

Research Article

The effect of silver nanoparticles on the expression of exotoxin A and S genes in *Pseudomonas aeruginosa*¹

Mohamad Hemati | Masters Student, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. mamadh1372@yahoo.com

Zahra Keshmand | Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (Corresponding Author). zkeshmand2001@gmail.com

Katayoun Borhani | Assistant Professor, Department of Environment and Food industry Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. K_borhani@yahoo.com

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causes of nosocomial infections and exotoxin genes are important in the development of this infection. On the other hand, with the advancement of nanotechnology, today, the use of nanoparticles has been widely considered in the field of medicine and medicine, especially against microbes.

The aim of the present study was to investigate the effect of silver nanoparticles (AgNPs) on the expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and S genes.

Methods: In this experimental study, the minimum growth inhibition concentration of silver nanoparticles was determined by microdilution method. First, the lowest concentration of bacterial growth inhibitor is determined with silver nanoparticles.

Then, at a concentration lower than the lowest growth rate, the expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and S genes was examined by Real time PCR. Data were analyzed using one-way ANOVA, Tukey test and P value less than 0.05.

Findings: Silver nanoparticles with a concentration of 62.5 µg / ml had growth inhibitory effects on *Pseudomonas aeruginosa*. Also, at a concentration of 31.25, the expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and S genes was significantly reduced (P<0.05).

Conclusion: The results of this study show that lower concentrations (31.25 µg/ml) than growth inhibition concentrations (62.5µg/ml) can reduce the expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and S genes.

Keywords: Silver nanoparticles, *Pseudomonas aeruginosa*, Exotoxin A, Exotoxin S.

1. **The present research is taken from:** Master's thesis with the dissertation code 10130560972003, which was conducted in 1398 with the support of the Islamic Azad University, Central Tehran Branch.

Received: 2020/08/03 ; **Accepted:** 2020/12/05

**Copyright © the authors

بررسی اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و S در سودوموناس آئروژینوزا^۱

محمد همتی | دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. mamadh1372@yahoo.com
زهرا کشتمند | استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول). zkeshtmand2001@gmail.com

کتایون برهانی | استادیار، گروه مهندسی محیط زیست و صنایع غذایی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. K_borhani@yahoo.com

چکیده

هدف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی است و ژن‌های اگزوتوکسین در بروز این عفونت دارای اهمیت می‌باشد. از سویی با پیشرفت علم فناوری نانو، امروزه استفاده از نانوذرات به طور گسترده‌ای در زمینه درمانی و دارویی بویژه بر علیه میکروب‌ها مورد توجه قرار گرفته است. لذا، تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر نانوذرات نقره (AgNPs) بر بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و S سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، حداقل غلظت مهار رشد نانوذرات نقره با روش میکروداپلوشن تعیین شد. ابتدا کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد باکتری با نانوذرات نقره تعیین گردیده، سپس در غلظت پایین‌تر از کم‌ترین غلظت مهار رشد، میزان بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و S سودوموناس آئروژینوزا با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از ANOVA یک‌طرفه، تست توکی و p value کم‌تر از ۰/۰۵ ارزیابی شد. نتایج نانوذرات نقره با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثرات مهار رشد بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا را داشته، همچنین در غلظت ۳۱/۲۵ بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و S سودوموناس آئروژینوزا به نسبت معنی‌دار کاهش یافت ($P < 0/05$).
نتایج: نانوذرات نقره با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثرات مهار رشد بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا را داشته، همچنین در غلظت ۳۱/۲۵ بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و S سودوموناس آئروژینوزا به نسبت معنی‌دار کاهش یافت ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت پایین‌تر (۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از غلظت مهار رشد (۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، می‌تواند باعث کاهش بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و S سودوموناس آئروژینوزا شود.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات نقره، سودوموناس آئروژینوزا، اگزوتوکسین A، اگزوتوکسین S.

۱. پژوهش حاضر برگرفته از: پایان‌نامه کارشناسی ارشد، با کد پایان‌نامه ۱۰۱۳۰۵۶۰۹۷۲۰۰۳ می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی اجرا شده است.

۱. تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵

۱. مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت‌طلب و گرم منفی است که در محیط‌های مختلفی از جمله خاک، آب و گیاهان یافت شده و به عنوان یک تهدید جدی در عفونت‌های بیمارستانی قلمداد می‌شود (۱).

این باکتری به صورت ویژه در بیماران بستری شده در بیمارستان، افراد مبتلا به سیستیک فیبروزیس، میزبان‌های دارای اختلال و نقص در سیستم ایمنی دارای اهمیت خاصی است و می‌تواند خطراتی را به همراه داشته باشد و در هر قسمت از بدن انسان که دارای رطوبت کافی باشد می‌تواند رشد کند، اما معمولاً روی افراد سالم تأثیرگذار نیست (۲).

