مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۴، شماره۲، خرداد و تیر ۱۳۹۸(شماره پی در پی۱۳۳)

بررسی اثر فنوتیپی و ژنوتیپی اسانس الکلی مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس بر بیان ژن آلکالین پروتئاز در *پسودوموناس آئروژینوزا* به روش " RT-PCR"

راضیه محسنی[۱]، سید عبدالمجید خسروانی[۱*]، اصغر شریفی[۱]، اورنگ ایلامی[۱]، سید سجاد خرم روز[۱]، معصومه ملاآقا زرندی[۲]، فروغ مریدی‌کیا[۱]

[۱] گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲]وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: *پسودوموناس آئروژینوزا* یک باسیل گرم منفی وپاتوژن فرصت‌طلب بوده که در بیماران با نقص سیستم ایمنی مرگ و میر بالایی ایجاد می‌کند. عمده فعالیت ضدمیکروبی اسانس مرزه خوزستانی به دلیل اجزای فنلی کارواکرول است. نانومواد به دلیل سمیت کم برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌توانند انتخاب مناسبی باشند. هدف این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر اسانس الکلی مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس بر بیان ژن آلکالین پروتئاز *پسودوموناس آئروژینوزا* بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه نیمه‌تجربی که در سال۱۳۹۳ انجام شد، سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* از بیماران سوختگی در اهواز جداسازی شد و از طریق تست‌های استاندارد میکروبشناسی از قبیل؛ رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و تست اکسیداسیون بر فرمانتاسیون، تولید پیگمان و رشد در دمای ۴۲°c تعیین هویت شدند. مطالعه با روش رقت‌سازی میزان حداقل غلظت مهاری(MIC) اسانس و نانوکمپلکس علیه سویه‌های به دست آمد. پس از مواجهه با غلظت MIC، تغییرات بیان ژن آلکالین پروتئاز به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. درصد حیات سویه های مورد مطالعه در حضور غلظت های مختلف اسانس و نانوکمپلکس با روشMTT ASSAY تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری کروسکال والیس و تست تعقیبی شفه، فیشر، آنالیز واریانس و کولموگروف اسمیرنف تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان MIC اسانس برای سویه استاندارد و بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۴و۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان MIC نانوکمپلکس مس برای سویه استاندارد و بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. مشخص شد که اسانس و نانوکمپلکس در غلظت MIC دارای اثر مهاری علیه بیان ژن آلکالین پروتئاز بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که مرزه خوزستانی اثر ضد میکروبی و مهار بیان ژنی بیشتری نسبت به نانوکمپلکس بر روی ژن آلکالین پروتئاز دارد.

واژه‌های کلیدی: *پسودوموناس آئروژینوزا*، RT-PCR، نانوکمپلکس مس، اسانس مرزه خوزستانی، آلکالین پروتئاز

نویسنده مسئول: سید عبدالمجید خسروانی، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب‌شناسی
Email:khosravani2us@yahoo.com

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل عفونی فرصت طلب است که می‌تواند در طیف وسیعی از بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی شامل؛ افراد مبتلا به سرطان، سیستیک فیبروزیس، سوختگی و غیره، عفونت‌های کشنده‌ای ایجاد کند(۳ـ۱). این باکتری دارای عوامل ویرولانس متنوعی مانند؛ انواع پروتئازها، اگزوتوکسین‌ها، پلی‌ساکاریدها، فلاژل و غیره است. پسودوموناس آئروژینوزا به عنوان دومین باکتری بیماری‌زای رایج در جراحی‌ها و سومین عامل شایع و متداول عفونت‌های بیمارستانی بعد از *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است که حدود ۱۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد(۵ و۴). این باکتری از طریق مختلف مانند ایفلاکس پمپ‌ها، تغییر در نفوذپذیری غشا، تغییر در جایگاه هدف آنتی‌بیوتیک و غیره به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده به همین دلیل پژوهشگران به دنبال روش‌های نوین تشخیص سریع باکتری به منظور درمان و جلوگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشند. آلکالین پروتئاز(AprD) یک متالوپروتئاز روی ترشحی تیپ ۱ با وزن ۵۰ کیلودالتون می‌باشد که چندین جز سیستم ایمنی انسان، از جمله C1q و C3 که از اجزای اصلی کمپلمان هستند ویا سیتوکاین‌هایی نظیر اینترفرون گاما، تومور نکروزیز فاکتور آلفا و اینترلوکین ۲ را تخریب می‌کند. علاوه بر این‌ها این ژن از طریق تجزیه مونومرهای فلاژلین فعالیت گیرنده فلاژل(TLR5[1]) در پستانداران و FLS2[2]در گیاهان) را مختل می‌کند. AprD از فاگوسیته شدن و کشته شدن باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* به وسیله نوتروفیل های انسانی جلوگیری می‌کند(۷ و۶).

