۳ و ۹۴)	مشارکت در تولید اسیدهای	
(۱۰۶)	مشارکت در تولید اسیدهای چرب	<i>AcpP</i>	(۶۶)	چرب، ژن مشارکت در مقاومت به کلایستین	<i>(AcpP) (mcr1)</i>
(۱۰۶)	مشارکت در تولید پروتئین‌های سطحی	<i>Tsf</i>			<i>کلبسیلا نوموتیه:</i>
(۱۰۶)	تولید زیر واحد B از RNA پلیمراز	<i>RpoB</i>	(۷۴)	تولید زیر واحد A از DNA	<i>GyrA</i>
				ژیراز	
			(۷۴)		<i>OmpA</i>
			(۹۳)	تولید زیر واحد سیگما از RNA	<i>RpoD</i>
				پلیمراز	

۹.۲. کلبسیلا پنومونیه

کلبسیلا پنومونیه عامل شایع و خطرناک عفونت‌های اکتسابی از جامعه و بیمارستان است و می‌تواند باعث بروز عفونت‌های بیمارستانی نظیر عفونت دستگاه تنفسی، ادراری، ذات‌الریه، باکتری، سیتی‌سمی، مننژیت و عفونت‌های بافت نرم شود (۶۸). شایع‌ترین عفونت‌های کلبسیلا پنومونیه، مقاومت چندگانه دارویی (Multi drug Resistance: MDR) است (۶۹). مکانیسم‌های مقاومت چندگانه در این ارگانیسم شامل تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی همچون *blaSHV*، *blaTEM* و *AmpC*، جهش در ژن *gyrA* و بیان پمپ‌های افلاکس است (۷۰). بنابراین در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد مقاومت دارویی و مکانیسم‌های MDR انجام شده است.

زیر واحد DNA gyrase A که ژن *gyrA* را کد می‌کند، یک توپوایزومراز نوع II است که برای تکثیر و ترجمه DNA ضروری است (۷۱). جهش در *gyrA* باعث مقاومت در برابر فلوروکینولون‌ها می‌شود (۷۰). همچنین، *OmpA* که در دیواره سلولی انتروباکتریاسه به میزان زیادی بیان می‌شود و نقش مهمی در رشد سلول‌های باکتریایی و تهاجم آن‌ها به سلول‌های پستانداران دارد (۷۲). توابع *OmpA* در ساختار اتصالات و یکپارچگی سلولی، رشد سلول، اتصال باکتریوفازها، کوئزوگاسیون و تهاجم به سلول‌های پستانداران مؤثر است (۷۳). اروپاتی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در سنگاپور نشان دادند که استفاده از PNA برای مهار ژن‌های *gyrA* و *ompA* در باکتری کلبسیلا پنومونیه، رشد سلولی را در شرایط *in vitro* مهار کرد و هیچ‌گونه سمیت برای سلول‌های اپیتلیال انسانی نداشت (۷۴). در مطالعه دیگری، Bai و همکاران در سال ۲۰۱۲ در چین نشان دادند که PNA ضد ژن *rpoD* می‌تواند رشد کلبسیلا پنومونیه را در شرایط *in vitro* و *in vivo* مهار کنند و نشان دادند که مهار *rpoD* می‌تواند ژن‌های پایین‌دستی نظیر *ftsZ*، *prfB*، *mazF*، *rpoS*، *durB*، *seqA* و *ygiD* را که بر تکثیر سلولی تأثیر می‌گذارند، کنترل کند و در نتیجه باعث مهار رشد باکتری شود (۷۵).