مشخصات پاتولوژیک و مکانیسم توکسیسیته سودوموناس آئروژینوزا در سویه‌های مختلف، متفاوت بوده و دارای سیستم ترشحی تیپ III مختلفی هستند. سیستم ترشحی تیپ III در تلقیح توکسین‌ها به داخل سلول میزبان نقش دارد (۳).

اهمیت ژن سیستم ترشحی تیپ III بر مبنای ژنوتیپ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا برای تشخیص فاکتورهای ویروالانس و پیش‌بینی نتایج بالینی است (۴).

سودوموناس آئروژینوزا دارای فاکتورهای ویروالانس متعددی از قبیل اجزای ساختاری، توکسین‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد، از مهم‌ترین توکسین‌ها و آنزیم‌های ترشحی سودوموناس آئروژینوزا، آگزوتوکسین A، آگزوتوکسین S، آگزوتوکسین T، الاستاز و فسفولیپاز C را می‌توان نام برد (۳).

آگزوتوکسین S، یک سایتوتوکسین بزرگ خارج سلولی و نوعی آگزوانزیم است. هنگامی که سیستم ترشحی تیپ III پروتئین‌ها را به درون سلول‌های یوکاریوت مورد نظر وارد می‌کند، آسیب به سلول‌های اپی تلیالی رخ داده و تسهیل انتشار باکتریایی، تهاجم بافتی و نکروز انجام می‌شود (۵).

آگزوتوکسین مهم دیگر این باکتری، نوع A می‌باشد که سم اصلی تولید شده توسط این باکتری بوده و از عوامل مرگ و میر می‌باشد که در ۹۰٪ از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. این ترکیب از طریق سیستم ترشحی تیپ II به فضای خارج سلولی ترشح می‌گردد و تولید فاکتور طویل‌سازی پروتئین را مهار می‌کند. در نتیجه، پروتئین‌سازی سلول متوقف شده و منجر به مرگ سلولی می‌گردد و برای سلول‌های یوکاریوتیک سمی است. این توکسین نیز دارای فعالیت ADP ریبوزیل ترانسفرازی بوده و موجب القای تولید اینترلوکین-۱ می‌شود (۶).

با توجه به نقش عوامل بیماری‌زا در باکتری‌ها، شناسایی ترکیباتی که بیان این عوامل بیماری‌زایی

را در باکتری‌ها کاهش دهد، می‌تواند نقش بسزایی در پیشگیری و درمان بیماری‌های میکروبی به ویژه باکتریایی در علم پزشکی داشته باشد. از این‌رو امروزه پژوهشگران در جستجوی یافتن راه‌حل‌های جدید برای کاهش اثرگذاری باکتری‌های بیماری‌زا هستند. یکی از زمینه‌های کاربردی نانوبیوتکنولوژی، استفاده از نانوذرات به عنوان ترکیبات ضد میکروبی، به خصوص در عفونت‌های بیمارستانی باکتریایی می‌باشد (۷).

نانوذرات موادی در محدوده‌ی ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشند. این مواد اثرات ضد میکروبی گسترده‌ای نسبت به باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مایکوباکترها و قارچ‌ها نشان داده‌اند (۸). قرن‌هاست که فعالیت ضد میکروبی فلزات سنگین مثل نقره (Ag)، مس (Cu)، طلا (Au)، تیتانیوم (Ti) و روی (Zn) به اثبات رسیده و خواص ضد میکروبی نانوذرات فلزی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۹، ۱۰).

برای مثال، نانوذرات فلزی مانند اکسید نقره (Ag_2O)، دی اکسید تیتانیوم (TiO_2)، سیلیکا (Si)، اکسید مس (CuO)، اکسید روی (ZnO)، طلا (Au)، اکسید کلسیم (۱) و اکسید منیزیم (MgO) فعالیت ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها نشان داده شده و فعالیت ضد باکتری متفاوت این نانوذرات نیز گزارش داده شده است (۱۱). از میان انواع مختلف نانوذرات، نقره به دلیل خواص منحصر به فرد آن‌ها که کاربردهای ضد میکروبی متعددی دارند، به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. به نظر می‌رسد که نانوذرات نقره سنتز شده به طور شیمیایی و یا زیستی موجب مهار رشد باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت و مخمرها می‌شوند. این ترکیبات فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند. فعالیت ضد میکروبی کمتر بر روی باکتری‌های گرم مثبت را می‌توان به ترکیب دیواره ضخیم سلولی آن‌ها نسبت داد (۱۲). 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 پروتئین‌های داخل سلولی، به خصوص پروتئین‌های غشایی حاوی سولفور و DNA میکروبی می‌تواند با تقسیم سلولی مداخله نموده و منجر به مرگ سلولی شود (۱۳، ۱۲). از سویی نسبت سطح به حجم پایین نانوذرات، می‌تواند فعالیت ضد میکروبی را افزایش دهد که باعث ایجاد تعامل بیشتر نانومواد با محیط اطراف می‌شود. شیمی، اندازه، شکل ذرات و پتانسیل زتا از مهم‌ترین متغیرهای موثر بر فعالیت ضد باکتریایی هستند (۲). همچنین، انتشار زیاد یون‌های