عصر نانوتکنولوژی عصر دیگری از علوم است و تلفیقی از مهندسی و زیست شناسی، شیمی، پزشکی و فیزیک می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که هر چه اندازه نانوذرات کوچک‌تر باشد، خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متفاوت‌تری از خود نشان می‌دهند.از طرفی نانومواد در چرخه حیات، پایین‌ترین سطح سمیت را از خود نشان داده‌اند، لذا این ویژگی‌ها باعث شده است که امروزه استفاده از نانومواد در ابعاد مختلف زندگی از جمله؛ سیستم‌های الکتریکی، مبارزه با میکروب ها، تشخیص و درمان بیماری ها به سرعت گسترش پیدا کند(۸).

گیاهی که در این تحقیق استفاده شده با نام علمی *Satureja Khozistanica* شناخته می‌شود که محل رویش طبیعی آن در استان‌های خوزستان و لرستان است و در گویش محلی به نام مرزه خوزستانی شناخته می‌شود. مرزه که از تیره نعناعیان به شمار می‌رود، دارای خاصیت ضدانعقادی می‌باشد و زمان انعقاد خون را طولانی تر می‌کند این گیاه و ترکیبات آن موضوع تحقیق چندین محقق بوده است و فعالیت ضدمیکروبی آن علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از قبیل؛ *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سالمونلا تیفی موریوم*

1-Toll like receptor 5
2-Fellageling signaling 2

و اشریشیا کلی نیز به اثبات رسیده است. عمده فعالیت ضد میکروبی این گیاه اساساً به دلیل اجزای فنلی اصلی آن یعنی کارواکرول و تیمول می‌باشد. از ویژگی‌های متمایز کننده این گیاه، وجود ۷۲ درصد کارواکرول در اسانس آن است، در حالی که میزان کارواکرول در اسانس گیاهان دیگر حداکثر ۲۹ درصد می‌باشد(۱۰ و۹).

به دلیل مقاومت دارویی بالای *پسودوموناس آئروژینورا* به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، هدف این تحقیق بررسی اثر عوامل ضدمیکروبی از جمله گیاهان و نانوذرات بر این باکتری بوده تا شاید بتوان با انجام تحقیقات مکملی دیگر درمانی برای این باکتری مقاوم پیدا کرد.

روش بررسی

در این مطالعه نیمه تجربی سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* از بیماران سوختگی در اهواز جداسازی شد و از طریق تست‌های استاندارد میکروب‌شناسی از قبیل؛ رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و تست اکسیداسیون بر فرمانتاسیون ، تولید پیگمان و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد تعیین هویت شدند. همچنین از سویه استاندارد *PAO1* به عنوان کنترل مثبت جهت کنترل شرایط انجانم آزمایش استفاده شد(۱۰).

اسانس الکلی مرزه خوزستانی با روش تقطیر در بخار آب به وسیله دستگاه کلونجر تهیه شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این روش اسانس گیاه با استفاده از بخار آب و بدون تماس زیاد گیاد با رطوبت، از بافت آن استخراج می‌شود و در دمای کم تر از ۵ درجه سانتی گراد سرد می‌شود(۱۰)

نانوکمپلکس مس به روش سونوشیمیایی در دانشگاه یاسوج سنتز شد.

در این مطالعه به منظور بررسی اثر مهارکنندگی نانوکمپلکس مس، از روش میکرودایلوشن به وسیله پلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده شد. غلظت‌های مورد بررسی شامل؛ ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

برای تعیین اثر مهارکنندگی اسانس مرزه خوزستانی نیز از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد با این تفاوت که به جای سریال دایلوشن برای به دست آوردن غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس، مقادیر مختلف از اسانس به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد.

حلال مورد استفاده برای هر دو ماده دی‌متیل سولفوکساید(DMSO)، حجم نهایی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر و تعداد باکتری نهایی وارد شده به هر چاهک معادل ۵×۱۰^{۵} کلونی بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

به منظور ایجاد حصول اطمینان از هر یک از غلظت‌های مختلف نانوکمپلکس، آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد.

