

ارزیابی اثر مهارکنندگی نانوذره اکسید روی بیوسنتتیک بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ (*AdeA*, *AdeC*) در سویه‌های بالینی *Acinetobacter baumannii*

Evaluation of the Inhibitory Effect of Biosynthetic Zinc Oxide Nanoparticles on the Expression of Efflux Pumps Genes (*AdeA*, *AdeC*) in Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*

فاطمه صالح^۱، فرزانه حسینی^{۱*}، فرناز خیراندیش^۲، فاطمه یزدیان^۳

Fatemeh Saleh¹, Farzaneh Hosseini^{1*}, Farnaz Kheirandish², Fatemeh Yazdian³

۱-گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲-گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ایران، گروه بیوتکنولوژی،

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ایران

۳-گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

1-Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

2-Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

3-Faculty of New sciences and Technologies University of Tehran, Tehran, Iran

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Farzaneh953@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۲۵)

چکیده

واژه‌های کلیدی

افلاکس پمپ،

اکسید روی،

مقاومت دارویی چندگانه،

نانوذرات

معرفی یک عامل ضدباکتریایی مؤثر اهمیت فراوانی در کنترل سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. پیشرفت‌های گذشته در زمینه نانوتکنولوژی، به‌ویژه توانایی ساخت نانوذرات بیولوژیک منجر به ایجاد دسته وسیعی از عوامل ضد میکروبی شده است؛ لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی خواص آنتی‌باکتریایی نانوذره اکسید روی (ZnO) در مهار سویه‌های مقاوم *Acinetobacter baumannii* به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی است. از مجموع ۱۰۰ نمونه باکتریایی مختلف، تعداد ۱۰ نمونه *آسیتوباکتر* از مراکز بالینی شهرستان خرم‌آباد در بازه زمانی شش ماهه اول سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری و بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شد. پس از تیمار سویه‌های MDR با حداقل غلظت مهار نانوذره اکسید روی، میزان بیان ژن‌های افلاکس پمپ *AdeA* و *AdeC* با استفاده از روش Real-time PCR ارزیابی شد. بعد از اعمال اثر نانوذره اکسید روی در ژن *AdeA*، ۸۰ درصد نمونه‌ها کاهش بیان را نشان دادند. ۲۰ درصد نمونه‌ها نیز بیان افزایشی داشتند. همچنین در ژن *AdeC*، ۴۰ درصد نمونه‌ها بعد از اعمال اثر نانوذره اکسید روی کاهش بیان را نشان دادند. ۶۰ درصد نمونه‌ها نیز بیان افزایشی داشتند. طبق نتایج این پژوهش، اثر مهارکنندگی مطلوب نانوذره اکسید روی بیوسنتتیک بر بیان ژن‌های *AdeA* و *AdC* که نقش مهمی در مقاومت دارویی گونه‌های *آسیتوباکتر* دارند مشهود بود. از طرفی باتوجه به بیان افزایشی در ۶۰ درصد نمونه‌ها برای ژن *AdeC* احتمال بروز جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده را مطرح ساخت. به نظر می‌رسد در آینده می‌توان از نانوذره اکسید روی به‌عنوان یک کاندید دارویی در داروسازی استفاده کرد.

مقدمه

به موازات توسعه سریع زندگی بشری، کنترل اثرهای مضر میکروب‌ها امری غیرقابل اجتناب شده است، طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها به طور هم‌زمان در تعادل با محیط زندگی انسان‌ها هستند، اما رشد سریع و کنترل نشده آن‌ها می‌تواند منجر به بروز مشکلات جدی شود (Senapati et al., 2012, Zarei et al., 2014). بیماری‌های عفونی در زمره شناخته‌شده‌ترین بیماری‌هایی هستند که همواره گریبان گیر انسان بوده و تلاش‌های زیادی جهت شناخت عوامل ایجادکننده درمان و کنترل آن‌ها صورت گرفته است. از زمان عرضه آنتی‌بیوتیک‌ها و به‌کارگیری آن‌ها در درمان بیماری‌ها، باکتری‌ها همواره در تلاش بوده‌اند که بر اساس قانون انتخاب طبیعی بتوانند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کنند (Goudarzi et al., 2013). استفاده بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های گذشته مشکلات فراوانی ناشی از تأثیرات سمی و به‌ویژه پیدایش سویه‌های مقاوم را به وجود آورده است. بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کرده‌اند و به‌این ترتیب کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش یافته است (Goudarzi et al., 2013). پیشرفت‌های گذشته در زمینه نانوتکنولوژی به‌ویژه توانایی ساخت نانوذرات در شکل‌ها و سایزهای مختلف منجر به ایجاد دسته وسیعی از عوامل ضد میکروبی شده است. مواد در ابعاد نانو نسبت سطح به حجم بیشتری در مقایسه با ذرات بزرگتر با همان ترکیب شیمیایی دارند و همین امر موجب می‌شود تا از نظر بیولوژیکی فعال‌تر شوند (Fakhroueian et al., 2019). در این میان باکتری‌ها به‌عنوان موجودات زنده کارآمد شناخته می‌شوند زیرا توانایی تولید مقدار زیادی آنزیم، آمینواسید، پلی ساکارید و ویتامین را دارند که به‌عنوان عوامل کاهنده یون‌های فلزی عمل می‌کنند (El Enshasy et al., 2018). علاوه بر این سلول‌های باکتریایی توانایی سم‌زدایی شیمیایی را دارند. بنابراین می‌توانند در غلظت‌های بالایی از فلزات سمی رشد کنند (Chokriwal et al., 2014). این انتشار و سم‌زدایی با استفاده از پروتئین‌های غشایی انجام می‌گیرد که مانند ناقل‌های معکوس کاتیون و پروتون یا ATPase عمل می‌کنند در نتیجه سیستم‌های