را با PPNA مواجه کردند که باعث کاهش بیان σ^{70} و در نتیجه باعث کاهش بیان این ژن‌ها شدند. این نتایج نشان می‌دهد که مهار ژن‌های σ^{70} و *rpoD* توسط PNA بر روی سایر ژن‌ها تأثیر می‌گذارد و می‌تواند رشد سلول را متوقف کند. عفونت سلول‌های اپیتلیال مخاط معده انسان که توسط *شریشیاکلی* ایجاد شده بود، تحت درمان با PNA قرار گرفتند که PNA می‌تواند کامل رشد باکتری را مهار کند و اثری از مورفولوژی و رشد سلول‌های اپیتلیال مشاهده نشد. همچنین مقاومت به PNA در *شریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند در سویه‌های *شریشیاکلی* در برابر PNA در مقایسه با عوامل باکتریسیدال موجود دیگر مقاومتی مشاهده نشده است. این نتایج نشان داد که PPNA بر روی *شریشیاکلی* هم در *invitro* و *in vivo* خیلی مؤثر هستند (۶۴). گود و همکاران در سال ۱۹۹۹ در لندن نشان دادند که سویه‌های *شریشیاکلی* که کمبود LPS دارند، نسبت به نوع وحشی به PNA حساس‌تر هستند (۳). علاوه بر این، ورود PNA در حضور عوامل نفوذپذیری دیواره سلولی مانند نیتروسفین افزایش می‌یابد (۶۵).

نتایج مطالعه نژادی و همکاران در سال ۲۰۱۹ در تبریز بر روی باکتری *شریشیاکلی* KP81 که حاوی ژن *mcr-1* بود نشان داد که MIC باکتری *شریشیاکلی* مقاوم به کولیستین پس از واردسازی PNA سه چاهک کاهش یافته بود و میزان مقاومت از 32 $\mu\text{g/ml}$ به 4 $\mu\text{g/ml}$ رسید. آنالیز بیان ژن *mcr-1* پس از انجام ارزیابی بیان ژن نشان داد که PNA، ۹۵ درصد بیان ژن *mcr-1* در سویه بیمار شده را کاهش داده است و مشاهدات نشان داد که با ممانعت از بیان ژن *mcr-1* می‌توان مقاومت به کولیستین را شکست (۶۶). در مطالعه لیس گولتمن و همکاران در سال ۲۰۱۹ در دانمارک، نشان داده شد که اندازه طول بهینه PNA در حدود ۱۰-۱۲ نوکلئوباز می‌باشد و در طول ۱۰ نوکلئوباز فعالیت بیشتری به عنوان عوامل ضد میکروبی آنتی‌سنس در هر دو نوع وحشی AS19 و *شریشیاکلی* MG1655 داشتند (۶۷) (جدول ۲).

۹.۳. سالمونلا انتریکا

سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) یک باسیل گرم منفی است که باعث عفونت‌های روده‌ای می‌شود. فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورن‌های وسیع‌الطیف داروهای انتخابی برای درمان عفونت‌های سالمونلایی هستند (۷۶-۷۸). مقاومت نوظهور در برابر فلوروکینولون‌ها و بتالاکتام‌ها گزارش شده است و به همین دلیل این موضوع به یک مشکل مهم بهداشت عمومی تبدیل شده است (۷۶-۷۸). در همین زمینه، استفاده از PNA ها برای مقابله با این میکروارگانیسم‌ها بررسی شده است.

نتایج حاصل از مطالعات نشان داد که PNAs ضد ژن‌های *rpoA* و *rpoD* به طور قابل توجهی رشد باکتری را مهار می‌کنند. Soofi و Seleem در سال ۲۰۱۲ در ایالات متحده نشان دادند که استفاده از PNAs ضد ژن‌های اساسی مانند *ligA* (DNA) لیگاز، زیر واحد A (*engA*) مرتبط با بیوسنتز ریبوزوم‌ها (*rpoA*) *tsf rpoD* مرتبط با بیوسنتز پروتئین‌ها و *kdtA* می‌تواند بیان ژن‌ها و رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی و کشت سلولی مهار کند. نتایج این تحقیق نشان داد که مهار ژن‌ها توسط PNA بستگی به توالی خاص و دوز دارو دارد (۱۹). همچنین، مطالعات آن‌ها نشان می‌دهد که ژن *murA* مرتبط با بیوزنر دیواره سلولی و ژن *ftsZ* دخیل در تقسیم سلولی توسط PNAs مهار می‌شوند (۱۹). ماندهی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در لندن نشان دادند که PNA های ضد *murA* و *anti-ftsZ* می‌توانند رشد سالمونلا را مهار کنند. همچنین، PNAs که ژن *murA* را هدف قرار می‌دهند دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند. مهار بیان ژن *ftsZ* باعث رشد رشته‌ای در سالمونلا انتریکا می‌شود که ناشی از خاموش شدن ژن *ftsZ* است (۵۰).