یک چاهک به عنوان کنترل مثبت بدون اسانس و نانوکمپلکس برای تأیید رشد باکتری و یک ردیف از تمامی غلظت‌های ذکر شده به عنوان کنترل منفی برای افتراق کدورت مواد از کدورت ناشی از رشد باکتری در نظر گرفته شد. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شیکردار در۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (Biotec, ELX 800 (UK خوانده و کدورت سنجی انجام شد(۱۱).

تعیین درصد حیات باکتری‌ها (MTT ASSAY)، هدف استفاده از این تست، سنجش میزان حیات باکتری‌ها می‌باشد. اساس این تست بر پایه احیا و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم و تبدیل آن به کریستال‌های نامحلول بنفش رنگ فورمازان به وسیله آنزیم های سیتوپلاسمی در باکتری‌های زنده می‌باشد که پس از افزودن DMSO، کریستال‌های نامحلول به کریستال‌های محلول تبدیل می‌شوند.

در این روش پس از تعیین MIC، ۵ میکرولیتر رنگMTT به همه چاهک‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت، سپس ۵۰ میکرولیتر از DMSO اضافه شد و بعد از ۳۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و درصد حیات طبق فرمول زیر محاسبه شد و سپس رنگ سنجی انجام شد. به منظور ایجاد حصول اطمینان از هر یک از غلظت‌های مختلف نانوکمپلکس، آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد(۱۳ و۱۲).

درصد حیات =(a/b)×۱۰۰

X2: جذب نوری چاهک تیمار شده ـ بلانک

b:جذب نوری کنترل شده ـ بلانک

انتخاب قطعات ژنی و طراحی پرایمرهای مناسب، یک جفت پرایمر برای ژن AprD و یک جفت پرایمر برای ژن خانه داری DNA جیراز A(gyrA) به عنوان کنترل داخلی طبق جدول ۱ به وسیله نرم‌افزار Genscript طراحی شد، سپس واکنش PCR به منظور تأیید وجود ژن‌ها در سویه‌ها با توجه به شرایط موجود در جدول ۲ و ۳ انجام گرفت(۱۰)

ابتدا یک‌بار باکتری‌ها در معرض غلظت MIC از مواد ضدمیکروبی مورد مطالعه و هم‌چنین در عدم حضور مواد ضدمیکروبی به عنوان شاهد کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس با استفاده از رسوب به دست آمده از کشت باکتری‌ها مرحله استخراج و تخلیص RNA با استفاده از دستورالعمل کیت GmbHJena bioscience صوت گرفت و سپس از روی RNAهای استخراج شده از هر کدام از نمونه‌های شاهد و تیمار cDNA ساخته شد. هم‌چنین بیان ژن به صورت کیفی با بررسی باندهای ایجاد شده بر روی ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار *SPSS* و آزمون‌های آماری کروسکال والیس و تست تعقیبی شفه، فیشر، آنالیز واریانس و کولموگروف اسمیرنف تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱ : توالی پرایمر AprD و DNA gyrase A

پرایمر	توالی	طول آمپلیکون
F-AprD	AACAAGCAGCCCTACTACGC	۱۴۰
R-AprD	AACAGGTAATTGAGCAGCGA	۱۴۰
F-gyrA	GGTCTGGGCATAGAGGTTGT	۱۲۱
R-gyrA	GAAGATCGAGGGTATTTCCG	۱۲۱

جدول ۲ : مواد مورد نیاز واکنش PCR

Master Mix (1x)	12.5 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10µM)	1 µl
Template DNA(20pg)	2µl
Sterile Deionized Water	8.5µl

جدول ۳: شرایط انجام واکنش PCR

مرحله	برنامه	دما(درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
Primary Denaturation	۱	۹۵	۱دقیقه	۱
Denaturation	۲	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۵
Annealing	۲	۵۴	۳۰ ثانیه	۳۵
Extention	۲	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۵
Final Extention	۳	۷۲	۷دقیقه	۱

یافته‌ها

در این مطالعه، سویه استاندارد *PAO1* و ۱۴ سویه بالینی جدا شده از بیماران سوختگی تحت بررسی و تیمار قرار گرفتند.