میکروبی می‌توانند با احیا و رسوب دادن، یون‌های معدنی محلول سمی را به یون‌های غیر سمی و غیر محلول تبدیل کنند (Narayanan and Sakthivel, 2010). مشخص شده است که بسیاری از فلزات سنگین در غلظت‌های بسیار کم، باکتری‌ها را از بین می‌برند. سازوکار اصلی تأثیر نانوذرات بر روی باکتری‌ها از طریق آسیب به DNA، پروتئین و تخریب دیواره سلولی است (Zarei et al., 2014, Amjady et al., 2016). یکی از مهم‌ترین نانوذرات، اکسید روی (ZnO) است که در بسیاری از کشورها در مقیاس صنعتی استفاده می‌شود. از خصوصیات نانوذرات اکسید روی می‌توان به تأثیر سریع، غیر سمی بودن، غیر حساسیت‌زا بودن قابلیت، تحمل شرایط مختلف (پایداری زیاد)، آب‌دوست بودن، خاصیت آنتی‌باکتریال، سازگاری با محیط‌زیست، مقاومت در برابر حرارت و سازگاری در موجودات زنده اشاره نمود (Narayanan and Sakthivel, 2010). مزیت استفاده از نانوذرات اکسید روی این است که آن‌ها به‌شدت از فعالیت میکروب‌های بیماری‌زا در صورت استفاده در غلظت کم جلوگیری می‌کنند و اکسید روی باکتریال اکسید روی نیز شبیه سایر نانوذرات است ولی بیشتر از طریق تخریب دیواره باکتری عمل می‌کند. با توجه به این ویژگی، نانوذره اکسید روی به‌عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات برای مقابله با باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Siddiqi et al., 2018). اختلاف بین بار منفی باکتری‌ها و بار مثبت نانوذره، به‌صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذره عمل کرده و احتمال می‌رود که یون‌های آزادشده از نانوذرات با گروه‌های تیول SH پروتئین‌های سطحی سلول‌های باکتریایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئین‌های غشای سلول‌های باکتریایی عمل انتقال مواد معدنی از سطح دیواره را به عهده دارند، که نانوذرات با اثر بر روی این پروتئین‌ها باعث غیرفعال شدن و نفوذناپذیری غشاء می‌شوند (Esmaeilzade et al., 2014). طبق مطالعات گذشته، مهار رشد قابل توجه اکسید روی علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها گزارش داده شده است. Lakshmi و همکارانش فعالیت ضد باکتریایی

به صورت فنوتیپی بررسی کرده و سپس بیان ژن های افلاکس پمپ AdeABC را با روش Real Time-PCR ارزیابی نماییم.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها و بررسی تست حساسیت آنتی بیوتیکی:

از مجموع ۱۰۰ نمونه باکتریایی مختلف تعداد ۱۰ نمونه آسیتوباکتر از مراکز بالینی شهرستان خرم آباد در بازه زمانی ۶ ماه اول سال ۱۳۹۹ جمع آوری شد. باکتری ها از نمونه های مختلف بالینی مانند زخم، خون، خلط، ادرار و غیره جداسازی شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه تمامی نمونه های باکتریایی به وسیله آزمون های تشخیصی و بیوشیمیایی شناسایی و تعیین هویت شدند. تست های بیوشیمیایی شامل بررسی تولید اسید از قندهای گلوکز، گزیلوز، گالاکتوز، لاکتوز، مانوز، رامنوز، مالتوز، ساکارز و مانیتول بود. همچنین تست سیمون سیترات، بایل اسکولین و تولید آنزیم اوره آز و اکسیداز نیز بررسی شد. تولید گاز سولفید هیدروژن در محیط کشت Triple Sugar Iron (TSI) بررسی شد. تست های احیای نیتрат و متیل رد و Voges-Proskauer (VP) نیز انجام شد. (Bouvet and Grimont, 1986, Constantiniu et al., 2004). سپس از نظر مقاومت به آنتی بیوتیک ها توسط تست حساسیت آنتی بیوتیکی انتشار دیسک در آگار Kirby-Bauer بررسی شدند. آنتی بیوتیک ها از خانواده های مختلف بر اساس جدول CLSI، از شرکت پادتن طب خریداری شد (Weinstein and Lewis, 2020). از آنجا که پمپ افلاکس AdeABC در ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام ها، کلرامفنیکل، فلوروکینولون ها، تیجی سایکلین و تری متوپریم ها نقش دارد، لذا دیسک های انتخابی برای بررسی سویه های دارای مقاومت چنگانه شامل آمیکاسین ۳۰ میکروگرم، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم، سفازولین ۳۰ میکروگرم، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم، سفپییم ۳۰ میکروگرم، ایمی پنم ۱۰ میکروگرم، مروپنم ۵ میکروگرم، مینوسایکلین ۱۰ میکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، کوتریموکسازول ۲۵ میکروگرم، کلاریترومایسین ۱۵ میکروگرم بودند.