ضد باکتری فلزی از سطح نانوذرات، مکانیسم دیگری است که پیشنهاد می‌شود. با توجه به مکانیسم‌های تاثیرگذار شناخته شده از نانوذرات، به ویژه نقره، هدف از این مطالعه بررسی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر مهار رشد باکتری و تاثیر این غلظت بر بیان ژن‌های ایجادکننده بیماری، آگزوتوکسین A و آگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۱۳).

در حال حاضر پژوهش‌های بیشتر و دقیق‌تر در مورد کاربرد نانوذرات و تغییرات سطح آن‌ها برای دستیابی به فعالیت ضد میکروبی در حال افزایش است (۹،۱۰). با توجه به نتایج مطالعات پیشین و تایید اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره، این پژوهش با هدف بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر بیان برخی از ژن‌های بیماری‌زای باکتری سودوموناس آئروژینوزا از جمله آگزوتوکسین‌های A و S انجام شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. تهیه نانوذرات نقره

محلول کلونیدی نانوذرات نقره با قطر میانگین ۲۰ نانومتر استفاده شده در این پژوهش، از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان با متوسط اندازه ۲۰ نانومتر با درصد خلوص ۹۹/۹۹، از شرکت آمریکایی Nano US خریداری شد.

۲-۲. تهیه باکتری

در این مطالعه از سویه استاندارد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853) خریداری شده از شرکت بهار افشان استفاده شد. باکتری بر روی محیط‌های کشت Muller Hinton Agar شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز انکوبه گردید و جهت ارزیابی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی یک کلنی از کشت ۲۴ ساعته از باکتری در محیط MHA برداشته و به محیط MHB اضافه شد، پس از آن میزان جذب نوری سوسپانسیون تهیه شده در طول موج ۶۲۵ nm معادل غلظت نیم مک فارلند (cells/ml) 0.1×10^8 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 سوسپانسیون با رقت ۱:۱۰ 5×10^5 cells/ml به هر یک از چاهک‌های پلیت میکروتیتر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد (۱۴).

روش تعیین حداقل غلظت رشد نانوذرات نقره بر علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا:

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) از روش رقیق‌سازی در مایع یا میکرودايلوشن براث براساس استاندارد CLSI^۱ استفاده شد.

برای تعیین MIC از روش میکرودايلوشن براث در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. به این ترتیب که ابتدا مقدار ۹۵ میکرولیتر محیط کشت MHB از چاهک شماره ۱ تا ۹ در هر ردیف ریخته شد و سپس در تمام چاهک‌های ستون اول ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره تهیه شده (در سه تکرار) اضافه گردید.

بعد از این اولین چاهک ردیف اول با سمپلر به خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن با سمپلر به چاهک بعدی منتقل گردید، این کار تا چاهک ۹ به همین ترتیب انجام شد و ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک ۹ دور ریخته شد.

غلظت نانوذره‌ها در چاهک‌ها به ترتیب ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲ و ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) بود. نهایتاً ۵ لانداز سوسپانسیون میکروبی معادل ۵ مک فارلند به تمام چاهک‌ها اضافه گردید.

چاهک‌های ۱۱ و ۱۲ نیز به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. چاهک ۱۱ فقط حاوی محیط کشت و چاهک ۱۲ فقط حاوی سوسپانسیون باکتری بود. 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، به عنوان MIC در نظر گرفته شد و پس از کشت لوله‌های فاقد کدورت روی محیط مولر هیتون آگار، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت (۱۵).