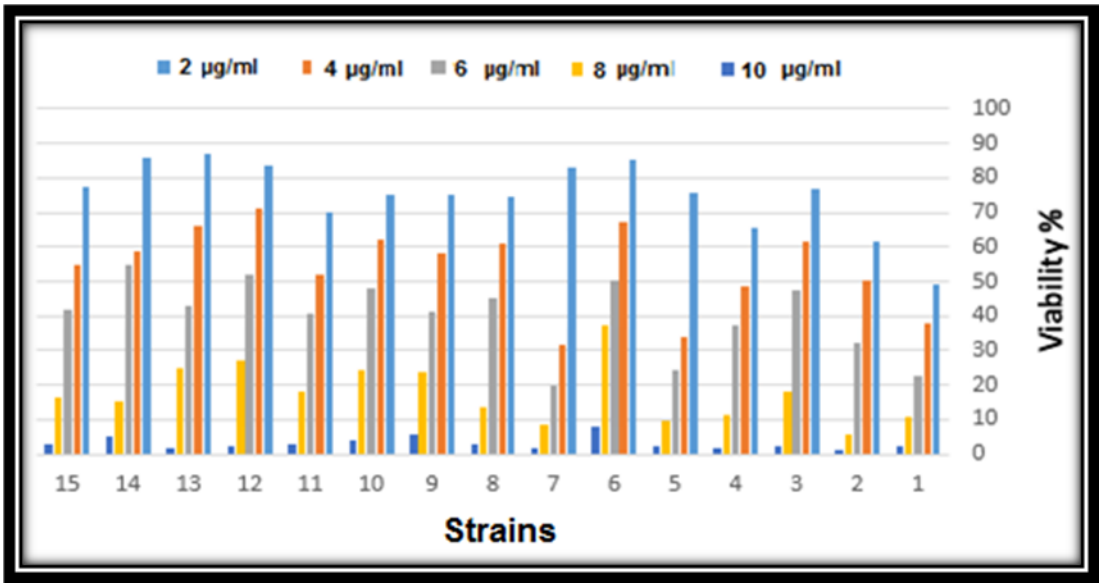
نتایج حداقل غلظت مهاری تیمارهای مطالعه در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا در جدول ۴ ارایه شده است که بر اساس نتایج به دست آمده از این جدول مشخص شد که، حداقل غلظت مهاری اسانس مرزه خوزستانی کمتر از نانوکمپلکس مس بود.

نمودار ۱ و ۲ به ترتیب نتایج حاصل از میزان درصد حیات سویه‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف اسانس مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس را نشان می‌دهد که بر اساس این نمودارها با توجه به کاهش غلظت‌ها درصد حیات زیاد شد.

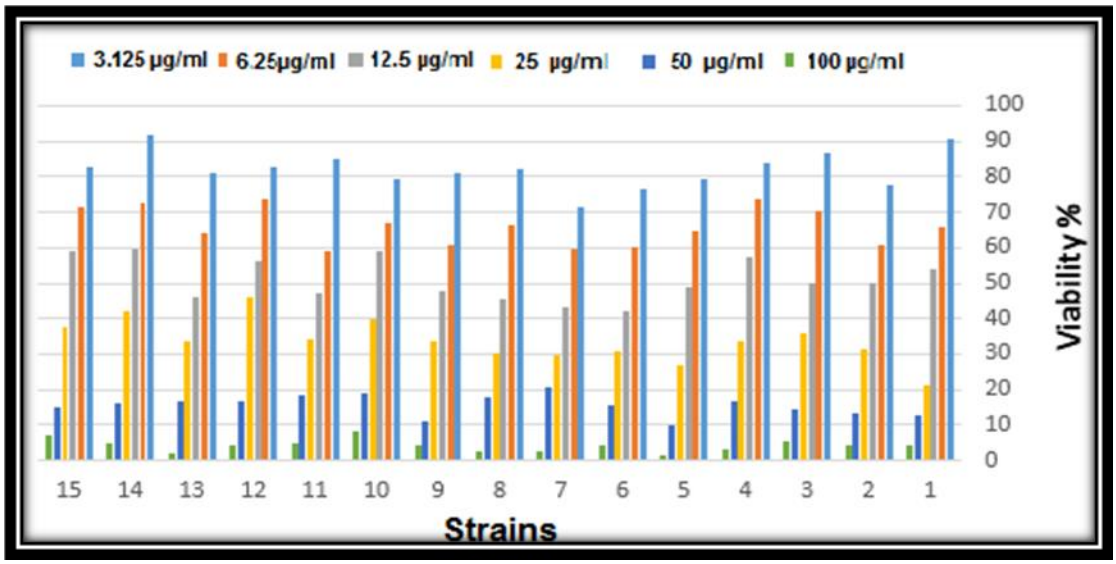
شکل ۱ نتایج حاصل از میزان بیان ژن *AprD* و *gyrA* قبل و بعد از تیمار با مواد ضد میکروبی مورد مطالعه با استفاده از روش *RT-PCR* به صورت کیفی را نشان می‌دهد. که این نتایج نشان دهنده مهار بیان ژن *AprD* به وسیله مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس بوده در صورتی که بیان ژن *gyrA* قبل و بعد از تیمار تفاوتی نداشته است.