اکسید روی را علیه ایزوله های بالینی باسیلوس سوبتیلیس، اشیریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی و استافیلوکوکوس اورئوس را مطالعه کردند (Venkataraju et al., 2014). همچنین Gunalan و همکاران، ۲۰۱۲ نشان دادند که اکسید روی سنتز شده سبز اثر بازدارندگی قوی تری نسبت به نانوذرات سنتز شده شیمیایی دارد (Gunalan et al., 2012). از جمله مهم ترین باکتری هایی که امروزه نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند و به عنوان یک معضل جدی و جهانی در بروز عفونت های بیمارستانی و مرگ و میر، بخصوص در بخش های ICU مطرح است، گونه های پاتوژن آسیتوباکتر است. لذا منجر به استفاده که از طیف گسترده ای از آنتی بیوتیک ها به ویژه کارباپنمها و سفالوسپورینهای نسل سوم شده است (Lin et al., 2017). در نتیجه باعث ظهور سویه های دارای مقاومت دارویی چنگانه (MDR) شده و باعث محدودیت گزینه های درمانی در سراسر جهان شده است (Khosrishihi and Sharifi, 2007). AdeABC یکی از مهم ترین سیستم های افلاکس متعلق به خانواده Resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) آسیتوباکتر است که نقش عمده ای در مقاومت به دسته وسیعی از آنتی بیوتیک ها را بر عهده دارد. ژن های آن کروموزومی بوده و سه ژن AdeA، AdeB و AdeC را کد می کنند و در مجاورت هم یک اپرون را تشکیل می دهند. همچنین بیان AdeABC توسط یک سیستم دوجزئی مشتمل بر یک تنظیم کننده پاسخ (Response regulator, AdeR) و یک کیناز حسگر (Sensor kinase, AdeS) انجام می شود (Senapati et al., 2012, Khosrishihi and Sharifi, 2007). طی پژوهش Modarresi.F و همکاران، اثر نانوذره اکسید آهن بر بیان ژن های افلاکس پمپ AdeABC به صورت کاهش بیان گزارش شد (Modarresi et al., 2015). همچنین در مطالعه مشابهی اثر مهاری نانوذره نقره بر بیان ژن های افلاکس پمپ AdeABC در آسیتوباکتر مشاهده شد (Behdad et al., 2020). با توجه به اینکه این پژوهش اولین گزارش اثر آنتی باکتریال نانوذره اکسید روی بر بیان ژن های افلاکس پمپ AdeA AdeC) سویه های بالینی آسیتوباکتریومانی است، لذا ترغیب شدیم که خواص آنتی باکتریال نانوذره اکسید روی بیوستز شده توسط باسیلوس سوبتیلیس (Saleh et al., 2021) را

آماده سازی محلول نانوذره:

از پودر نانوذره اکسید روی بیوستتز شده توسط باکتری باسیلوس سوبتیلیس با قطر میانگین ۲۵ تا ۵۰ نانومتر استفاده شد (Saleh et al., 2021). ابتدا استوکی با مقدار ۰/۰۰۳ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره اکسید روی سنتز شده به روش زیستی همراه با محیط کشت استریل مولر هینتون برات و Dimethyl sulfoxide (DMSO) ۱۰ درصد تهیه شد.

بررسی خواص آنتی باکتریال نانوذره به روش فوتوبیو میکرو دیالوشن برات:

Minimum inhibitory concentration (MIC)، با استفاده از روش میکرو دیالوشن برات در پلیت ۹۶ خانه استریل انجام شد. ابتدا استوکی با مقدار ۰/۰۰۳ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره سنتز شده همراه با محیط کشت استریل مولر هینتون برات حاوی DMSO ۱۰ درصد تهیه شد. سپس به ردیف های سوم تا دوازدهم ۵۰ میکرو لیتر از محیط کشت استریل اضافه شد. از استوک ساخته شده ۱۰۰ میکرو لیتر به ردیف های یک و دو اضافه و عمل رقیق سازی از ردیف دوم تا دهم انجام شد. در نهایت از کشت ۲۴ ساعته آسیتوباکتریومانی به میزان ۵۰ میکرو لیتر معادل کدورت نیم مک فارلند $10^8 \times 1/5$ CFU/ml به ردیف های دو تا ۱۰ اضافه شد. پلیت ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۰ درصد قرار داده شدند. سپس از نمک ۲ و ۳ و ۵-تری فنیل تترازولیوم کلرید به منظور شاخص بصری برای رشد باکتری ها استفاده شد. چاهک های فاقد رنگ به عنوان MIC گزارش شد. از حلال DMSO یک درصد به عنوان کنترل منفی و برای کنترل مثبت از آنتی بیوتیک های ونکومايسين و جتتاميسين استفاده شد. هر یک از آزمون های مذکور سه بار تکرار شدند (Wayne, 2002).