۹.۴. سودوموناس اتروجینوزا و اسیتوباکتر بومانی

سودوموناس اتروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و اسیتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*) باعث عفونت‌های فرصت طلبانه و عفونت‌های بیمارستانی در افراد با

سیستم ایمنی ضعیف و بیماری‌های زمینه‌ای می‌شوند. علاوه بر این، سودوموناس اتروجینوزا قادر به تشکیل بیوفیلم در سطوح غیرزنده و بیوتیک است که می‌تواند باعث ایجاد عفونت و شکست درمانی در رابطه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها شود (۷۹-۸۲). به دلیل ظهور سویه‌های مقاومت چندگانه دارویی، فرآیند درمان محدود شده است (۸۳ و ۸۴). مقاومت می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلفی نظیر تولید آنزیم‌های تغییردهنده دارو، بتا-لاکتامازها، پمپ‌های افلاکس و تغییرات در جایگاه هدف رخ دهد (۸۴). به همین دلیل، نیاز به داروهای جدید درمانی بیشتر از پیش احساس می‌شود.

نیلسون و گسال در سال ۲۰۱۲ در دانمارک نشان دادند که PNAs علیه ژن‌های *ftsZ* و *acp-p* می‌توانند خاصیت آنتی‌میکروبیال بر روی سویه‌های سودوموناس اتروجینوزا چند مقاومتی داشته باشند. این نتایج نشان دادند که PNA خاص می‌تواند هدف ژن *acp-p* را در گونه‌های مختلف سودوموناس اتروژینوزا قرار دهد و از این رو برای درمان سایر گونه‌های سودوموناس نیز قابل استفاده باشد.

ماکیوا و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ژاپن نشان دادند که PNAs ضد ژن‌های *lepB*، *dptD* و *mraY* ژن‌های ضروری و *PA1303* یک ژن غیرضروری خاصیت ضدباکتریایی بر روی سودوموناس اتروجینوزا دارند. این نتایج پیشنهاد می‌دهند که اگر PNA همراه با CPP باشد، اثرگذاری آن در مهار ژن‌ها مؤثرتر خواهد بود (۳۰). وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ در چین نشان دادند که PPNAs ضد *gyrA* در آسیتوباکتر بومانی که مقاوم به چند دارو (MDR) بود، اثرات مهاری بر رشد و بیان ژن *gyrA* به صورت وابسته به دوز داشتند. همچنین، نتایج آن‌ها نشان داد که ترکیب دو PPNA ضد *gyrA* می‌تواند اثر هم‌افزایی را افزایش دهد (۳۰). ژن *motA* ژن مهمی در مرحله اولیه و شروع تشکیل بیوفیلم و اتصال در سودوموناس اتروجینوزا است. خیا و همکاران در سال ۲۰۱۱ در سنگاپور نشان دادند که PPNAs ضد ژن *motA* می‌توانند بیان آن را کاهش داده و باعث مهار بیوفیلم شوند، این اثر وابسته به دوز است. همچنین، نتایج آن‌ها نشان داد که مهار PPNAs تنها به فعالیت PNAs بستگی دارد و

ارتباطی با سمیت یا عملکرد پتیدی که به PNAs متصل شده‌اند، ندارد (۳۰).

۹.۵. بروسلاها

از PNAs علیه پاتوژن‌هایی مانند بروسلا (*Brucella sp.*) که یک باکتری داخل سلولی است، استفاده شده است. برای درمان عفونت‌های بروسلائی از آنتی‌بیوتیک‌های ترکیبی مانند داکسی‌سایکلین و ریفاپمین یا داکسی‌سایکلین و استرپتومایسین به مدت ۶-۹ هفته استفاده می‌شود. هرچند عود مجدد عفونت در سویه‌های بروسلائی بین ۵-۱۵٪ است. این ارگاناسم‌ها معمولاً نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند (۸۵). مطالعات نشان داده‌اند که PPNAs می‌توانند بروسلا را در شرایط برون‌تنی (*in vitro*) و درون‌تنی (*in vivo*) مهار کنند. راجاسکاران و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایالات متحده نشان دادند که PNAs ضد ژن‌های ضروری مانند *polA dnaG* و *acpP kdtA asd gyrA* دخیل در سنتز اسیدهای چرب *tsf* و *rpoB* می‌توانند پس از ۲۴ ساعت رشد بروسلا سوئیس را در کشت و ماکروفاژهای آلوده به موش‌ها مهار کنند. نتایج نشان داد که PNAs ضد *ASD*، *GyrA* و *DnaG* می‌توانند رشد بروسلا در ماکروفاژهای آلوده و کشت خالص را مهار کنند. همچنین، PNAs ضد *polA* در برابر بروسلا سوئیس مؤثرتر هستند و پیشنهاد شده است که PNAs ضد *polA* می‌توانند در برابر بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس نیز مؤثر باشند. این نتایج نشان می‌دهد که PNAs ضد *polA* بهترین هدف برای مهار بروسلا در شرایط آزمایشگاهی و کشت سلولی هستند (۳۰).