جدول۴: حداقل غلظت مهاری تیمارهای مطالعه در سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا

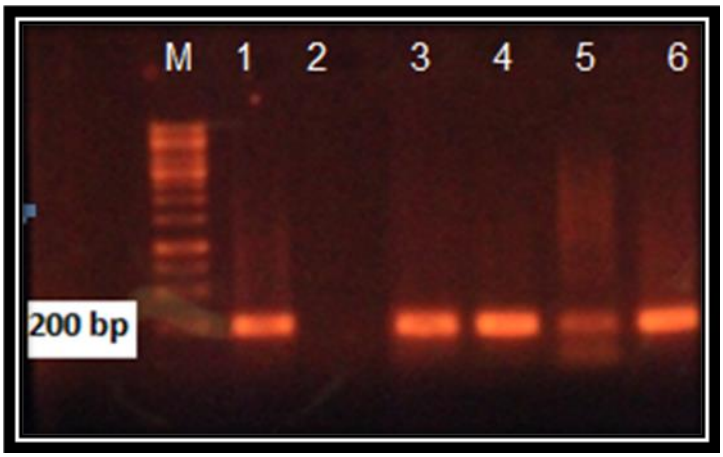
نوع مداخله سویه مورد مطالعه	اسانس مرزه خوزستانی (میکروگرم بر میلی لیتر)	نانوکمپلکس مس (میکروگرم بر میلی لیتر)
سویه استاندارد	۴	۲۵
سویه بالینی ۱	۸	۵۰
سویه بالینی۲	۸	۵۰
سویه بالینی۳	۸	۵۰
سویه بالینی۴	۴	۲۵
سویه بالینی۵	۸	۵۰
سویه بالینی۶	۴	۵۰
سویه بالینی۷	۸	۵۰
سویه بالینی۸	۸	۵۰
سویه بالینی۹	۸	۵۰
سویه بالینی۱۰	۸	۵۰
سویه بالینی۱۱	۸	۵۰
سویه بالینی۱۲	۸	۵۰
سویه بالینی۱۳	۸	۵۰
سویه بالینی۱۴	۸	۵۰



نمودار۱: درصد حیات سویه‌های *مورد مطالعه* در حضور غلظت‌های مختلف اسانس مرزه خوزستانی



نمودار۲: درصد حیات سویه‌های مورد مطالعه درحضور غلظت‌های مختلف نانو کمپلکس مس



شکل ۱: M: مارکر–۱: ژن AprD قبل از تیمار با اسانس ـ ۲: ژن AprD بعد از تیمار با اسانس ـ ۳ و ۴: ژن gyrA به عنوان کنترل درونی قبل و بعد از تیمار– ۵: ژن AprD بعد از تیمار با نانوکمپلکس مس ـ ۶: ژن AprD قبل از تیمار با نانو کمپلکس مس

بحث

پسودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل عفونی فرصت طلب است که می‌تواند در طیف وسیعی از بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی شامل؛ افراد مبتلا به سرطان، سیستیک فیبروزیس، سوختگی و غیره، عفونت‌های کشنده‌ای ایجاد کند(۳). از سال ۱۹۷۰ به بعد عفونت های بیمارستانی از جمله عفونت زخم سوختگی ایجاد شده به وسیله باکتری‌های گرم منفی هوازی نظیر *اسینتوباکتر و سودوموناس* با مقاومت چندگانه افزایش یافته است. *پسودوموناس آئروژینوزا* به عنوان دومین باکتری بیماری‌زای رایج در جراحی‌ها و سومین عامل شایع و متداول عفونت‌های بیمارستانی بعد از *اشرشیاکلی* و *استاف اورئوس* است که حدود ۱۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی را

تشکیل می‌دهد. با توجه به کثرت عفونت‌های ایجاد شده به وسیله *پسودوموناس آئروژینوزا* و مقاومت ذاتی آن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های معمول، مرگ و میر در بیماران با عفونت‌های ناشی از این باکتری بسیار شایع است. برای مثال پنومونی بیمارستانی *پسودوموناس آئروژینوزا* باعث ۷۰ درصد مرگ و میر در بیماران می‌شود(۱۴). از این رو بشر به فکر یافتن داروهایی با خاصیت مهاری ژن‌های بیماری‌زا و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری افتاده است تا بتوان به عنوان مکمل درمانی از آن‌ها استفاده کرد.