بررسی اثر نانوذره بر بیان ژن های (*AdeA*, *AdeC*)

آسیتوباکتریومانی:

برای بررسی بیان ژن افلاکس پمپ *AdeA* و *AdeC* از روش Real time-PCR استفاده شد. با کیت استخراج RNA (شرکت GeneAll کره) فرایند استخراج RNA برای هر دودسته نمونه باکتریایی آسیتوباکتر قبل و بعد از اثر نانوذره به صورت هم زمان

و در شرایط یکسان انجام شد. سپس کیفیت RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد مورد سنجش قرار گرفت. همچنین غلظت RNA استخراج شده به وسیله دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. ساخت cDNA از روی RNA های استخراج شده مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA دارای آنزیم Script Reverse Transcriptase (شرکت آنا سل تهران) ساخته شد. Real time-PCR به وسیله مستر میکس حاوی سایبر گرین شرکت SMOBIO Technology ساخت تایوان) انجام شد. واکنش Real time-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱ میکرو لیتر cDNA، از آغازگرهای رفت و برگشتی برای ژن *AdeA* (۰/۸، ۱)، برای ژن *AdeC* (۱، ۱) میکرو لیتر، ۱۲ میکرو لیتر مستر میکس و مابقی حجم آب مقطر سترون بود. از ژن *gyrA* به عنوان Housekeeping gene در واکنش Real time-PCR استفاده شد. چرخه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه، و به دنبال آن ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، دمای آنیلینگ که برای هر ژن در جدول ۱ ذکر شده و ۲۰ ثانیه، اکستنشن ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، هولد پایانی ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب (Melting Curve) ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه بود. واکنش Real time-PCR به وسیله دستگاه CORBET(5 Plex HRM, manufactured by Australia) موجود در دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شد. در نهایت نتایج بیان ژن های *AdeB* و *AdeC* بعد از Real Time PCR به وسیله فرمول مرجع نسبی بیان ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) برای تعیین بیان ژن مورد نظر استفاده شد. سپس آزمون آماری ANOVA way One-Tukey به وسیله نرم افزار آماری (SPSS 22.0) برای مقایسه تفاوت معنی دار مقادیر به دست آمده از بیان ژن های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر کمتر مساوی $p \leq 0/05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد و به صورت نمودار شرح داده شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن ها در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در واکنش RT-PCR

Table 1. Sequence of primers used in RT-PCR

منبع	دمای ذوب (C°)	محصول (bp)	توالی آغازگر (۵'-۳')	ژن هدف
(Lin et al., 2009)	۵۶	۵۱۳	F 5'-ATCTTCCTGCACGTGTACAT-3' R 5'-GGCGTTCATACTCACTAACC-3'	<i>AdeA</i>
(Lopes, 2012)	۵۳/۵	۵۶۰	'F 5'-AGCCTGCAATTACATCTCAT-3' 'R 5'-TGGCACTTCACTATCAATAC-3'	<i>AdeC</i>

نتایج و بحث

جدول ۲- بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره اکسید روی بر سویه‌های

آسیتوباکتریومانی

Table 2. Assessment of minimum inhibitory concentration of ZnO NPs against *Acinetobacter baumannii* species

<i>Acinetobacter baumannii</i>	MIC (µg/ml)
۱	>۱۰۰۰
۲	>۱۰۰۰
۳	۳۱,۲
۴	۱۲۵
۵	۶۲,۵
۶	۲۵۰
۷	>۱۰۰۰
۸	>۱۰۰۰
۹	۵۰۰
۱۰	>۱۰۰۰

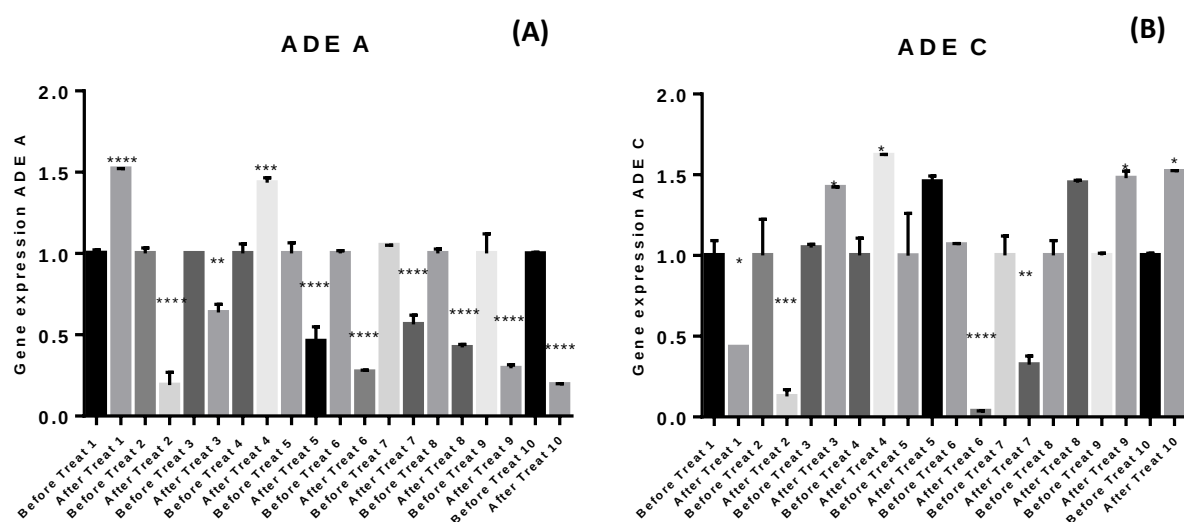
بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذره به روش MIC:

بعد از انجام تست‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت سویه‌های *آسیتوباکتریومانی* نتایج تست‌ها به زیر صورت گزارش شد. سویه‌ها دارای قدرت تولید اسید از قندهای گلوکز، گزیزوز، گالاکتوز، مانوز، رامنوز و لاکتوز بودند. تولید اسید از مالتوز و تست اوره آز در سویه‌ها متغیر بود. واکنش سیمون سترات در همه سویه‌ها مثبت بود. واکنش منفی در تست‌های تولید اسید از مانتیول، ساکارز، تولید گاز سولفید هیدروژن در محیط کشت TSI، احیای نترات، بایل اسکولین، متیل رد و VP گزارش گردید. با انجام تست آنتی‌بیوگرام مشخص شد که *آسیتوباکترها* از نظر مقاومت به دسته‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مقاوم بودند و ۱۰۰ درصد سویه‌ها MDR بودند. یافته‌های حاصل از تست MIC در برابر نانوذره اکسید روی پس از سه بار تکرار برای هر سویه *آسیتوباکتریومانی* متفاوت بود که همگی در جدول ۲ شرح داده شد.

بررسی بیان ژن‌های *AdeC* و *AdeB*

فرمول مرجع بیان نسبی ژن ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) برای تعیین بیان ژن‌ها استفاده شد. آزمون آماری ANOVA way One-Tukey به‌وسیله نرم‌افزار آماری (SPSS 22.0) برای مقایسه تفاوت معنی‌دار مقادیر به‌دست‌آمده از بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر کمتر مساوی $p\text{-value} \leq 0/05$ ، به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته و به صورت نمودار شرح داده شد. نتایج آزمون PCR ژن *gyrA* به‌عنوان Housekeeping gene جهت تأیید ۱۰ سویه *آسیتوباکتریومانی* نشان داد که این ژن در تمامی ایزوله‌ها وجود دارد.

مطابق با شکل شماره ۱ (A) در ژن *AdeA*، ۸۰ درصد نمونه‌ها بعد از اعمال اثر نانوذره اکسید روی کاهش بیان را نشان دادند. ۲۰ درصد نمونه‌ها نیز بیان افزایشی داشتند. همچنین مطابق با شکل شماره ۱ (B)، در ژن *AdeC*، ۴۰ درصد نمونه‌ها بعد از اعمال اثر نانوذره اکسید روی کاهش بیان را نشان دادند. ۶۰ درصد نمونه‌ها نیز بیان افزایشی داشتند. به استناد مقالات پیشین در صورتی که موتاسیون در ژن‌های تنظیم‌کننده *AdeRS* رخ دهد باعث افزایش بیش از حد این ژن و در نهایت افزایش بیش از حد ژن‌های *AdeABC* می‌شود که بیانگر یک ارتباط مستقیم از نظر بیان ژن‌ها است. به طور احتمال دلیل این موضوع ایجاد جهش در ژن‌های *AdeS* و *AdeR* این سویه‌ها است که مجال بررسی جهش در این ژن‌ها در این پژوهش فراهم نشد.



شکل شماره ۱- (A): بررسی بیان ژن *AdeA* (B): بررسی بیان ژن *AdeC*
Fig 1: (A) Assessment of *AdeA* gene expression, (B) Assessment of *AdeC* gene expression

AdeS, *AdeR* کنترل می‌شود، تحریک دومین حسگر *AdeS* منجر به اتوفسفیریلایسیون وابسته به ATP در هیستیدین کیناز و باعث انتقال اطلاعات به وسیله انتقال فسفریل به یک ریشه‌ی آسپاراتات از *AdeR* می‌شود و درواقع باعث انتقال اطلاعات به *AdeR* می‌شود. *AdeR* تنظیم‌کننده فسریله شده با اتصال به پیش‌بر بیان *AdeABC* بیان را کنترل می‌کند. لذا به نظر می‌رسد ارتباط افزایش بیان *AdeR* فسفریله بایان ژن‌های *AdeABC* عکس است (Chang et al., 2016). تنظیم به وسیله تحریک دومین حسگر *AdeS* منجر به یک اتوفسفیریلایسیون وابسته به ATP و درنهایت *AdeR* فسفریله شده بیان اپرون را به شکل معکوس با اتصال به ناحیه پیش‌بر کنترل می‌کند. هرچند سیگنال القاکننده‌ی اتوفسفیریلایسیون *AdeS* هنوز ناشناخته است و توانایی و محل *AdeR* برای اتصال به پیش‌بر اپرون مستند نشده است (Chang et al., 2016). با توجه به اینکه بسیاری از جنبه‌های تأثیرات این ژن‌ها بر بیان اپرون *AdeABC* هنوز به خوبی و کامل شناسایی نشده است لذا به بررسی‌های دقیق‌تر و پژوهش بیشتری در این زمینه نیاز است. مطابق با نتایج این پژوهش پس از اعمال اثر نانوذره اکسید روی، در ژن *AdeA* ۸۰ درصد نمونه‌ها بعد از اعمال اثر نانوذره اکسید روی کاهش بیان و ۲۰ درصد نمونه‌ها نیز افزایش بیان داشتند. همچنین مطابق با نمودار شماره (ب)، در ژن *AdeC* ۴۰ درصد