نتیجه‌گیری

گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و ظهور عفونت‌های میکروبی جدید، ضرورت مطالعات برای شناسایی روش‌های نوین درمانی و کنترل را افزایش داده است. بنابراین، مطالعه حاضر بر آن بوده است تا استفاده از ابزارهای نوین ژنتیک و مولکولی را به عنوان راهی برای مهار بیماری‌زایی و ایجاد عفونت توسط گونه‌های مختلف باکتری‌ها بررسی و مرور

نماید. هدف این مطالعه ارزیابی مطالعات انجام شده و پیشرفت‌های صورت گرفته در کاربرد PNA به عنوان ابزار مولکولی جدید برای مهار تولید بیوفیلم و مهار عفونت‌های باکتری‌ها بوده است. توالی‌های متعددی از PNA تا حال طراحی و سنتز شده‌اند تا به ناحیه تسهیل کننده (Promoter) ژن‌ها (کدون شروع) و پپتیدهای منتقل کننده (Carrier Peptide) برای ژن‌های مناسب بر علیه میکروب‌ها اختصاص یابند.

برای طراحی داروهای ضد میکروبی وسیع‌الطیف علیه مقاومت‌های چندگانه، از روش‌های جدیدی مانند PNAs به عنوان عوامل ضد میکروبی در برابر ژن‌های بیماری‌زا و پاتوژن‌ها استفاده می‌شود. فناوری آنتی‌سنس، امکان سرکوب عملکرد این ژن‌ها را فراهم می‌کند که می‌تواند در کاهش حساسیت جدایه‌های مقاوم به چند دارو مفید باشد. این روش می‌تواند برای طراحی داروهای ضد میکروبی وسیع‌الطیف و مؤثر در برابر مقاومت‌های چندگانه مورد استفاده قرار گیرد. این نتایج چشم‌انداز جدیدی را برای درمان ارائه می‌دهند و تحقیقات آینده برای ارزیابی ایمنی، سمیت و فارماکوکینتیک این داروها ضروری خواهد بود. بر اساس این اطلاعات، پتید نوکلئیک اسیدها می‌توانند برای درمان‌های بالینی به کار گرفته شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری و یاری‌های کارکنان و مسئولین محترم مرکز تحقیقات کاربردی داروئی و کارشناسان گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز کمال قدردانی را دارند این طرح با شماره مصوب ۷۴۰۴۱ مورد حمایت مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بوده است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Carson LM, Watson EE. Peptide Nucleic Acids: From Origami to Editing. *Chempluschem*. 2024;89(11):23.
2. Abbasi s, Emtiazi G. Antimicrobial peptides of haloarchaea: Properties and applications of halocin. *Journal of Microbial World*. 2022;15(51):88-108.
3. Good L, Nielsen PE. Peptide nucleic acid (PNA) antisense effects in *Escherichia coli*. *Curr Issues Mol Biol*. 1999;1(1-2):111-6.
4. Jirakittiwut N, Sathianpitayakul P, Santanirand P, Akeda Y, Vilaivan T, Rathawongjirakul P. Peptide nucleic acid-immobilised paper combined with multiplex recombinase polymerase amplification for the ultrasensitive and rapid detection of rifampicin-resistant tuberculosis. *Sci Rep*. 2025;15(1):025-86691.
5. Liang S, He Y, Xia Y, Wang H, Wang L, Gao R, et al. Inhibiting the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro with antisense peptide nucleic acid conjugates targeting the *ftsZ* gene. *Int J Infect Dis*. 2015 1//;30:1-6.
6. Sannigrahi A, De N, Bhunia D, Bhadra J. Peptide nucleic acids: Recent advancements and future opportunities in biomedical applications. *Bioorg Chem*. 2025;155(108146):10.
7. Narenji H, Gholizadeh P, Aghazadeh M, Rezaee MA, Asgharzadeh M, Kafil HS. Peptide nucleic acids (PNAs): currently potential bactericidal agents. *Biomed Pharmacother*. 2017;93:580-8.
8. Narenji H, Gholizadeh P, Aghazadeh M, Rezaee MA, Asgharzadeh M, Kafil HS. Peptide nucleic acids (PNAs): currently potential bactericidal agents. *Biomed Pharmacother*. 2017;93:580-8.
9. Bai H, Sang G, You Y, Xue X, Zhou Y, Hou Z, et al. Targeting RNA polymerase primary $\sigma 70$ as a therapeutic strategy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antisense peptide nucleic acid. *PLoS One*. 2012;7 (1).
10. Greenberg DE, Marshall-Batty KR, Brinster LR, Zarembler KA, Shaw PA, Mellbye BL, et al. Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers targeted to an essential gene inhibit *Burkholderia cepacia* complex. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(12):1822-30.
11. Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*. 1993;365(6446):566-8.
12. Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE, Berg RH. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc*. 1992;114(5):1895-7.
13. Demidov V, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE. Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(9): 2103-7.