در این تحقیق سویه‌های واجد ژن آلکالین پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت که نشان می‌دهد اسانس مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس دارای خاصیت مهاری بر ژن آلکالین پروتئاز در سویه‌ها ی مورد مطالعه می‌باشد.

نانو مواد در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمیت را از خود نشان داده‌اند، لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. به دلیل نیروی جاذب بین بار مثبت نانوذرات و بار منفی باکتری، نانوذرات می‌توانند به باکتری متصل شوند و مولکول‌های سطحی را اکسید کرده و باعث مرگ سلول می‌شوند. نانو ذرات همچنین مانع تشکیل بیوفیلم به وسیله باکتری می‌شود(۸).

اسانس‌ها به علت طبیعت آب‌گریز خود تمایل زیادی برای پیوند با لیپیدهای غشای سلول باکتری دارند، خواص ضد باکتریایی آنها به طور آشکار به خاصیت چربی دوستی آنها مربوط است. کارواکرول یکی از مهم‌ترین ترکیب های مؤثره اسانس مرزه خوزستانی می‌باشد که توانایی اثر روی غشاء سیتوپلاسمی، زنجیره انتقال الکترون، فعالیت‌های متابولیکی، سنتز ژنوم‌ها و سنتز پروتئین را دارد(۱۵). با توجه به نفوذ مناسب اسانس این گیاه به داخل باکتری، محققین در سراسر دنیا از آن جهت مهار بیان ژن، آپوپتوزیس و مهار تکثیر ژن‌های سرطانی استفاده کرده‌اند. در این مطالعه در تست‌های اولیه ثابت شده است که این ماده دارای اثر مهاری بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد.

پژوهش‌های مختلفی در مورد اثرات ضد میکروارگانیسمی نانوذرات و اسانس گیاه مرزه خوزستانی و برخی از ترکیبات شناخته شده مهم در اسانس این گیاه از جمله کارواکرول و تیمول وجود دارد. هم‌چنین پژوهش‌های زیادی در مورد اثر مهاری این اسانس بر ژن‌های مختلف انجام شده است.

در مطالعه انجام شده به وسیله اعظمی و همکاران، غلظت MIC نانوذره اکسید مس سنتز شده در دماهای مختلف علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* از ۵۵ ـ ۲۸ میکروگرم بر میلی‌مول متغیر بوده است(۱۶).

اثر ضد باکتریایی نانوذره اکسید روی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* به وسیله پریماناتان و همکاران بررسی شده است و مشخص شده که علظت MIC نانوذره اکسید روی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌مول علیه این باکتری بوده است(۱۷).

در مطالعه که به وسیله عباسی و همکاران صورت گرفته است، تأثیر اسانس مرزه خوزستانی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* سنجیده و مشخص شد اسانس این گیاه دارای حداقل غلظت مهاری برابر ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه این باکتری می‌باشد(۱۸).

در سال ۲۰۱۰ پژوهش‌هایی درباره اثر ضد قارچی عصاره برگ اسانس مرزه خوزستانی به وسیله صادقی و همکاران انجام شده است. در این تحقیق عصاره برگ این گیاه به ترتیب دارای حداقل غلظت مهاری ۶۲۵، ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر و پنی سیلیوم بوده است(۱۹).

جلالوندی و همکاران مشخص کردند که کارواکرول با MIC=۰/۵ میکرو مول بر میلی‌لیتر دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. هم‌چنین ثابت کردند که این اسانس علیه ژن‌های mexA و mexR *پسودوموناس آئروژینوزا* دارای خاصیت مهاری می‌باشد(۲۰).

اسماعیلی و همکاران در تحقیقی با روش Real time PCR به بررسی اثر مهاری اسانس مرزه خوزستانی بر روی بیان ژن مرتبط با بیوفیلم *اسینتوباکتربومانی*(bap) پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن bap در شرایط آزمایشگاهی با این روش در مقایسه با ژن خانه‌داری DNA جیراز A، کاهش پیدا کرده است(۱۰).