در این مطالعه از نانوذرات اکسید روی بیو سنتتیک با قطر میانگین ۲۵-۵۰ نانومتر استفاده شد (Saleh et al., 2021). نتایج خاصیت ضد میکروبی مطالعه حاضر نیز نشان داد، نانوذره اکسید روی دارای خواص ضد میکروبی به نسبت خوبی بود. بر اساس پژوهش‌های پیشین نانوذرات به غشای باکتری متصل شده و همچنین به داخل سلول باکتری نفوذ می‌کنند. غشای باکتری دارای پروتئین‌های حاوی گروه سولفور است و نانوذرات نقره نه تنها با این پروتئین‌ها، بلکه با ترکیبات حاوی فسفر از جمله DNA، واکنش می‌دهند. نانوذرات همچنین به زنجیره تنفسی که در تقسیم سلولی مؤثر است حمله می‌کنند و منجر به مرگ سلولی می‌شوند (Shahzadi et al., 2018). در این مطالعه اثرهای آنتی باکتریال نانوذره اکسید روی در مرحله اول به صورت MIC انجام گرفت. مطابق با جدول شماره ۲، حداقل غلظت بازدارندگی در ۴ مورد از سویه‌ها (۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$) گزارش شد که نشان‌دهنده خاصیت مهارکنندگی رشد مطلوب نانوذره اکسید روی بود. در باقی سویه‌ها مهارکنندگی نانوذره به صورت 500 و 1000 $\mu\text{g/ml}$ گزارش شد که نشان‌دهنده مقاومت سویه‌ها به این غلظت از نانوذره بود و فرضیه احتمال بروز تغییرات ژنتیکی در ژن‌های تنظیم‌کننده را مطرح می‌سازد. با توجه به اینکه بیان ژن‌های افلاکس پمپ *AdeABC* توسط ژن‌های

نمونه‌ها بعد از اعمال اثر نانوذره اکسید روی کاهش بیان و ۶۰ درصد نمونه‌ها نیز افزایش بیان داشتند. نتایج کاهش MIC در این سویه‌ها به‌طور کامل منطبق با نتایج کاهش بیان ژن پس از اعمال اثر نانوذره در این سویه‌ها بود و طبق انتظار با کاهش میزان MIC با کاهش بیان ژن *AdeA* و *AdeC* روبرو شدیم. با عطف به این موضوع که بروز موتاسیون به ویژه از نوع جانشینی در *AdeRS* باعث افزایش بیش‌ازحد ژن‌های *AdeABC* می‌شود (Peleg et al., 2007)، لذا با توجه به مطالعات پیشین که در سال ۲۰۲۰، Madhi.M و همکارانش اثر نانوذره نقره و کیتوزان را بر بیان ژن‌های *AdeB* در *آسیتوباکتریومانی* بررسی کردند نتایج را به‌صورت کاهش بیان این ژن گزارش کردند که این موضوع با توجه به تحقیقات گذشته نشان‌دهنده اثر مهاري نانوذرات فلزی بر بیان این ژن‌ها است و با نتایج این پژوهش نیز منطبق بود (Madhi et al., 2020). بررسی دیگری که توسط Behdad.R انجام شد، اثر مهارکنندگی نانوذره نیترا نقره بر کاهش بیان ژن‌های افلاکس *AdeABC* انجام شد و قابل انطباق با نتایج این مطالعه است (Behdad et al., 2020). در پژوهشی که توسط Hornesy و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد یک موتاسیون جانشینی در ژن تنظیم‌کننده *AdeS* *آسیتوباکتر* مقاوم به تیجی سایکلین یافت شد که باعث افزایش بیش‌ازحد ژن‌های *AdeABC* شد (Hornsey et al., 2010). در مطالعه‌ای که توسط AR. Atasoy در سال ۲۰۱۶ بر روی *آسیتوباکترهای* مقاوم به آمینوگلیکوزیدها انجام شد مشخص شد ارتباط معنی‌داری در مقاومت این سویه و موتاسیون در ژن‌های تنظیم‌کننده *AdeRS* و بالطبع افزایش بیان در ژن‌های *AdeABC* وجود دارد (Atasoy et al., 2016). بررسی‌های پیشین تأییدکننده نتایج این پژوهش است که البته این نکته قابل‌ذکر است که برای توجیه این مطلب نمی‌توان تنها به بیان ژن اکتفا کرد و به بررسی‌های بیشتری نظیر RFLP برای یافتن ژن‌های جهش یافته یا تجزیه و تحلیل‌های دیگر جهت بررسی تغییرات در توالی DNA نیاز است. بااین‌حال، تجزیه و تحلیل بیش‌تر ژن‌های افلاکس پمپ در سطح پروتئین به بررسی این کاهش مشاهده‌شده در بیان و تنظیم ژن‌ها کمک می‌کند. همچنین فقط یک گزارش در مورد اثرهای تعدیل‌کننده نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های *AdeABC* در سویه‌های *آسیتوباکتر* MDR موجود است (Behdad et al.,