14. Egholm M, Christensen L, Deulholm KL, Buchardt O, Coull J, Nielsen PE. Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(2):217-22.
15. Patenge N, Pappesch R, Krawack F, Walda C, Mraheil MA, Jacob A, et al. Inhibition of growth and gene expression by PNA-peptide conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2013;2:e132.
16. Wierzbaj AJ, Richards EM, Lennon SR, Batey RT, Palmer AE. Unveiling the promise of peptide nucleic acids as functional linkers for an RNA imaging platform. *RSC Chem Biol*. 2024;6(2):249-62.
17. Hanvey JC, Peffer NJ, Bisi JE, Thomson SA, Cadilla R, Josey JA, et al. Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science*. 1992;258(5087):1481-5.
18. Møllegaard NE, Buchardt O, Egholm M, Nielsen PE. Peptide nucleic acid. DNA strand displacement loops as artificial transcription promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(9):3892-5.

19. Soofi MA, Seleem MN. Targeting essential genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium with antisense peptide nucleic acid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(12):6407-9.
20. Farshineh Saei S, Baskevics V, Katkevics M, Rozners E. Recognition of Noncanonical RNA Base Pairs Using Triplex-Forming Peptide Nucleic Acids. *ACS Chem Biol*. 2025;20(1):179-85.
21. Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PLoS One*. 2009;4(4):e5210.
22. D'Andrea LD, Romanelli A. Morphology and Applications of Self-Assembled Peptide Nucleic Acids. *Int J Mol Sci*. 2024;25(22).
23. Giancola JB, Raines RT. Endosomolytic peptides enable the cellular delivery of peptide nucleic acids. *Chem Commun*. 2024;60(100):15019-22.
24. MacLelland V, Kravitz M, Gupta A. Therapeutic and diagnostic applications of antisense peptide nucleic acids. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023;35(1):12.
25. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(4):227-39.
26. Ji Y, Yin D, Fox B, Holmes DJ, Payne D, Rosenberg M. Validation of antibacterial mechanism of action using regulated antisense RNA expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;231(2):177-84.
27. Nekhotiaeva N, Awasthi SK, Nielsen PE, Good L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Mol Ther*. 2004;10(4):652-9.
28. Meng J, Wang H, Hou Z, Chen T, Fu J, Ma X, et al. Novel anion liposome-encapsulated antisense oligonucleotide restores susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rescues mice from lethal sepsis by targeting mecA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(7):2871-8.
29. Goh S, Stach J, Good L. Antisense effects of PNAs in bacteria. *Peptide Nucleic Acids*: Springer; 2014. p. 223-36.
30. El-Fateh M, Chatterjee A, Zhao X. A systematic review of peptide nucleic acids (PNAs) with antibacterial activities: Efficacy, potential and challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2024;63(3):5.
31. Liang S, He Y, Xia Y, Wang H, Wang L, Gao R, et al. Inhibiting the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro with antisense peptide nucleic acid conjugates targeting the *ftsZ* gene. *Int J Infect Dis*. 2014;30c.
32. Abushahba MF, Mohammad H, Seleem MNJMT-NA. Targeting multidrug-resistant staphylococci with an anti-rpoA peptide nucleic acid conjugated to the HIV-1 TAT cell penetrating peptide. 2016;5:e339.
33. Novick RP, Ross H, Projan S, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *The EMBO journal*. 1993;12(10):3967-75.
34. Kuhn SM, Preiksaitis J, Tyrrell GJ, Jadavji T, Church D, Davies H. Evaluation of potential factors contributing to microbiological treatment failure in *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. *Can J Infect Dis*. 2001;12.
35. Patenge N, Pappesch R, Krawack F, Walda C, Mraheil MA, Jacob A, et al. Inhibition of growth and gene expression by PNA-peptide conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2.
36. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308-20.
37. Joyanes P, Pascual A, Martinez-Martinez L, Hevia A, Perea E. In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(2):124-7.
38. Joyanes P, Pascual A, Martínez-Martínez L, Hevia A, Perea EJ. In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. *Clin Microbiol Infect*. 1999;5(6):382-6.

39. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
40. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002;295(5559):1487-.
41. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003;57(1):677-701.
42. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 2001;55(1):165-99.
43. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.
44. Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, et al. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol*. 2001;190(3):113-20.
45. Lowe A, Lambert P, Smith A. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun*. 1995;63(2):703-6.
46. Portenier I, Waltimo TM, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endodontic topics*. 2003;6(1):135-59.
47. Pucci MJ, Thanassi JA, Discotto LF, Kessler RE, Dougherty TJ. Identification and characterization of cell wall-cell division gene clusters in pathogenic gram-positive cocci. *J Bacteriol*. 1997;179(17):5632-5.
48. Narenji H, Teymournejad O, Rezaee MA, Taghizadeh S, Mehramuz B, Aghazadeh M, et al. Antisense peptide nucleic acids against *ftsZ* and *efpA* genes inhibit growth and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. *Microb Pathog*. 2020;139:103907.
49. Hatamoto M, Nakai K, Ohashi A, Imachi H, Am, biotechnology. Sequence-specific bacterial growth inhibition by peptide nucleic acid targeted to the mRNA binding site of 16S rRNA. 2009;84(6):1161-8.
50. Mondhe M, Chessher A, Goh S, Good L, Stach JE, JPo. Species-selective killing of bacteria by antimicrobial peptide-PNAs. 2014;9(2):e89082.
51. Minnikin D. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. *Res Microbiol*. 1991;142(4):423-7.
52. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64(1):29-63.
53. Pereira MP, Shi J, Kelley SO. Peptide targeting of an antibiotic prodrug toward phagosome-entrapped mycobacteria. *ACS infectious diseases*. 2015;1(12):586-92.
54. Wilson JW, Tsukayama DT, editors. Extensively drug-resistant tuberculosis: principles of resistance, diagnosis, and management. *Mayo Clin Proc*; 2016: Elsevier.
55. Furin J J, Mitnick C D, Shin S S, Bayona J, Becerra M C, Singler J M, et al. Occurrence of serious adverse effects in patients receiving community-based therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2001;5(7):648-55.
56. Yee D, Valiquette C, Pelletier M, Parisien I, Rocher I, Menzies D. Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(11):1472-7.
57. Kulyté A, Nekhotiaeva N, Awasthi SK, Good LJ, Jomm, biotechnology. Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. 2005;9(2):101-9.
58. Siekierska I, Burmistrz M, Trylska J. Evaluating delivery of peptide nucleic acids to Gram-negative bacteria using differently linked membrane-active peptides and their stapled analogs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2024;114(129993):18.

