مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار وتابستان ۱۴۰۰
صفحه ۱۰-۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4

DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

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 Saleh[1], Farzaneh Hosseini[*1], Farnaz Kheirandish[2], Fatemeh Yazdian[3]

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

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 ضدمیکروبی 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 *آسینتوباکتر* 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 مهاری 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 *آسینتوباکتر* دارند مشهود بود. از طرفی باتوجه‌به 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.

واژه‌های کلیدی

افلاکس پمپ،
اکسید روی،
مقاومت دارویی چندگانه،
نانوذرات

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

مقدمه

به‌موازات توسعه سریع زندگی بشری، کنترل اثرهای مضر میکروب‌ها امری غیرقابل‌اجتناب 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 پیداکرده‌اند و به‌این‌ترتیب کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش‌یافته است (Goudarzi et al., 2013). پیشرفت‌های گذشته درزمینه‌ی نانوتکنولوژی به‌ویژه توانایی ساخت نانوذرات در شکل‌ها و سایزهای مختلف منجر به ایجاد دسته وسیعی از عوامل ضدمیکروبی 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 ازنظر 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 رادارند. 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 درنتیجه 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). مشخص‌شده 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 واکنش آنتی‌باکتریال 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 مورداستفاده قرارگرفته‌اند (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 تیولSH 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 قابل‌توجه اکسید روی علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها گزارش داده‌شده است. Lakshmi و همکارانش فعالیت ضد باکتریایی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

اکسید روی را علیه ایزوله‌های بالینی *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا 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 قوی‌تری نسبت به نانوذرات سنتز شده شیمیایی دارد (Gunalan et al., 2012). ازجمله مهم‌ترین باکتری‌هایی که امروزه نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند و به‌عنوان یک معضل جدی و جهانی در بروز عفونت‌های بیمارستانی و مرگ‌ومیر، بخصوص در بخش‌های ICU مطرح است، گونه‌های پاتوژن *آسینتوباکتر* است. لذا منجر به استفاده که از طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه کارباپنمها و سفالوسپورینهای نسل سوم شده است (Lin et al., 2017). درنتیجه باعث ظهور سویه‌های دارای مقاومت دارویی چندگانه (MDR) شده و باعث محدودیت گزینه‌های درمانی در سراسر جهان شده است (Khosrishahi and Sharifi, 2007).

*AdeABC*یکی از مهم‌ترین سیستم‌های افلاکس متعلق به خانواده Resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) در *آسینتوباکتر* است که نقش عمده‌ای در مقاومت به دسته وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها را بر عهده دارد. ژن‌های آن کروموزومی بوده و سه ژن *AdeB* ، *AdeA* و *AdeC* را کد می‌کنند و در مجاورت هم یک اپرون را تشکیل می‌دهند. همچنین بیان *AdeABC* توسط یک سیستم دوجزئی مشتمل بر یک تنظیم‌کننده پاسخ (Response regulator, *AdeR*) و یک کیناز حسگر (Sensor kinase, *AdeS*) انجام می‌شود (Senapati et al., 2012, Khosrishahi and Sharifi, 2007). طی پژوهش Modarresi.F و همکاران، اثر نانوذره اکسید آهن بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ *AdeABC* به‌صورت کاهش بیان گزارش شد (Modarresi et al., 2015). همچنین در مطالعه مشابهی اثر مهاری نانوذره نقره بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ *AdeABC* در *آسینتوباکتر* مشاهده شد (Behdad et al., 2020). با توجه به اینکه این پژوهش اولین گزارش اثر آنتی‌باکتریال نانوذره اکسید روی بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ (*AdeA AdeC*) سویه‌های بالینی *آسینتوباکتربومانی* است، لذا ترغیب شدیم که خواص آنتی‌باکتریال نانوذره اکسید روی بیوسنتز شده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* (Saleh et al., 2021)، را به‌صورت فنوتیپی بررسی کرده و سپس بیان ژن های افلاکس پمپ *AdeABC* را با روش Real Time- PCR ارزیابی نماییم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و بررسی تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