2020). این نتایج بیانگر این موضوع است که سنتز سبز نانوذرات بخصوص اکسید روی علاوه بر اینکه یک فرایند سازگار با محیط‌زیست است می‌تواند با بهره‌گیری از دانش روز در آینده جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شود و به‌عنوان راه‌حلی برای حل معضل جهانی مقاومت باکتری‌هایی روزافزون از قبیل *آسیتوباکتر* به دسته‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی شود. از طرفی با توجه به نتایج افزایش بیان ژن *AdeC* در ۶۰ درصد نمونه‌ها و با عطف به این موضوع که اطلاعات درباره بیان این ژن‌ها و ارتباط آن‌ها با یکدیگر هنوز ناکافی و مبهم است، توصیه می‌شود مطالعاتی در سطح وسیع‌تری نسبت به این ژن‌ها در سطح موتاسیون از قبیل جانشینی، حذف شدن، درج شدن و مضاعف شدگی انجام شود. با توجه به افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک، جهان نیاز مبرمی به تغییر الگوی مصرف و تجویز منابع جدیدتر باارزش دارویی مفیدتر دارد. در صورتی‌که مصرف دارو با همین الگو باقی بماند، حتی تولید و توسعه داروهای جدید نیز نمی‌تواند مانع از افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک شود. با توجه به اینکه این مطالعه اولین گزارش بررسی اثر نانوذرات اکسید روی بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ سویه‌های *آسیتوباکتر* است، لذا هدف از پژوهش بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوذره اکسید روی بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ *AdeABC* به روش فنوتیپی و ژنوتیپی در *آسیتوباکتر* بود که نقش بالقوه‌ای در مقاومت آن‌ها داشت و سعی بر آن شد گامی نو در راه پیشرفت در استراتژی‌های جایگزین درمانی باکتری‌ها برداریم، تا شاید در آینده استفاده از مهارکننده‌های مناسب سبب اختلال در عملکرد این پمپ‌ها برای کنترل مقاومت چند دارویی شود.

نتیجه‌گیری کلی:

باتوجه به نتایج حاصل از اثر نانوذره اکسید روی بیوسنتز شده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ *AdeABC* و محاسبات صورت‌گرفته به‌وسیله MIC و آزمون تجزیه و تحلیل آمار *ANOVA way One-Tukey* مشخص شد که در ۸۰ درصد از نمونه‌های *آسیتوباکتریومانی* بیان ژن‌های *AdeA* و در ۴۰ درصد از نمونه‌ها ژن‌های *AdeC* به‌وسیله نانوذره اکسید روی مهار شد؛ بنابراین می‌توان آن‌ها را به‌عنوان عوامل ضد میکروبی جدید محسوب کرد و در آینده از آن‌ها در صنایع

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از ریاست و کارکنان محترم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تقدیر و تشکر کنند.

علوم پزشکی بهره برد. همچنین باتوجه به نتایج افزایش بیان ژن ۶۰ درصد از نمونه‌ها در ژن *AdeC* احتمال بروز جهش در ژن‌های تنظیم‌کننده *AdeRS*، بررسی سایر عوامل مرتبط با ایجاد ژنوتیپ مقاومت چند دارویی ازجمله ژن‌های تنظیم‌کننده *AdeRS* و سازوکارهای تکامل و ارتباط آن‌ها نباید نادیده گرفته شود.

منابع

- Amjady F, Golestani Imani B and Karimi F. 2016.** An investigation of the effect of copper nanoparticles on *E. coli* genome by RAPD molecular markers. *Cellular and Molecular Researches Iranian Journal of Biology* 28(4):475-487.
- Behdad R, Pargol M, Mirzaie A, Karizi SZ, Noorbazargan H and Akbarzadeh I. 2020.** Efflux pump inhibitory activity of biologically synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Basic Microbiology* 60(6): 494-507.
- Bouvet PJ and Grimont PA. 1986.** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 36(2): 228-240.
- Chang TY, Huang BJ, Sun JR, Perng CL, Chan MC, Yu CP and Chiueh TS. 2016.** AdeR protein regulates adeABC expression by binding to a direct-repeat motif in the intercistronic spacer. *Microbiological Research* 183: 60-67.
- Chokriwal A, Sharma M.M and Singh A. 2014.** Biological synthesis of nanoparticles using bacteria and their applications. *American Journal of PharmTech Research* 4(6): 38-61.
- Constantiniu S, Romaniuc A, Iancu LS, Filimon R and Taraşi I. 2004.** Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. strains isolated from hospital units. *The Journal of Preventive Medicine* 12(3-4): 35-42.
- El Enshasy HA, El Marzugi NA, Elsayed EA, Ling OM, Abd Malek R, Kepli AN, Othman NZ and Ramli S. 2018.** Medical and cosmetic applications of fungal nanotechnology: production, characterization, and bioactivity. In *Fungal nanobionics: Principles and Applications*, Springer, Singapore, 21-59.
- Esmailzadeh H, Sangpour P, Khaksar R and Shahraz F. 2014.** The Effect of ZnO Nanoparticles on the Growth of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Technology and Nutrition* 11(3): 21-28.
- Fakhroueian Z, Katouzian F, Esmailzadeh P, Bidhendi SM and Esmailzadeh P. 2019.** Enhanced engineered ZnO nanostructures and their antibacterial activity against urinary, gastrointestinal, respiratory and dermal genital infections. *Applied Nanoscience* 9(8): 1759-1773.
- Goudarzi H, Doraghi M, Dabiri H and Ghalavand Z. 2013.** Functional analysis of multidrug efflux pumps genes of *Acinetobacter baumannii* strains. *Research in Medicine* 37(2): 107-112.
- Gunalan S, Sivaraj R and Rajendran V. 2012.** Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science: Materials International* 22(6): 693-700.
- Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Thomas CP, Gordon NC, Wareham DW, Quinn J, Lolans K, Livermore DM and Woodford N. 2010.** AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(8): 1589-1593.
- Khosrou SN and Sharifi M. 2007.** Isolation of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) strains from patients and equipments of Intensive care units (ICUs) at Qazvin between 2005-2006. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 1(3): 33-38.
- Lin L, Ling BD and Li XZ. 2009.** Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeIJK, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(1): 27-32.
- Lin MF, Lin YY, Tu CC and Lan CY. 2017.** Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 50(2): 224-231.