59. Farahani A, Dastranj M, Shamseddin J, Veisi H, Soltani S, Kalantar H. Antibiotic resistance and presence of integron class 1 and class 2 genes amongst *Escherichia coli* isolates of urine specimens of inpatients and outpatients in Ahvaz, southern of Iran. *Journal of Microbial World*. 2023;16(56):167-77.
60. Tootoonsaz S, Kargar M. Detection of integrons and gene cassettes among multidrug resistant (MDR) *Escherichia coli* uropathogenic strains isolated from clinical specimens in Bushehr. *Journal of Microbial World*. 2024;16(57):263-74.
61. Nouri E, Asadpour L. Antibiotic resistance and frequency of fimH, papC and sfa-foc virulence genes in *Escherichia coli* isolated from Caspian horse feces in Guilan province. *Journal of Microbial World*. 2022;15(50):68-77.
62. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3352-9.
63. Snyder GM, O'Fallon E, D'Agata EM. Co-colonization with multiple different species of multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Am J Infect Control*. 2011;39(6):506-10.
64. Bai H, Sang G, You Y, Xue X, Zhou Y, Hou Z, et al. Targeting RNA polymerase primary sigma70 as a therapeutic strategy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antisense peptide nucleic acid. *PLoS One*. 2012;7.
65. Good L, Awasthi SK, Dryselius R, Larsson O, Nielsen PE. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nat Biotechnol*. 2001;19(4):360-4.
66. Nezhadi J, Narenji H, Barhaghi MHS, Rezaee MA, Ghotaslou R, Pirzadeh T, et al. Peptide nucleic acid-mediated re-sensitization of colistin resistance *Escherichia coli* KP81 harboring mcr-1 plasmid. *Microb Pathog*. 2019;135:103646.
67. Goltermann L, Yavari N, Zhang M, Ghosal A, Nielsen PEJFim. PNA length restriction of antibacterial activity of peptide-PNA conjugates in *Escherichia coli* through effects of the inner membrane. 2019;10:1032.
68. Daef A, Aly A, Seif El-Din A, El Sherbiny NM, El-Gendy SM. Phenotypic and genotypic detection of extended spectrum beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* isolated from Intensive Care Units in Assuit University Hospital. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. 2009;18(2):29-40.
69. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):657-86.
70. Martínez-Martínez L, García I, Ballesta S, Benedí VJ, Hernández-Allés S, Pascual A. Energy-Dependent Accumulation of Fluoroquinolones in Quinolone-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(7):1850-2.
71. Kampranis SC, Maxwell A. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(25):14416-21.
72. Pautsch A, Schulz GE. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol*. 1998;5(11):1013-7.
73. Jeannin P, Magistrelli G, Goetsch L, Haeuw J-F, Thieblemont N, Bonnefoy J-Y, et al. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine*. 2002;20:A23-A7.
74. Kurupati P, Tan KSW, Kumarasinghe G, Poh CL. Inhibition of gene expression and growth by antisense peptide nucleic acids in a multiresistant β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(3):805-11.
75. Bai H, You Y, Yan H, Meng J, Xue X, Hou Z, et al. Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. 2012;33(2):659-67.