بررسی بیان ژن‌های آگزوتوکسین A و آگزوتوکسین S به کمک Time-Real PCR:

در ابتدا حضور ژن‌های آگزوتوکسین A و آگزوتوکسین S با تکنیک PCR در سوبه باکتری استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853) تایید شد. بعد از تایید وجود ژن‌ها، در سوبه

آزمایش، از RNA استخراج شده از باکتری آئروژینوزا در غلظت subMIC (۳۱/۲) میکروگرم بر میلی‌لیتر) نانوذرات نقره توسط دستورالعمل تهیه شده از کیت RNAX PLUS (شرکت سیناژن، ایران) به منظور بررسی بیان ژن‌های ۱۶sRNA به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی، آگزوتوکسین A و آگزوتوکسین S استفاده شد).

غلظت RNA مورد استفاده حدود ۱ تا ۲ میکروگرم در نظر گرفته شد. برای بررسی درصد خلوص RNA استخراج شده، جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه نانو دراپ^۱ اندازه‌گیری شد. جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی 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 مورد قبول بود. همچنین باندهای ژن‌ها نیز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در دستگاه الکتروفورز مشاهده گردید (۱۶).

جهت ساخت cDNA، از RNA استخراج شده از کیت مخصوص سنتز cDNA (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea) و جهت حذف آلودگی‌ها، قبل از سنتز cDNA، از RNA استخراج شده از آنزیم DNaseI (Fermentase, Waltham, USA) استفاده شد (۱۷). برای انجام تست RealTime PCR از مسترمیکس حاوی سایر گرین^۲ (انگلستان، Applied Biosystem) و از دستگاه RealTime (Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Australia) استفاده شد.

حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی برای ژن‌های ۱۶sRNA، آگزوتوکسین A و آگزوتوکسین S و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Bioneer، و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل بود.

چرخه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. ۱۶sRNA به عنوان

1. Nanodrop Bio Tek Epoch, USA

2. Green SYBER

کنترل مثبت در نظر گرفته شد و برای هر نمونه، واکنش دو مرتبه انجام گرفته و میانگین مقادیر به دست آمده به عنوان مقدار (کمیت) بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد.

از فرمول مرجع نسبی بیان $\Delta\Delta Ct$ برای تعیین بیان ژن مورد نظر استفاده گردید. $\Delta\Delta Ct$ توسط تفریق ΔCt نمونه تیمار شده با نانوذرات نقره از ΔCt نمونه تیمار نشده استاندارد به دست آمد. نسبت ژن‌های هدف اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S به ژن مرجع (۱۶sRNA) $2^{\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (۱۸).

طراحی پرایمرهای این تحقیق با نرم‌افزارهای Primer Express و Runner Gene انجام گرفت. سپس به منظور تایید پرایمرها، با استفاده از توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی و ابزار آنالین BLAST در سایت NCBI^۱، صحت پرایمرها انجام شد. در جدول شماره ۱ توالی جفت پرایمرهای جلوبر و برگشتی سه ژن اگزوتوکسین A، اگزوتوکسین S و ۱۶sRNA مشخص شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای ۱۶sRNA، اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروژینوزا

F-۱۶sRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
R-۱۶sRNA	GGTTACCTTGTTACGACTT
F- اگزوتوکسین S	CTACACCGGCATTCCTACTAC
R- اگزوتوکسین S	AAGTCTTCACTACCTGTTCTAG
F- اگزوتوکسین A	CACGAGAGCAACGAGATG
R- اگزوتوکسین A	GGCGAGGTAGTTGTAGAC

۲-۳. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده، توسط نرم‌افزار SPSS-18 و با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه^۲ و آزمون متعاقب^۳ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج تاثیر دوز نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S در باکتری

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

2. One way ANOVA

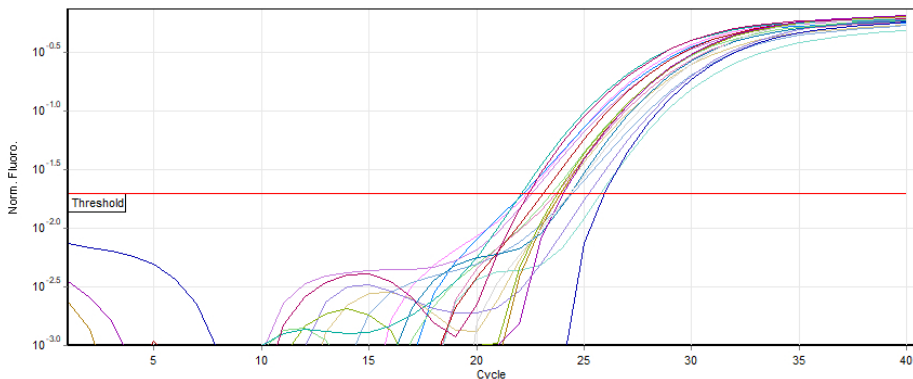
3. Tukey

سودوموناس آئروژینوزا به منظور 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.