در تحقیقی که توسط بورت و همکاران انجام گرفت مشخص شد که کارواکرول واجد خاصیت مهاری علیه تولید پروتئین شوک حرارتی ۶۰ (HSP60) و سنتز فلاژلین در *اشرشیا کلی O157:H7* می‌باشد(۲۱).

اکالین و اینسیسواثر کارواکرول را بر روی سلول سرطانی H-RAS و N-RAS بررسی نمودند که نتایج نشان داد کارواکرول دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی این سلول‌ها در دوز و زمان مناسب می‌باشد و نتایج آنها نشان داد که سلول‌ها و ژن‌های با فعالیت بالا حساسیت بیشتری نسبت به عوامل ضد میکروبی نشان می‌دهند(۲۲).

با مطالعه این اسانس و نانوکمپلکس بر روی سایر ژن‌های ویرولانس *پسودوموناس آئروژینوزا* و مطالعه نتایج حاصل می‌توان از اسانس این گیاه و هم‌چنین نانوکمپلکس در آینده با پژوهش‌های آزمایشگاهی به عنوان درمان و یا مکمل درمانی به صورت پماد یا افزودنی‌ها به ماده غذایی بیماران و هم‌چنین به عنوان ضدعفونی کننده دست و محیط برای جلوگیری از انتشار عفونت ناشی از این باکتری در محیط‌های بیمارستان استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که در این مطالعه اسانس مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس اثر مهاری قابل توجهی بر بیان ژن آلکالین پروتئاز در باکتری‌های مورد مطالعه دارند، لذا با مطالعه این مواد روی سایر

ژن‌های ویروالنس *پسودوموناس آئروژینوزا* و مطالعه نتایج حاصل، می‌توان از این مواد در آینده با پژوهش‌های آزمایشگاهی و تحقیقی به عنوان مکمل درمانی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) به دلیل حمایت مالی و همکاری در اجرای این پروژه قدردانی می‌شود.

REFRENSES

1.Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs 2007; 67(3): 351-68.
2.Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of Pseudomonas aeruginosa. Biochimie 2002; 84(5): 499-510.
3.Wolf P, Elsässer-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. International Journal of Medical Microbiology 2009; 299(3): 161-76.
4.Mendiratta D, Deotale V, Narang P. Metallo-[beta]-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a hospital from a rural area. Indian Journal of Medical Research 2005; 121(5): 701.
5.O'Carroll M, Syrmis M, Wainwright C, Greer R, Mitchell P, Coulter C, et al. Clonal strains of Pseudomonas aeruginosa in paediatric and adult cystic fibrosis units. European Respiratory Journal 2004; 24(1): 101-6.
6.Bardoel BW, Van Der Ent S, Pel MJ, Tommassen J, Pieterse C, van Kessel K, et al. Pseudomonas evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. PLoS Pathog 2011; 7(8): e1002206-e.
7.Gellatly SL ,Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and Disease 2013; 67(3): 159-73.
8.Imani S, Zagari Z, Rezaei-Zarchi S, Zand AM, Dorodiyan M, Bariabarghoyi H, et al. Antibacterial effect of CrO and CoFe2O4 nanoparticles upon Staphylococcus aureus. Journal of Fasa University of Medical Sciences 2011; 1(3): 175-81.
9.Ahmadvand H, Tavafi M, Shahsavari G, Khosrobeigi A, Bagheri S, Abdolahpour F. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of Satureja khozestanica essential oil in alloxan-induced type 1 diabetic rats. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 2013; 15(8): 26-9.
10.Bahador A, Saghii H, Ataee R, Esmaeili D. The Study of Inhibition effects satureja khuzestaniea essence against gene expression bap acinetobacter baumannii with real time pcr technique. Iranian Journal of Medical Microbiology 2015; 9(1): 42-9.
11.Shebl R, Mohamed A, Ali A, Amin M. Antimicrobial profile of selected snake venoms and their associated enzymatic activities. Br Microbiol Res J 2012; 2: 251-63.
12.Gattringer R, Nikš M, Ostertág R, Schwarz K, Medvedovic H, Graninger W, et al. Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2002; 49(4):651-9.
13.Yalcın HT, Ozen MO, Gocmen B, Nalbantsoy A. Effect of ottoman viper (Montivipera xanthina (Gray, 1849)) venom on various cancer cells and on microorganisms. Cytotechnology 2014; 66(1): 87-94.
14.Yousefi Mashouf R, Esmaeili R, Alikhani MY, Ghanbari M. Evaluation of exotoxin A gene and frequency of polymerase chain reaction sensitivity in detection of pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Tehran University Medical Journal 2014; 72(3): 167-73.
15.Sharifian M, Bolhari B, Nosrat A, Aligholi M. The effect of carvacrol on Enterococcus faecalis as an intracanal medicament-Invitro study. Journal of Dental Medicine 2009; 22(1): 35-40.
16.Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan M, Memic A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and-negative bacterial strains. International Journal of Nanomedicine 2012; 7: 3527.
17.Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine 2011; 7(2): 184-92.
18.Abbasi A, Bahador A, Esmaeili D, Mahbubi A, Amiri M, Amiri M. The study of inhibitory effects of satureja khuzestanica against mdr isolates of pseudomonas aeruginosa. Int J Curr Microbiol App Sci 2014; 3(2): 614-8.
19.Sadeghi-Nejad B, Shiravi F, Ghanbari S, Alinejadi M, Zarrin M. Antifungal activity of Satureja khuzestanica (Jamzad) leaves extracts. Jundishapur J Microbiol 2010; 3: 36-40.
20.Jalalvandi N, Bahador A, Zahedi B, Saghi H, Esmaeili D. The study of inhibitory effects of satureja khuzestanica essence against mexa and mexr efflux genes ofpseudomonas aeruginosa by RT-PCR. International Journal of Biotechnology 2015 ;4(1): 1-8.
21.Burt SA, Vlielander R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against Escherichia coli O157: H7 by addition of food stabilizers. Journal of Food Protection 2005; 68(5): 919-26.
22.Akalin G, Incesu Z. The effects of carvacrol on apoptosis of H-ras and N-ras transformed cell lines. Turk J Pharm Sci 2011; 8(2): 105-16.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Evaluation of the Phenotypic and Genotypic Effects of Satureja Khuzestanica Essence and Copper Nanocomplex on the Expression of Alkaline Protease Gene in *Pseudomonas Aeruginosa* by RT-PCR Method