از مجموع ۱۰۰ نمونه باکتریایی مختلف تعداد ۱۰ نمونه *آسینتوباکتر* از مراکز بالینی شهرستان خرم‌آباد در بازه زمانی ٦ ماه اول سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. باکتری‌ها از نمونه‌های مختلف بالینی مانند زخم، خون، خلط، ادرار و غیره جداسازی شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه تمامی نمونه‌های باکتریایی به‌وسیله آزمون‌های تشخیصی و بیوشیمیایی شناسایی و تعیین هویت شدند. تست‌های 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. تست‌های احیای نیترات و متیل رد و Voges–Proskauer (VP) نیز انجام شد(Bouvet and Grimont, 1986, Constantiniu et al., 2004). سپس ازنظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها توسط تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی انتشار دیسک در آگار Kirby-Bauer بررسی شدند. آنتی‌بیوتیک‌ها از خانواده‌های مختلف بر اساس جدول CLSI، از شرکت پادتن طب خریداری شد (Weinstein and Lewis, 2020). ازآنجا 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 چندگانه شامل آمیکاسین ۳۰ میکرگرم، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم، سفازولین ۳۰ میکروگرم، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم، سفیپیم ۳۰ میکروگرم، ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم، مروپنم ۵ میکروگرم، مینوسایکلین ۱۰ میکروگرم، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم، کوتریموکسازول ۲۵ میکروگرم، کلاریترومایسین ۱۵میکروگرم بودند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

آماده‌سازی محلول نانوذره:

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

بررسی خواص آنتی‌باکتریال نانوذره به روش فنوتیپی میکرودایلوشن براث:

Minimum inhibitory concentration (MIC)، با استفاده از روش میکرودایلوشن براث در پلیت ۹۶ خانه استریل انجام شد. ابتدا استوکی با مقدار ۰/۰۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره سنتز شده همراه با محیط کشت استریل مولرهینتون‌براث حاوی DMSO ۱۰ درصد تهیه شد. سپس به ردیف‌های سوم تا دوازدهم ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت استریل اضافه شد. از استوک ساخته‌شده ۱۰۰ میکرولیتر به ردیف‌های یک و دو اضافه و عمل رقیق‌سازی از ردیف دوم تا دهم انجام شد. درنهایت از کشت ۲۴ ساعته *آسینتوباکتربومانی* به میزان ۵۰ میکرولیتر معادل کدورت نیم مک فارلند $1/5\times10^8$ CFU/ml به ردیف‌های دو تا ۱۰ اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰ درصد قرار داده شدند. سپس از نمک ۲ و ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلرید به‌منظور شاخص بصری برای رشد باکتری‌ها استفاده شد. چاهک‌های فاقد رنگ به‌عنوان MIC گزارش شد. از حلال DMSO یک درصد به‌عنوان کنترل منفی و برای کنترل مثبت از آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و جنتامایسین استفاده شد. هر یک از آزمون‌های مذکور سه بار تکرار شدند (Wayne, 2002).

بررسی اثر نانوذره بر بیان ژن‌های *(AdeA, AdeC)* *آسینتوباکتربومانی*:

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 *آسینتوباکتر* قبل و بعد از اثر نانوذره به صورت هم‌زمان و در شرایط یکسان انجام شد. سپس کیفیت RNA استخراج‌شده در ژل آگارز ۱ درصد مورد سنجش قرار گرفت. همچنین غلظت RNA استخراج‌شده به‌وسیله دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. ساخت cDNA از رویRNA های استخراج‌شده مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA دارای آنزیم Script Reverse Transcriptase (شرکت آنا سل تهران) ساخته شد. Real time-PCR به‌وسیله مستر میکس حاوی سایبر گرین شرکت (SMOBIO Technology ساخت تایوان) انجام شد. واکنش Real time-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر cDNA، از آغازگرهای رفت و برگشتی برای ژن *AdeA* (۰/۸، ۱)، برای ژن *AdeC* (۱، ۱) میکرولیتر، ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس و مابقی حجم آب مقطر سترون بود. از ژن *gyrA* به‌عنوان Housekeeping gene در واکنش Real time-PCR استفاده شد. چرخه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه، و به دنبال آن ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، دمای آنلینگ که برای هر ژن در جدول ۱ ذکرشده و ۲۰ ثانیه، اکستنشن ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، هولد پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب (Melting Curve) ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه بود. واکنش Real time-PCR به‌وسیله دستگاه CORBET(5 Plex HRM, manufactured by Australia) موجود در دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شد. در نهایت نتایج بیان ژن‌های *AdeB* و *AdeC* بعد از Real Time PCR به‌وسیله فرمول مرجع نسبی بیان ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) برای تعیین بیان ژن موردنظر استفاده شد. سپس آزمون آماری ANOVA way One-Tukey به‌وسیله نرم‌افزار آماری (SPSS 22.0) برای مقایسه تفاوت معنی‌دار مقادیر به‌دست‌آمده از بیان ژن‌های موردنظر مورداستفاده قرار گرفت. مقادیر کمتر مساوی ۰/۰۵≥ p-valu، به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد و به صورت نمودار شرح داده شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌ها در جدول ۱ ذکرشده است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده‌شده در واکنش RT-PCR

Table 1. Sequence of primers used in RT-PCR

ژن هدف	توالی آغازگر (٣'-٥')	محصول (bp)	دمای ذوب (C°)	منبع
AdeA	F 5'-ATCTTCCTGCACGTGTACAT-3' R 5'-GGCGTTCATACTCACTAACC-3'	٥١٣	٥٦	(Lin et al., 2009)
AdeC	'F 5'-AGCCTGCAATTACATCTCAT-3' 'R 5'-TGGCACTTCACTATCAATAC-3'	٥٦٠	٥٣/٥	(Lopes, 2012)

نتایج و بحث

بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذره به روش MIC:

بعد از انجام تست‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* نتایج تست‌ها به زیر صورت گزارش شد. سویه‌ها دارای قدرت تولید اسید از قندهای گلوکز، گزیلوز، گالاکتوز، مانوز، رامنوز و لاکتوز بودند. تولید اسید از مالتوز و تست اوره آز در سویه‌ها متغیر بود. واکنش سیمون سیترات در همه‌سویه‌ها مثبت بود. واکنش منفی در تست‌های تولید اسید از مانتیول، ساکارز، تولید گاز سولفید هیدروژن در محیط کشت TSI، احیای نیترات، بایل اسکولین، متیل رد و VP گزارش گردید. با انجام تست آنتی‌بیوگرام مشخص شد که *آسینتوباکترها* ازنظر 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 *آسینتوباکتربومانی* متفاوت بود که همگی در جدول ۲ شرح داده شد.