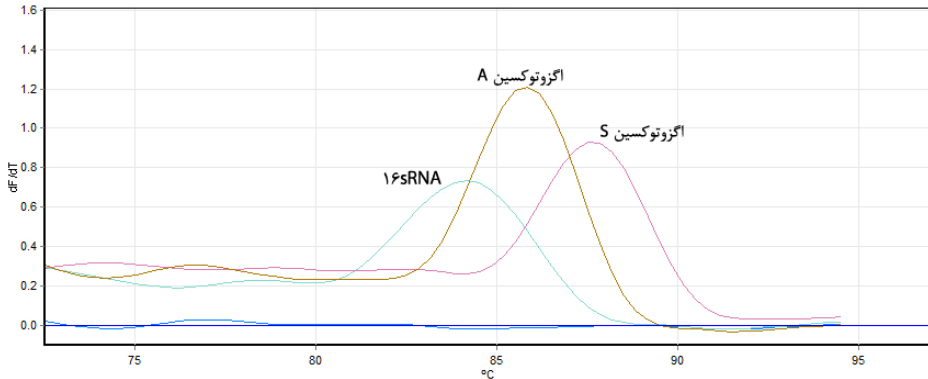
کم‌ترین غلظتی که در حضور آن کدورتی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکننده (MIC) در نظر گرفته شد که غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و جهت بررسی تاثیر غلظت نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S از بالاترین غلظت زیر مهار رشد (subMIC) (۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد.

نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروژینوزا در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره با غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در شکل ۲ آمده است. همچنین به منظور تعیین اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده از منحنی ذوب حاصل از واکنش PCR time Real استفاده گردید که در شکل ۲ نشان داده شده است.

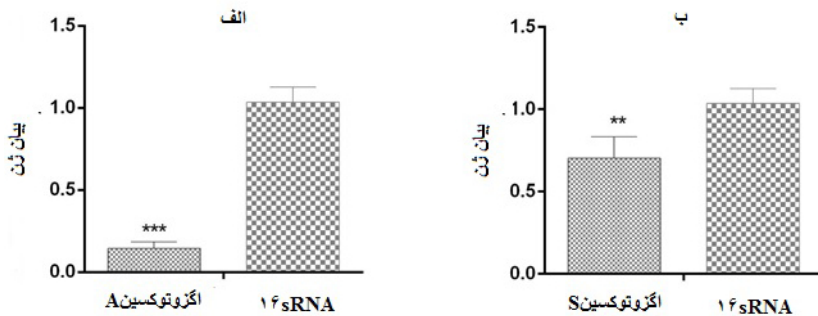
بیان ژن‌های اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروژینوزا در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره با غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل ژن ۱۶sRNA کاهش معنادار این دو ژن را نشان داد ($P < 0/001$, $P < 0/01$) (شکل ۳) که در واقع نشانه‌ی تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر کاهش بیان اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروژینوزا است.



شکل ۱- نمودار تکثیر ژن‌های ۱۶sRNA، اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروژینوزا با غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره



شکل ۲- نمودار منحنی ذوب ژن‌های ۱۶sRNA در دمای ۸۳/۷۹،
 آگروتوکسین A در دمای ۸۶/۵۴ و آگروتوکسین S در دمای ۸۷/۶۸



شکل ۳- نمودار مقایسه میزان بیان ژن‌های آگروتوکسین A (الف) و آگروتوکسین S (ب)
 باکتری سودوموناس آنروژینوزا تیمار شده با غلظت ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره با ژن رفرنس ۱۶sRNA

مقادیر براساس میانگین \pm میانگین خطای انحراف معیار آورده شده است.
 علامت ** نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار $P < 0/01$ با ژن رفرنس ۱۶sRNA است.
 علامت *** نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار $P < 0/001$ با ژن رفرنس ۱۶sRNA است.

۳. بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین کم‌ترین مهار رشد نانوذرات نقره باکتری سودوموناس آنروژینوزا و سپس بررسی غلظت پایین از غلظت مهار رشد باکتری بر بیان ژن‌های آگروتوکسین A و S این سویه باکتری انجام گرفت.