Mohseni R[1], Khosravani SA[1*], Sharifi A[1], Eilami O[1], Khorramrooz SS[1], Mollaqagh Zarandi M[2], Meridi Kia F[1]
[1]Department of Microbiology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2] Iran, Deputy for Education Ministry of Health and Medical Education

Received: 05 Des 2018 Accepted: 15 May 2019

Abstract

Background & aim: *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacillus and an opportunistic pathogen that causes high mortality in immunocompromised patients. The main antimicrobial activity of *Satureja khuzestanica* essence is due to carvacrol phenolic components. Nanomaterials can be a good choice because of low toxicity to fight pathogenic microbes. The aim of this study was to evaluate the effect of Satureja khuzestanica essence and copper nanocomplex on the expression of alkaline protease gene in *Pseudomonas aeruginosa.*

Methods: In this study, minimum inhibitory concentration (MIC) of essence and nanocomplex were detected against the strains by microdilution broth method. After exposure to MIC concentration, the alteration of alkaline protease gene expression by RT-PCR was investigated. The viability percentage was determined by MTT assay method in the presence of essence and nanocomplex.

Results: The MIC of essence for standard and clinical *p. aeruginosa* strains was 4 and 8 µg/ml respectively, and the MIC for the standard and clinical *p. aeruginosa* strains was 25 and 50µg/ml, respectively. It was found that essence and nanocomplex in MIC concentration had an inhibitory effect on the expression of alkaline protease gene.

Conclusion: The results showed that the essence has a stronger antimicrobial and inhibitory effect on the expression of alkaline protease gene than the nanocomplex.

Keywords: *Pseudomonas Aeruginosa*, RT-PCR, Copper Nanocomplex, Satureja Khuzestanica essence, Alkaline Protease

[*]**Corresponding author: Khosravani SA**, Department of Microbiology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email:khosravani2us@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Mohseni R, Khosravani SA, Sharifi A, Eilami O, Khorramrooz SS, Mollaqagh Zarandi M, Meridi Kia F. Evaluation of the Phenotypic and Genotypic Effects of Satureja Khuzestanica Essence and Copper Nanocomplex on the Expression of Alkaline Protease Gene in *Pseudomonas Aeruginosa* by RT-PCR Method. Armaghane-danesh 2019; 24(1): 226-237