- Lopes BS. 2012.** Role of Insertion Sequences in the control of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. Reseach final Report. The university of Edinburgh. Scotland. 1-250.
- Madhi M, Hasani A, Shahbazi Mojarrad J, Ahangarzadeh Rezaee M, Zarrini G, Davaran S, Alizadeh E and Sheikhalizadeh V. 2020.** Impact of chitosan and silver nanoparticles laden with antibiotics on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Archives of Clinical Infectious Diseases 15(4): e10095.
- Modarresi F, Azizi O, Shakibaie MR, Motamedifar M, Valibeigi B and Mansouri S. 2015.** Effect of iron on expression of efflux pump (adeABC) and quorum sensing (luxI, luxR) genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Apmis 123(11): 959-968.
- Narayanan KB and Sakthivel N. 2010.** Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Advances in Colloid and Interface Science 156(1-2): 1-13.
- Peleg AY, Adams J and Paterson DL. 2007.** Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51(6): 2065-2069.
- Saleh, F, Kheirandish F, Hosseini F and Yazdian F. 2021.** Evaluation the effect of ZnO nanoparticle derived *Bacillus subtilis* on the expression of efflux pump genes (AdeB AdeRS) in *Acinetobacter baumannii*. Journal of Environmental Health Science and Engineering 19(1133-1141): 1-9.
- Senapati S, Syed A, Moez S, Kumar A and Ahmad A. 2012.** Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*. Materials Letters 79: 116-118.
- Shahzadi S, Zafar N and Sharif R. 2018.** Antibacterial activity of metallic nanoparticles. Bacterial pathogenesis and antibacterial control, London, United kingdom, Chapter 3: 1-23.
- Siddiqi KS, ur Rahman A and Husen A. 2018.** Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes. Nanoscale Research Letters 13(1): 1-13.
- Venkataraju JL, Sharath R, Chandraprabha MN, Neelufar E, Hazra A and Patra M. 2014.** Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles. Journal of Biochemical Technology 3(5): 151-154.
- Wayne PA. 2002.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI document M27-A2, Clinical and Laboratory Standard Institute, Pennsylvania, USA, 1-13
- Weinstein MP and Lewis JS. 2020.** The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. Journal of clinical microbiology 58(3): e01864-19.
- Zarei M, Jamnejad A and Khajehali E. 2014.** Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. Jundishapur Journal of microbiology 7(1): e8720.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1
2021

Evaluation of the Inhibitory Effect of Biosynthetic Zinc Oxide Nanoparticles on the Expression of Efflux Pumps Genes (*AdeA*, *AdeC*) in Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*

Fatemeh Saleh¹, Farzaneh Hosseini^{*1}, Farnaz Kheirandish², Fatemeh Yazdian³

1-Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

2-Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

3-Faculty of New sciences and Technologies University of Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: Farzaneh953@yahoo.com

Abstract

Introducing an effective antibacterial agent is very important in controlling pathogenic and antibiotic-resistant bacterial strains. Recent advances in nanotechnology, especially the ability to fabricate biological nanoparticles, have led to the development of a wide range of antimicrobial agents. Therefore, the aim of this study is to investigate the antibacterial properties of ZnO nanoparticles (NPs) in inhibiting resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Ten samples of *Acinetobacter* were collected from clinical centers of Khorramabad city in 2020 and were identified based on biochemical tests. After treatment of MDR strains with sub-minimum inhibitory concentration (MIC) of ZnO NPs, the expression level of efflux pump genes (*AdeA*, *AdeC*) was evaluated using real-time PCR. After applying the effect of ZnO NPs on *AdeA* gene, 80% of the samples showed reduced expression. 20% of the sample also had incremental expression. Also in *AdeC* gene, 40% of the samples showed reduced expression after the effect of ZnO NPs. 60% of the samples also had incremental expression. According to the results, the optimal inhibitory effect of biosynthesized ZnO NPs on the expression of *AdeA* and *AdC* genes, which play an important role in drug resistance of the *Acinetobacter* species, was evident. On the other hand, due to the increased expression in 60% of the samples for the *AdeC* gene, the possibility of mutations in the regulatory genes was raised. It seems that ZnO NPs can be used as a pharmaceutical candidate in the pharmaceutical industry in the future.

Key words: Efflux pumps, Multiple drug resistance, Nanoparticle, Zinc Oxide