سودوموناس آنروژینوزا یک باکتری فرصت‌طلب بوده که باعث ایجاد عفونت‌های سیستمیک،

جلدی پایدار و مخرب در انسان می‌شود. از طرفی، فرآورده‌های توکسیک این باکتری منجر به مرگ می‌گردد. ساختار غشایی خاص این باکتری، عامل مقاومت آن نسبت به اکثر عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیکی است (۱،۲). با توجه به تلاش همه جانبه در جهت کنترل عفونت‌های سودوموناسی و سایر باکتری‌های مقاوم، به ویژه در عفونت‌های سوختگی، شناسایی ترکیباتی به عنوان عوامل ضد سودوموناسی ضرورت دارد (۱). از جمله ترکیبات مورد توجه محققان در سال‌های اخیر نانوذرات و به ویژه نانوذرات نقره می‌باشد. اندازه کوچک نانوذرات (۱ تا ۱۰۰ نانومتر)، سبب افزایش سطح تماس، خاصیت ضد میکروبی و تاثیرگذاری آن‌ها بر سلول‌ها تا بیش از ۹۹ درصد در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر شده است. از این‌رو، توجه پژوهش‌های علمی در زمینه‌های مختلف به خصوص علم پزشکی را به خود جلب کرده است (۶،۸).

از عوامل ایجاد بیماری توسط باکتری‌ها، بیان ژن‌های بیماری‌زای خاص در آن‌ها می‌باشند. با توجه به اینکه آگزوتوکسین باکتریایی نقش مهمی در چسبندگی، تشکیل بیوفیلم و بیماری‌زایی باکتری‌ها دارند، بررسی تاثیر نانوذرات بر بیان این ژن‌ها احتمالاً بتواند گام موثری در کاهش بیماری‌های مرتبط با این باکتری‌ها داشته باشد (۱۹).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که غلظت مهار رشد باکتری توسط نانوذرات نقره، غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. از آنجایی که جهت بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های آگزوتوکسین A و S از غلظت پایین‌تر از مهار رشد باکتری استفاده شد، نتایج نشان داد که غلظت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های آگزوتوکسین A و S در مقایسه با گروه کنترل (ژن ۱۶sRNA) کاهش معنی‌داری داشته است، که در واقع نشانه‌ای بر تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر بیان این ژن‌های بیماری‌زا در باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. همچنین در مقایسه بین ژن‌ها چنین استنباط می‌شود که بیان ژن آگزوتوکسین A در مقایسه با ژن آگزوتوکسین S کاهش بیشتری داشته است.

در مطالعه Flockton و همکاران (۲۰۱۹)، اولین نانوذرات پلیمری اصلاح شده با سطح LecA به منظور غیرفعال‌سازی بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا ساخته شد. ذرات تهیه شده از LecA در مهار hemagglutination، اثر بالایی داشتند که در نتیجه اثر بیماری‌زایی بیوفیلم باکتری را کاهش داد. این احتمال مطرح است که مونتاژ نانوذرات به عنوان داربست‌های چندمنظوره برای جلوگیری از فرآیند چسبندگی آگزوتوکسین‌ها عمل می‌کند. کما اینکه در مطالعه

Flockton و همکاران (۲۰۱۹)، استفاده از نانوذرات، مانع از ایجاد خاصیت چسبندگی لکتین و در نتیجه جلوگیری از ایجاد بیوفیلم باکتری گردید (۲۰).

Yuan و همکاران (۲۰۱۷)، در مطالعه‌ای اثرات نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی را روی باکتری سودوموناس آئروژینوزای جداسازی شده از نمونه‌های ورم پستان بررسی کردند. حداقل غلظت مهاري (MIC) نانوذرات در مقابل سودوموناس آئروژینوزا ۱ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. یافته‌های آن‌ها نشان داد که نانوذرات نقره اثرات ضد باکتریایی را به روشی وابسته به دوز و زمان انجام داده و فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره در نتیجه تاثیر بر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، مالون دی آلدئید (MDA) و نشت پروتئین‌ها و قندها در سلول‌های باکتریایی می‌باشد (۲۱).

در سال ۲۰۱۸، Darabpour و همکاران، در مطالعه‌ای فعالیت ضدبیوفیلمی نانوذرات را بر علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا با اثرگذاری بر آگزوتوکسین A مورد بررسی قرار دادند و تاثیر حداقل غلظت مهاري رشد بر باکتری توسط نانوذرات نقره ۱ (میلی گرم بر میلی لیتر) نشان داده شد (۲۲)، که در این مطالعه نیز تاثیر نانوذرات نقره بر بیان ژن آگزوتوکسین A گزارش گردید.

ریچا سینگ و همکاران^۱ در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای مبنی بر بررسی تاثیر نانوذرات برای کنترل عفونت ناشی از بیوفیلم گونه‌های اسپیتوباکتر انجام دادند. در گزارش آن‌ها به اهمیت نقش نانوذرات مختلف به عنوان عوامل ضد بیوفیلمی در اسپیتوباکتر، مواد پوشاننده سطح برای کنترل و درمان بیوفیلم‌های اسپیتوباکتر پرداخته شد و نتیجه مثبت تاثیر نانوذرات بر کاهش تولید بیوفیلم را گزارش دادند (۲۳).