76. Abouzeed YM, Baucheron S, Cloeckaert A. ramR mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(7):2428-34.
77. Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection*. 2006;8(7):1937-44.
78. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res*. 2005;36(3):267-88.
79. Boucher R. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2004;23(1):146-58.
80. Leibovitz A, Dan M, Zinger J, Carmeli Y, Habot B, Segal R. *Pseudomonas aeruginosa* and the oropharyngeal ecosystem of tube-fed patients. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(8):956.
81. Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis. *ORL*. 2004;66(3):155-8.
82. Zegans ME, Shanks RM, O'toole GA. Bacterial biofilms and ocular infections. *The ocular surface*. 2005;3(2):73-80.
83. Kempf M, Rolain J-M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(2):105-14.
84. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*. 2009;73(4):338-44.
85. Halling SM, Jensen AE. Intrinsic and selected resistance to antibiotics binding the ribosome: analyses of *Brucella* 23S rrn, L4, L22, EF-Tu1, EF-Tu2, efflux and phylogenetic implications. *BMC Microbiol*. 2006;6(1):84.
86. Abushahba MF, Mohammad H, Seleem MN. Targeting Multidrug-resistant *Staphylococci* with an anti-rpoA Peptide Nucleic Acid Conjugated to the HIV-1 TAT Cell Penetrating Peptide. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2016 Jul 19;5(7):e339.
87. Bai H, Sang G, You Y, Xue X, Zhou Y, Hou Z, et al. Targeting RNA polymerase primary sigma70 as a therapeutic strategy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antisense peptide nucleic acid. *PloS one*. 2012;7(1):e29886.
88. Goh S, Loeffler A, Lloyd DH, Nair SP, Good L. Oxacillin sensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* by antisense peptide nucleic acids in vitro. *BMC Microbiology*. 2015;15.
89. Liang S, He Y, Xia Y, Wang H, Wang L, Gao R, et al. Inhibiting the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro with antisense peptide nucleic acid conjugates targeting the *ftsZ* gene. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015 Jan;30:1-6.
90. Hatamoto M, Nakai K, Ohashi A, Imachi H. Sequence-specific bacterial growth inhibition by peptide nucleic acid targeted to the mRNA binding site of 16S rRNA. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84(6):1161-8.
91. Mondhe M, Chessher A, Goh S, Good L, Stach JEM. Species-Selective Killing of Bacteria by Antimicrobial Peptide-PNAs. *PloS one*. 2014;9(2).
92. Kulyte A, Nekhotiaeva N, Awasthi SK, Good L. Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2005;9(2):101-9.
93. Bai H, You Y, Yan H, Meng J, Xue X, Hou Z, et al. Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. *Biomaterials*. 2012;33(2):659-67.
94. Good L, Nielsen PE. Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(5):2073-6.

95. Good L, Sandberg R, Larsson O, Nielsen PE, Wahlestedt C. Antisense PNA effects in *Escherichia coli* are limited by the outer-membrane LPS layer. *Microbiology*. 2000;146(10):2665-70.
96. Nikraves A, Dryselius R, Faridani OR, Goh S, Sadeghizadeh M, Behmanesh M, et al. Antisense PNA accumulates in *Escherichia coli* and mediates a long post-antibiotic effect. *Molecular Therapy*. 2007;15(8):1537-42.
97. Xue-Wen H, Jie P, Xian-Yuan A, Hong-Xiang Z. Inhibition of bacterial translation and growth by peptide nucleic acids targeted to domain II of 23S rRNA. *Journal of Peptide Science*. 2007;13(4):220-6.
98. Gruegelsiepe H, Brandt O, Hartmann RK. Antisense Inhibition of RNase P mechanistic aspects and application to live bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(41):30613-20.
99. Goh S, Boberek JM, Nakashima N, Stach J, Good L. Concurrent growth rate and transcript analyses reveal essential gene stringency in *Escherichia coli*. *PloS one*. 2009;4(6):e6061.
100. Ghosal A, Nielsen PE. Potent antibacterial antisense peptide-peptide nucleic acid conjugates against *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic acid therapeutics*. 2012;22(5):323-34.
101. Maekawa K, Azuma M, Okuno Y, Tsukamoto T, Nishiguchi K, Setsukinai K-i, et al. Antisense peptide nucleic acid-peptide conjugates for functional analyses of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2015;23(22):7234-9.
102. Xia Y, Xiong Y, Li X, Su X. Inhibition of biofilm formation by the antisense peptide nucleic acids targeted at the motA gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011;27(9):1981-7.
103. Wang H, He Y, Xia Y, Wang L, Liang S. Inhibition of gene expression and growth of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by antisense peptide nucleic acids. *Molecular Biology Reports*. [journal article]. 2014;41(11):7535-41.
104. Abdi SN, Ghotaslou R, Asgharzadeh M, Mehramouz B, Hasani A, Baghi HB, et al. AdeB efflux pump gene knockdown by mRNA mediated peptide nucleic acid in multidrug resistance *Acinetobacter baumannii*. *Microb Pathog*. 2020;139:103825.
105. Otsuka T, Brauer AL, Kirkham C, Sully EK, Pettigrew MM, Kong Y, et al. Antimicrobial activity of antisense peptide-peptide nucleic acid conjugates against non-typeable *Haemophilus influenzae* in planktonic and biofilm forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(1):137-44.
106. Rajasekaran P, Alexander JC, Seleem MN, Jain N, Sriranganathan N, Wattam AR, et al. Peptide nucleic acids inhibit growth of *Brucella suis* in pure culture and in infected murine macrophages. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;41(4):358-62.