

تأثیر ذرات نانواکسیدروی بر بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس

مونا کنکوری^۱، یوسف عرفانی^{۲*}، شرمین خرازی^۳، ستاره حقیقت^۴

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یک پاتوژن فرصت‌طلب گرم منفی است که اغلب در بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، زخم‌های سوختگی، نقص ایمنی، اختلال انسداد مزمن ریوی یافت می‌شود. علاوه بر این، سودوموناس آئروژینوزا همچنین یکی از مهمترین پاتوژن‌های مسبب عفونت‌های بیمارستانی اطلاق می‌شود که به‌طور گسترده در دستگاه‌های پزشکی (تهویه) یافت می‌شود؛ زیرا تمایل به رشد روی سطوح مرطوب دارند. با توجه به اهمیت درمان سیستمیک فیبروزیس و توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سودوموناس آئروژینوزا، این مطالعه به بررسی اثر نانوذره اکسیدروی بر بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس می‌پردازد.

روش بررسی: نمونه‌های خلط و گلو از ۱۵۰ بیمار مبتلا به سیستمیک فیبروزیس تهیه و برای جداسازی سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت مکانیکی آگار کشت داده شد و تست‌های تشخیصی و افتراقی برای شناسایی کلنی‌ها صورت گرفت. تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی جدایه‌های مثبت با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی-باثر) انجام شد. نانوذره اکسیدروی باتوجه به دستورالعمل ساخت نانوذره ساخته شد و با میکروسکوپ SEM ارزیابی گردید. سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک با ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسیدروی ۲ نانومتری تلقیح شدند و هاله مهار سنجیده شد. بررسی اثر نانوذره بر کاهش بیان ژن‌های *lasR*، *retS*، *gacA* و *rhlR* با استفاده از روش Real-Time PCR سنجیده شد.

یافته‌ها: از مجموع ۱۵۰ نمونه دریافتی، ۷۳ (۴۸/۶۶٪) مورد از جدایه‌ها به‌عنوان سودوموناس آئروژینوزا شناخته شدند. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تمام جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی مقاوم بودند. نتایج ارزیابی نانوذره با میکروسکوپ SEM نشان داد که نانوذره ستنز شده میانگین اندازه حدود 44 ± 4 نانومتر دارد. نتایج تست Real-Time PCR نشان‌دهنده کاهش بیان ژن‌های *lasR*، *retS*، *gacA* و *rhlR* در حضور نانوذره اکسیدروی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا بود. بیشترین اثر کاهشی بر سطح بیان ژن *rhlR* و کمترین بر سطح بیان ژن *retS* مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: استفاده از نانوذره اکسیدروی می‌تواند سبب حذف عفونت سودوموناس آئروژینوزا از طریق کاهش بیان ژن‌های مورد مطالعه و ممانعت از تشکیل بیوفیلم شود و نتیجه‌ی درمانی بهتری را برای بیماران سیستمیک فیبروزیس مبتلا به عفونت ریه ارایه دهد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، اکسیدروی، نانوذرات، Real-time PCR، بیان ژن

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۷/۳۰

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۹

* نویسنده مسئول:

یوسف عرفانی؛

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

ستاره حقیقت؛

واحد علوم پزشکی تهران دانشگاه آزاد اسلامی

Emails:

yerfani@tums.ac.ir

haghighat.s@iau.ac.ir

۱ دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳ دانشیار گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴ دانشیار گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران



مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک میکروارگانیسم فرصت طلب، گرم منفی، متحرک و هوازی است که عمدتاً در دستگاه تنفسی افراد با نقص ایمنی مانند بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس و بستری در بیمارستان کلونیزه می‌شود (۱). سودوموناس آئروژینوزا عامل بروز اندوکاردیت، باکتری می، عفونت‌های زخم، عفونت‌های چشمی، گوش، دستگاه گوارش و دستگاه ادراری و ذات‌الریه بوده که به‌عنوان یک پاتوژن تهدیدکننده‌ی زندگی با نرخ مرگ‌ومیر بالا به دلیل مقاومت ذاتی به عوامل ضدباکتری متداول همیشه مورد اهمیت بوده است (۲ و ۳).