هندیایی و همکاران (۱۳۹۱) مطالعه‌ای در خصوص مقایسه فعالیت ضد بیوفیلمی نانوذره نقره و چند ترکیب ضد میکروبی دیگر علیه سویه‌های اسپیتوباکتر مولد بیوفیلم انجام دادند. نتایج مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیبات دارویی با طیف وسیع‌تر مانند نانوذرات نقره در ترکیب با مواد ضد میکروبی مناسب می‌تواند باعث کاهش تشکیل بیوفیلم و حذف بیوفیلم‌های بالغ، کاهش دوز موثر داروها، افزایش کارایی درمان و جلوگیری از تشکیل سویه‌های مقاوم شود (۲۴). پژوهش انجام شده دیگر توسط پیری قراقیه و شاندیز اثرات مهاري SubMIC غلظت نانوذرات نقره بر بیان ژن ایجادکننده بیوفیلم bap اسپیتوباکتر بومانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک با استفاده از

Real Time PCR نیز نشان داده شد (۱۶). میانکنش نانوذرات با پروتئین‌های داخل سلولی، به خصوص پروتئین‌های غشایی حاوی سولفور و DNA میکروبی می‌تواند با تقسیم سلولی مداخله نموده و منجر به مرگ سلولی شود (۲۵).

نانوذرات نقره توجهات زیادی به خاطر پایداری شیمیایی، فعالیت کاتالیتیک و رسانایی بالا به خود جلب کرده است (۸). گزارشات قبلی نشان داده گونه‌های اکسیژن فعالی (ROS) که در سطح نانوذرات نقره شکل می‌گیرند، در شرایط خاص آزاد شده و ممکن است باعث القای مرگ سلول‌های میکروبی شوند و این امر به نانوذرات نقره ویژگی‌های منحصر به فرد میکروبی و ضد قارچی می‌بخشد (۲۶).

در بررسی‌های مختلف نشان داده شده است که اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره با کاهش سطح آدنوزین تری فسفات درون سلولی، اتصال به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها، از بین بردن خواص اصلی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، نفوذ به درون سلول‌ها، غیر فعال کردن آنزیم‌ها و تولید هیدروژن پراکسید و در نهایت مرگ باکتری نسبت داده شده است. این امر از یک طرف سبب تغییر در مورفولوژی و همچنین نفوذپذیری غشاء و تاثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌گردد (۲۶ و ۲۷).

۴. نتیجه‌گیری

پیشرفت در فناوری نانو و سنتز نانومواد، راهی برای رویکردهای نوآورانه جهت توسعه عوامل ضد میکروبی جدید فراهم نموده است. نانوذرات، فعالیت ضد میکروبی را با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی اعمال می‌کنند که ممکن است از لحاظ خواصی مانند اندازه، مورفولوژی، بار الکتریکی، پوشش سطح و غیره متفاوت باشند. این امر دانشمندان را قادر به طراحی عوامل ضد میکروبی جدید برای کاربردهای مختلف می‌نماید. فعالیت ضد میکروبی ناشی از نانوذرات مبتنی بر فلز و نانوذرات مبتنی بر کربن، در آینده می‌تواند کاربردهای پزشکی و صنعتی مختلفی پیدا کند و راه‌حلی را برای چالش‌های فعلی مقاومت میکروبی با روش‌های متعارف درمان ارائه دهد. علاوه بر این، نانومواد کاربردهای فراوانی برای پیشگیری، تشخیص و درمان عفونت‌ها و همچنین کنترل بیوفیلم‌ها و توکسین‌ها دارند. با این حال، لازم است مطالعات گسترده‌ای در مورد این نانومواد انجام شود تا قبل از کاربردهای صنعتی گسترده، تاثیر آن بر بافت‌های طبیعی تعیین شود و اثرات آن بر روی انسان و محیط زیست مورد ارزیابی قرار گیرد.