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

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

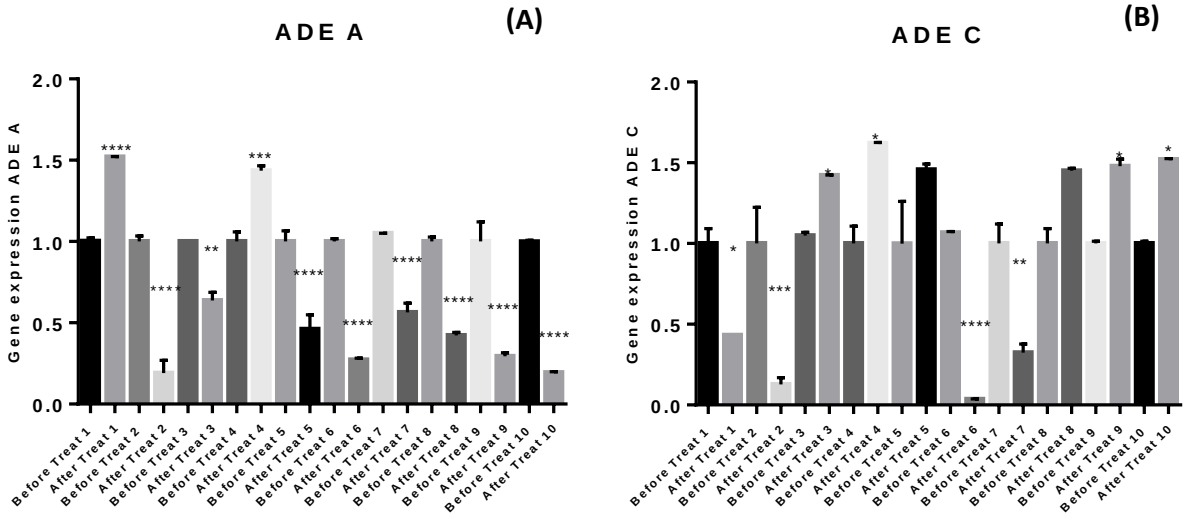
Acintobacter baumannii	MIC (µg/ml)
١	>١٠٠٠
٢	>١٠٠٠
٣	٣١,٢
٤	١٢٥
٥	٦٢,٥
٦	٢٥٠
٧	>١٠٠٠
٨	>١٠٠٠
٩	٥٠٠
١٠	>١٠٠٠

بررسی بیان ژن‌های *AdeB* و *AdeC*

فرمول مرجع بیان نسبی ژن ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) برای تعیین بیان ژن ها استفاده شد. آزمون آماری ANOVA way One-Tukey به‌وسیله نرم‌افزار آماری(SPSS 22.0) برای مقایسه تفاوت معنی‌دار مقادیر به‌دست‌آمده از بیان ژن‌ها مورداستفاده قرار گرفت. مقادیر کمتر مساوی p-valu ≤۰/۰۵، به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته و به صورت نمودار شرح داده شد. نتایج آزمون PCR ژن *gyrA* به‌عنوانHousekeeping gene جهت تأیید ۱۰ سویه *آسینتوباکتربومانی* 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*، ٤٠ درصد نمونه‌ها بعد از اعمال اثر نانوذره اکسید روی کاهش بیان را نشان دادند. ٦٠ درصد نمونه‌ها نیز بیان افزایشی داشتند. به استناد مقالات پیشین درصورتی‌که موتاسیون در ژن‌های تنظیم‌کننده *AdeRS* رخ دهد باعث افزایش بیش از حد این ژن و درنهایت افزایش بیش از حد ژن‌های *AdeABC* می‌شود که بیانگر یک ارتباط مستقیم ازنظر بیان ژن‌ها است. به طور احتمال دلیل این موضوع ایجاد جهش در ژن‌های *AdeR* و *AdeS* این سویه‌ها است که مجال بررسی جهش در این ژن‌ها در این پژوهش فراهم نشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]



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

در این مطالعه از نانوذرات اکسید روی بیو سنتیک با قطر میانگین ۵۰-۲۵ نانومتر استفاده شد(Saleh et al., 2021). نتایج خاصیت ضدمیکروبی مطالعه حاضر نیز نشان داد، نانوذره اکسید روی دارای خواص ضدمیکروبی 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 نه‌تنها با این پروتئین‌ها، بلکه با ترکیبات حاوی فسفر ازجمله 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 آنتی‌باکتریال نانوذره اکسید روی در مرحله اول به‌صورت MIC انجام گرفت. مطابق با جدول شماره ۲، حداقل غلظت بازدارندگی در ٤ مورد از سویه‌ها (µg/ml) ۳۱/۲، ٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ گزارش شد که نشان‌دهنده خاصیت مهارکنندگی رشد مطلوب نانوذره اکسید روی بود. در باقی سویه‌ها مهارکنندگی نانوذره به‌صورت (µg/ml) ۵۰۰ و ۱۰۰۰< 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 *AdeS*، *AdeR* کنترل می‌شود، تحریک دومین حسگر *AdeS* منجر به اتوفسفریلاسیون وابسته به ATP در هیستیدین کیناز و باعث انتقال اطلاعات به‌وسیله انتقال فسفریل به یک ریشه‌ی آسپارتات از *AdeR* می‌شود و درواقع باعث انتقال اطلاعات به *AdeR* می‌شود. *AdeR* تنظیم‌کننده فسریله شده بااتصال به پیش‌بر *AdeABC* بیان را کنترل می‌کند. لذا به نظر می‌رسد ارتباط افزایش بیان *AdeR* فسفریله بابیان ژن‌های *AdeABC* عکس است (Chang et al., 2016). تنظیم به‌وسیله تحریک دومین حسگر *AdeS* منجر به یک اتوفسفریلاسیون وابسته به ATP و درنهایت *AdeR* فسفریله شده بیان اپرون را به شکل معکوس بااتصال به ناحیه پیش‌بر کنترل می‌کند. هرچند سیگنال القاکننده‌ی اتوفسفریلاسیون *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 به‌خوبی 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 شماره۱(ب)، در ژن *AdeC*، ٤۰ درصد