سودوموناس آئروژینوزا به بسیاری از استراتژی‌های درمانی و همچنین در برابر نمک با غلظت بالا، عوامل ضد عفونی‌کننده‌ی رایج، شرایط خشک و اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، بسیار مقاوم است که بیان‌کننده نیاز فوری به درمان باکتری به‌ویژه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی است (۳). خاصیت بیماری‌زایی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک به دلیل وجود عوامل بیماری‌زا و همچنین توانایی تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا باعث شده است که در صورت کلونیزه شدن باکتری در سیستم تنفسی، در شرایط نامطلوب شامل محیط بی‌هوازی، رقابت برای کسب مواد مغذی و کلونیزه شدن باکتری‌های دیگر، وجود غلظت بالای نمک، مورد حمله‌ی سلول‌های ایمنی شامل نوتروفیل، تولید AMP و ROS قرارگیرد. بنابراین باکتری با بروز جهش جهت بیان عوامل بیماری‌زایی شامل پیلی، تاژک، پروتئازها و بیان ژن‌های تشکیل‌دهنده‌ی بیوفیلم، ویژگی‌های لازم جهت بقا در محیط نامطلوب را کسب کند (۴).

تشکیل بیوفیلم منجر به شکل‌گیری ماتریکس سلولی در اطراف جامعه میکروبی می‌شود که امکان تبادل ژنتیکی بین جوامع باکتریایی را فراهم کرده، از سیستم ایمنی مانند فاگوسیتوز محافظت می‌کند و سبب بروز مقاومت ۱۰-۱۰۰ برابری باکتری در مقایسه با حالت عادی می‌شود (۵). در زمان تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها، سیستم کروم‌سنسینگ منجر به ایجاد ارتباط بین سلول‌ها و تبادل مواد غذایی، افزایش مکانیسم دفاعی در برابر سیستم ایمنی و بروز مقاومت علیه عوامل ضدباکتری می‌شود؛ علاوه بر آن در تنظیم بیان ژن باکتری، تشکیل بیوفیلم و اسپورزایی نقش دارد. رایج‌ترین مولکول‌های ارتباطی در سیستم کروم‌سنسینگ، اتواینوسر یا خودالفارگر هموسرین لاکتون (AHL) است. در سودوموناس آئروژینوزا در تشکیل بیوفیلم سیستم کروم‌سنسینگ Las/Rhl دارای نقش اساسی هستند. ژن‌های *lasR*, *psq*, *iqs* و *rhlR* در سیستم‌های

کروم‌سنسینگ عمدتاً در سودوموناس آئروژینوزا وجود دارند (۶).

همان‌طور که قبلاً ذکر شد، سودوموناس آئروژینوزا عمدتاً در سیستم تنفسی بیماران دچار نقص ایمنی مانند سیستمیک فیبروزیس کلونیزه می‌شود. سیستمیک فیبروزیس یکی از بیماری‌های ارثی تهدیدکننده‌ی زندگی است که بیش از ۷۰۰۰ نفر در سراسر جهان به آن مبتلا هستند. کیفیت زندگی در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس بسیار ضعیف است و میانگین بقای آن حدود ۴۷ سال است (۷). از آنجایی که در افراد مبتلا به سیستمیک فیبروزیس عملکرد ریه مختل شود، بیماران مستعد ابتلا به عفونت سودوموناس آئروژینوزا هستند، درمان عفونت سودوموناس آئروژینوزا به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و خواص بیوفیلمی باکتری بسیار سخت است که منجر به پیش‌آگهی بد بیماری و کاهش امید به درمان بیماران می‌شود (۸). اخیراً نانوذرات فلزی به‌عنوان یک ماده‌ی امیدوارکننده در زمینه پزشکی مورد توجه قرار گرفته است که در این میان، نانوذرات اکسیدروی بیشتر به‌عنوان یک نانوذره ضدسرطانی و ضدباکتریایی و همچنین دارای خواص ضدالتهابی و ضددبایتی کاربرد دارند. نانوذره اکسیدروی می‌تواند دیواره سلولی باکتری را تحریک کند و یکپارچگی غشا را از طریق تولید پراکسید هیدروژن مختل کند (۹). هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر نانوذره اکسیدروی بر سطح بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سیستمیک فیبروزیس است.