References

1. Soltan DM & et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* isolated from the faeces of healthy infants against nonfermentative bacteria causing nosocomial infections. *New Microbes New Infect.* 2017; 15: 9-13.
2. Motaghi B & Mojafipour S. Outer Membrane Protein D Gene in clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and its Role in Antibiotic Resistance. *Journal of Fasa University of medical Sciences.* 2016; 5(4): 501-507.
3. Tang Y & et al. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Using Magnet ic Enrichment Multiplex Polymerase Chain Reaction and Chemiluminescence. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2016; 12(4): 762-769.
4. Mokari M, Owlia P, Marashi SMA, Saderi H & Dehghan Zadeh Z. The effect of supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on preventing the growth of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and its effect on exotoxin S gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria by Real-Time PCR method. *Daneshvar Medicine: Basic and Clinical Research Jouranl.* 2018; 25(6): 67-74.
5. Bouillot S, Attrée I & Huber P. Pharmacological Activation of Rap1 Antagonizes the Endothelial Barrier Disruption Induced by Exotoxins ExoS and ExoT of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2015; 83(5): 1820-1829.
6. Pavlovskis OR, Iglewski BH & Pollack M. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in experimental mouse infections: adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infection and Immunity.* 1978; 19(1): 29-33.
7. Donelli G & Vuotto C. Biofilm based infections in long term care facilities. *Future Microbiology.* 2014; 9: 175-188.
8. Tran QH, Nguyen VQ & Le A. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology.* 2013; 4(3).
9. Mortazavi H, Nakhaei Moghaddam M & Abadi NS. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences.* 2015; 14(2): 125-136.
10. Björndahl MR, Cao LJ, Nissen S, Clasper LA, Johnson Y, Xue Z & et al. Lnsulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005; 102(43): 15593-15598.
11. Heinlaan M, Lvask A, Blinov L, Dubourgier HC & Kahur A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio Fischer* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere.* 2008; 71(7): 1308-1316.
12. Fernando S, Gunasekara T & Holton J. Antimicrobial Nanoparticles: Applications and mechanisms of action. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases.* 2018; 8(1): 2-11
13. Zargar M & Mohamadeibandarei N. Silver nanoparticles and their applications. *Applied Biology.* 2013; 3(11): 13-31.

14. Kavyani B, Alikhani MY, Arabestani MR, Moradkhani SH & Taheri M. The effect of garlic extract on the expression of genes elastase and exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa*. *Tehran University Medical Journal*. 2016; 74(8): 584-590.
15. Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA & Mount JR. Antimicrobial activity of Essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*. 2001; 64(7): 1019-1024.
16. Pirigharaghie T & Sadatshandiz A. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on *Bap* Gene Expression in Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates using Real-Time PCR. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2018; 26(4): 175-185.
17. Tong Zh & et al. Modified protocol for RNA extraction from different peach tissues suitable for gene isolation and Real-Time PCR analysis. *Molecular Biotechnology*. 2012; 50(3): 229-236.
18. Azizi O & et al. Molecular analysis and expression of *bap* gene in biofilm forming multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Report of Biochemistry Molecular Biology*. 2016; 5: 68-74.
19. Liesje S, Bart D, Paul V, Benny F & Pyck G. The Antibacterial Activity of Biogenic Silver and Its Mode of Action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 31(2): 113-189.
20. Flockton, TR, Schnorbus L, Araujo A, Adams J, Hammel M & Perez LJ. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation with Surface Modified Polymeric Nanoparticles. *Pathogens*. 2019; 8(2): 55.
21. Yuan YG, Peng QL & Gurunathan S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(3): 569.
22. Darabpour E, Doroodmand MM, Halabian R & Imani Fooladi AA. Sulfur-Functionalized Fullerene Nanoparticle as an Inhibitor and Eliminator Agent on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Expression of *toxA* Gene. *Microbial Drug Resistance*. 2019; 25(4): 594-602.
23. Singh R, Nadhe S, Wadhvani S, Shedbalkar U & Chopade B. A nanoparticles for control of biofilms of *Acinetobacter* species. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. 2016; 9(5): 383.
24. Hendiani S, Abdiali A, Mohammadi P. Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Biological Journal of Microorganism*. 2014; 2(8): 51-56.
25. Palanisamy NK, Ferina N, Amirulhusni AN, Mohd-Zain Z, Hussaini J, Ping J & Durairaj R. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of nanobiotechnology*. 2014; 12(2): 2-7
26. Camporotondi D, Foglia M, Alvarez G, Mebert A, Diaz L, Coradin T & Desimone M. *Antimicrobial properties of silica modified nanoparticles*. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them*. Science, Technology and Education; Microbiology Book Series. 2013: 283-290.

27. Yeo Y, Ito T, Bellas E, Highley CB, Marini R & Kohane DS. In situ cross-linkable hyaluronan hydrogels containing polymeric nanoparticles for preventing postsurgical adhesions. *Annals of surgery*. 2007; 245(5): 819.

استناد به این مقاله

همتی، محمد؛ کشتمند، زهرا؛ برهانی، کتابون (۱۳۹۹). بررسی اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های آگزوتوکسین A و S در سودوموناس آئروژینوزا. *بیولوژی کاربردی*، ۱۰(۴۰)، ص ۳۷-۵۲.