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

نمونه‌ها بعد از اعمال اثر نـانوذره اکسـید روی کـاهش بیـان و ۶۰ درصد نمونه‌ها نیز افزایش بیان داشتند. نتایج کاهش MIC در ایـن سویه‌ها به‌طور کامل منطبق با نتایج کاهش بیان ژن پـس از اعمـال اثر نانوذره در این سویه‌ها بود و طبق انتظار با کاهش میـزان MIC با کاهش بیان ژن *AdeA* و *AdeC* روبرو شدیم. با عطـف بـه ایـن موضوع که بروز موتاسیون به ویـژه از نـوع جانشـینی در *AdeRS* باعث افزایش بیش‌ازحد ژن‌های *AdeABC* می‌شود (Peleg et al., 2007)، لـذا بـا توجـه بـه مطالعـات پیشـین کـه در سـال ۲۰۲۰، Madhi.M و همکارانش اثر نانوذره نقـره و کیتـوزان را بـر بیـان ژن‌هـای *AdeB* در *آسـینتوباکتربومانی* بررسـی کردنـد نتـایج را به‌صورت کاهش بیان این ژن گزارش کردند کـه ایـن موضـوع بـا توجه به تحقیقات گذشته نشان‌دهنده اثر مهاری 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 نیترات نقره بر کاهش بیان ژن‌هـای افلاکـس *AdeABC*انجام شد و قابـل انطبـاق بـا نتـایج ایـن مطالعـه اسـت (Behdad et al., 2020). در پژوهشـی کـه توسـط Hornesy و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد یک موتاسیون جانشـینی در ژن تنظیم‌کننده *AdeS* *آسینتوباکتر* مقاوم به تیجی سایکلین یافـت شـد که باعث افزایش بیش‌ازحد ژن‌هـای *AdeABC* شـد (Hornsey et al., 2010). در مطالعه‌ای که توسط AR. Atasoy در سال ۲۰۱۶ بر روی *آسـینتوباکترهـای* مقـاوم بـه آمینوگلیکوزیـدهـا انجـام شـد مشخص شد ارتباط معنی‌داری در مقاومت این سویه و موتاسـیون در ژن‌های تنظیم‌کننده *AdeRS* و بالطبع افزایش بیـان در ژن‌هـای *AdeABC* وجود دارد (Atasoy et al., 2016). بررسی های پیشـین تأییدکننده نتایج این پژوهش است که البته این نکته قابل‌ذکر است که برای توجیه این مطلب نمی‌توان تنها به بیان ژن اکتفا کرد و بـه بررسی‌های بیشتری نظیر RFLP برای یافتن ژن های جهش یافتـه یا تجزیه‌وتحلیل‌های دیگر جهت بررسی تغییرات در توالی DNA نیاز است. بااین‌حال، تجزیه‌وتحلیل بیشتر ژن‌هـای افلاکـس پمـپ در سطح پروتئین به بررسی این کـاهش مشـاهده‌شـده در بیـان و تنظیم ژن ها کمک می‌کند. همچنین فقـط یـک گـزارش در مـورد اثرهای تعدیل‌کننده نانوذرات نقره بـر بیـان ژن‌هـای *AdeABC* در سـویه‌هـای *آسـینتوباکتر* MDR موجـود اسـت (Behdad et al., 2020). این نتایج بیانگر این موضوع است که سنتز سبز نانوذرات بخصوص اکسید روی عـلاوه بـر اینکـه یـک فراینـد سـازگار بـا محیط‌زیست است می‌تواند با بهـره‌گیـری از دانـش روز در آینـده جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شود و به‌عنوان راه‌حلی برای حل معضـل جهانی مقاومت بـاکتری‌هـایی روزافـزون از قبیـل *آسـینتوباکتر* بـه دسته‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی شود. از طرفی بـا توجـه بـه نتـایج افزایش بیان ژن *AdeC* در ۶۰ درصد نمونه‌ها و با عطـف بـه ایـن موضوع که اطلاعات دربـاره بیـان ایـن ژن‌هـا و ارتبـاط آن‌هـا بـا یکدیگر هنوز ناکافی و مبهم است، توصیه مـی‌شـود مطالعـاتی در سطح وسیع‌تری نسبت به این ژن‌ها در سـطح موتاسـیون از قبیـل جانشینی، حذف شدن، درج شدن ومضاعف شدگی انجام شود. با توجه به افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک، جهان نیاز مبرمی به تغییر الگوی مصـرف و تجـویز منـابع جدیـدتر بـاارزش دارویـی مفیدتر دارد. درصورتی‌که مصرف دارو با همین الگو بـاقی بمانـد، حتی تولید و توسعه داروهای جدید نیز نمی‌تواند مانع از افـزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک شود. با توجه به اینکه ایـن مطالعـه اولین گزارش بررسی اثر نانوذرات اکسـید روی بـر بیـان ژن‌هـای افلاکس پمپ سویه‌های *آسینتوباکتر* است، لـذا هـدف از پـژوهش بررسی اثر آنتـی‌باکتریـال نـانوذره اکسـید روی بـر بیـان ژن‌هـای افلاکـس پمـپ *AdeABC* بـه روش فنـوتیپی و ژنـوتیپی در *آسینتوباکتر* بود که نقش بالقوه‌ای در مقاومت آن‌ها داشت و سـعی بـر آن شـد گـامی نـو درراه پیشـرفت در اسـتراتژی‌هـای جایگزین‌درمانی باکتری‌ها برداریم، تـا شـاید در آینـده اسـتفاده از مهارکننده‌های مناسب سبب اختلال در عملکرد این پمپ‌ها بـرای کنترل مقاومت چند دارویی شود.

نتیجه‌گیری کلی:

باتوجه‌به نتایج حاصل از اثـر نـانوذره اکسـید روی بیوسـنتز شـده توسـط *باسـیلوس سـوبتیلیس* بـر بیـان ژن‌هـای افلاکـس پمـپ *AdeABC* و محاسـبات صـورت‌گرفتـه بـه‌وسـیله MIC و آزمـون تجزیه‌وتحلیل آمار ANOVA way One-Tukey مشخص شـد کـه در ۸۰ درصد از نمونه‌های *آسینتوباکتربومانی* بیـان ژن‌هـای *AdeA* و در ۴۰ درصد از نمونه‌ها ژن‌های *AdeC* به‌وسیله نـانوذره اکسـید روی مهـار شـد؛ بنـابراین مـی‌تـوان آن‌هـا را بـه‌عنـوان عوامـل ضدمیکروبی جدید محسوب کرد و در آینـده از آن‌هـا در صـنایع

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

علوم پزشکی بهره برد. همچنین باتوجه‌به نتایج افزایش بیان ژن ٦٠ 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.

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.

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.

Esmaielzadeh 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, Esmaeilzadeh P, Bidhendi SM and Esmaeilzadeh 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

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, Moeez 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]

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 Saleh[1], Farzaneh Hosseini[*1], Farnaz Kheirandish[2], Fatemeh Yazdian[3]

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4]