روش بررسی

• جداسازی سویه‌های باکتریایی از بیماران

سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های خلط و گلودی ۱۵۰ بیمار مبتلا به سیستمیک فیبروزیس که به بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران مراجعه کرده بودند، تهیه شد. نمونه‌ها بلافاصله به محیط تربیتیک سوی براث (TSB) منتقل شدند و سپس در محیط کشت مکانیکی آگار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. به بیماران قبل از ورود فرم رضایت‌نامه داده شد.

پس از کشت باکتری بر روی محیط کشت مکانیکی آگار، کلنی‌های موکوتیدی با رنگ‌دانه‌ی سبز جدا شده و شناسایی باکتری بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، رنگ‌آمیزی گرم، گلوکز و مالتوزاکسیداز، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 یک سویه استاندارد مثبت برای اعتبارسنجی مطالعه در نظر گرفته شد. کلنی‌های تأیید

• تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذره

اکسیدروی بر سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش میکروداپلوشن براث

برای تعیین حداقل غلظت مهاری نانوذره از پلیت ۹۶ خانه استفاده گردید. بدین منظور، رقت‌های سریالی از نانوذره اکسیدروی در محیط مولر هیتون براث تهیه گردیده و داخل هر چاهک ریخته شد. کدورت نیم‌مک‌فارلند از کشت تازه تمامی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید. پلیت، ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. از محیط کشت مولر هیتون براث به‌عنوان کنترل منفی و محیط کشت به‌همراه سوسپانسیون سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. تعیین کدورت چاهک‌ها با استفاده از الیزایدر (Biotek) ارزیابی شد. اولین چاهکی که عدم رشد در آن مشاهده گردید و با جذب نوری بسیار نزدیک به صفر و یا برابر صفر، به‌عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد. از چاهک‌هایی که در آن‌ها رشد صورت نگرفته بود، بر روی محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) کشت صورت گرفت و پس از یک شبانه‌روز گرماگذاری کمترین غلظتی از نانوذره که باکتری در آن رشد نکرد، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی صورت گرفت.

• تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک در حضور

زینک اکساید

نانوذرات اکسیدروی در آب مقطر حل شده و میزان ۱۰ ماکرولیتر از آن به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به‌کار رفته تلقیح و این‌بار قدرت حجم معین از غلظت اولیه از نانوذرات اکسیدروی اضافه شده به دیسک‌های به‌کار برده آنتی‌بیوتیکی جهت بررسی تأثیر نانوذرات اکسیدروی در همراهی آنتی‌بیوتیک در مقایسه با اثر آنتی‌بیوتیک به‌تنهایی، در از بین بردن باکتری بررسی گردید.

• تجزیه و تحلیل کمی ژن‌های مربوط به تشکیل بیوفیلم در حضور

نانوذرات اکسیدروی با استفاده از Real-Time PCR

نمونه‌ی RNA از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا که با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو اکسیدروی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شده بودند، استخراج شد. سپس بیوفیلم از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای جدا شده و با ۱۰ میلی‌مولار NaCl شسته شد و در نهایت توسط کیت استخراج RNA (سیناژن، تهران، ایران) براساس دستورالعمل ذکر شده استخراج RNA صورت گرفت. cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA استاندارد Revert Aid™

شده به محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۲۰٪ گلیسرول منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره و نگهداری شدند.

• تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از دیسک دیفیوژن

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده با استفاده از روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل‌های موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI 2023) انجام شد. آنتی‌بیوتیک‌های انتخاب شده برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به شرح زیر بودند: پپراسیلین ۱۰۰ میکروگرم (PIP)، تیکارسیلین ۷۵ میکروگرم (TC)، تازوباکتام-پپراسیلین ۱۰۰ میکروگرم (TZP)، سفنازیدیم ۳۰ میکروگرم (CAZ)، سفپیم ۳۰ میکروگرم (FEP)، مروپنم ۱۰ میکروگرم (MEM)، آزترونام ۳۰ میکروگرم (ATM)، آمیکاسین ۳۰ میکروگرم (AN)، جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (GM) و سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم (CP). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه از شرکت‌های MAST (انگلستان) و Rosco (دانمارک) خریداری گردیدند. سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به‌عنوان کنترل استفاده شد. (۱۰).

• سنتز نانوذرات اکسیدروی با استفاده از رسوب شیمیایی

نانوذره اکسیدروی براساس غلظت روی (M/۳۵-۰/۵۰)، زمان واکنش (۵-۱ دقیقه) و نسبت مولی (۲-۱۰) OH-/Zn با استفاده از روش رسوب شیمیایی سنتز شد. به‌طور خلاصه، استات روی و هیدروکسیدسدیم (مواد شیمیایی Merck، آلمان) در متانول حل شده و به مدت ۱ ساعت به آرامی و با سرعت ۵ میلی‌لیتر در دقیقه مخلوط شدند. مخلوط به‌دست آمده دوباره به مدت ۱ ساعت در ۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای داده شده هم زده شد. در نهایت، صفحه‌ی نانوذرات اکسیدروی با سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ به‌دست آمد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شد. جهت بررسی اندازه و پایداری نانوذرات اکسیدروی ابتدا ۱۷ ترکیب مختلف از غلظت استات روی، نسبت هیدروکسیدسدیم به استات روی مختلف و با تغییر در زمان به‌هم خوردن ساخته شدند. ۱ نمونه توسط مدلسازی آماری با استفاده از نرم‌افزار Design Expert انجام شده و محاسبه‌ی تفاوت متغیرها بر اساس طراحی Box Behnken انجام شد. نمونه‌ی ساخته شده جهت مراحل آرایش، بررسی میزان سمیت سلولی و تولید رادیکال ارزیابی گردید. بررسی ساختار بلور نانوذرات اکسیدروی و ارزیابی آرایش آن‌ها با عناصر کمیاب خاکی، توسط الگوی پراش پرتو ایکس محاسبه گردید. عکس نانوذره با میکروسکوپ SEM گرفته شد.



(فرمت‌تاز) براساس دستورالعمل داده شده سنتز شد.

• تکنیک Real-Time PCR برای تعیین بیان ژن‌های مرتبط با بیوفیلم

در حضور نانوذرات اکسیدروی

تکثیر ژن‌های *gacA*, *retS*, *lasR* و *rhIR* با استفاده از روش Real Time-PCR سایر گرین انجام شد. دستورالعمل تهیه مخلوط واکنش به صورت زیر است: ۱۰ میکرولیتر از مخلوط SyberGreen، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر فوروارد و ریورس، و ۵ میکرولیتر cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از آب دیونیزه شده. ژن *tufB* به عنوان یک کنترل داخلی استفاده شد و برنامه‌ی Real-Time PCR بدین ترتیب انجام شد: دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت

۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه دنا تورا سیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، آنیل کردن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، و افزایش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه. پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن *gacA*, *retS*, *lasR* و *rhIR* به عنوان یک کنترل داخلی در جدول ۱ فهرست شده است. سطح بیان نسبی ژن با استفاده از روش بیان نسبی ژن ($\Delta\Delta Ct-2$) با استفاده از معادله‌ی زیر تعیین شد:

$$Ct \text{ target} - Ct \text{ reference} = \Delta Ct$$

$$\Delta\Delta Ct = \text{نمونه آزمایش } \Delta Ct - \text{نمونه کنترل } \Delta Ct$$

بیان ژن نسبی: $\Delta\Delta Ct-2$

جدول ۱: فهرست پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص ژن‌های مؤثر در ایجاد بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا

اندازه (bp)	5'	توالی پرایمر	3'	ژن
۱۸۱	3'-AGGTGCAGCGTGATTAAG -5':Forward		3'-GCATCTTCACGTCCATCAG -5':Revers	<i>gacA</i>
۱۴۳	3'-TCCCTATTTCCGCCAGAC -5':Forward		3'-CCAGCTTGACCACGATTG -5':Revers	<i>retS</i>
۱۳۳	3'-CTGTGGATGCTCAAGGACTAC -5':Forward		3'-AACTGGTCTTGCCGATGG -5':Revers	<i>lasR</i>
۱۴۰	3'-CTGGAAAAGGAAGTGCGG -5':Forward		3'-GTAGTTCTGCATCTGGTATCG -5':Revers	<i>rhIR</i>

از ۱۵۰ نمونه‌ی مورد بررسی، ۷۳ مورد (۴۸/۶۶٪) با توجه به تست‌های بیوشیمیایی و افتراقی سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شدند. تمام ۷۳ سویه‌ی جدا شده از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس به آنتی بیوتیک‌های استفاده شده برای تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی مقاوم بودند که میزان مقاومت برای آنتی بیوتیک‌های تهیه شده از شرکت MAST ۶ میلی متر گزارش شد که شامل آنتی بیوتیک‌های تازوباکتام پیراسیلین، آمیکاسین، جنتامایسین، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین بود و برای آنتی بیوتیک‌های شرکت Rosco که شامل ایمپینم و سفیم بودند ۹ میلی متر گزارش شد.

• نتیجه‌ی سنتز نانوذره اکسیدروی

نانوذره با روش رسوب‌دهی شیمیایی ساخته شد که یون‌های ماده شیمیایی روی، با بار مثبت بر سطح نقره ساخته شده و با سترات با بار منفی از طریق واکنش الکترواستاتیک جذب شده و به طور مستقیم برای تشکیل پوسته‌ی اکسیدروی با هیدروکسید سدیم واکنش داده‌اند. ویژگی نانوذره‌ی اکسیدروی توسط میکروسکوپ SEM ارزیابی گردید که در شکل ۱ نمایش داده شده است.

پرایمرهای مورد نظر با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ طراحی و برای صحت طراحی، توالی Blast گردیدند. سپس توالی تأیید شده به شرکت پیشگام برای ساخت فرستاده شدند. پرایمر به صورت لیوفیلیزه دریافت و برای انجام واکنش مولکولی با رقت ۰/۱ مورد استفاده قرار گرفت.

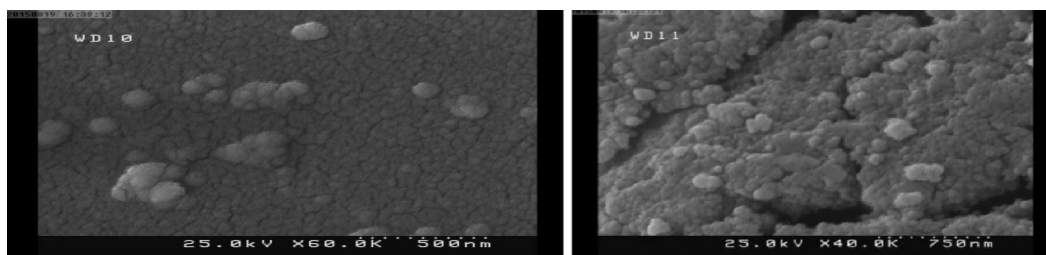
• تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از SPSS ۱۸ نسخه و REST 900 انجام شد. نتایج با استفاده از واریانس ANOVA یک طرفه برای شناسایی تفاوت بین نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده و همچنین تنوع بیان ژن در گروه شاهد و تیمار شده با گروه نانواکسیدروی به دست آمد و مقدار $P < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

• نتایج جداسازی و نتیجه‌ی مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزای

جدا شده از نمونه‌های بالینی



A

B

شکل ۱: آنالیز میکروسکوپ SEM نانواکسیدروی در بزرگ‌نمایی مختلف. توزیع انکسار در بزرگ‌نمایی ۴۰K، شکل A بزرگ‌نمایی ۵۰۰ نانومتر، شکل B بزرگ‌نمایی ۷۴۰ نانومتر

• نتیجه‌ی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک در حضور نانوذره اکسیدروی

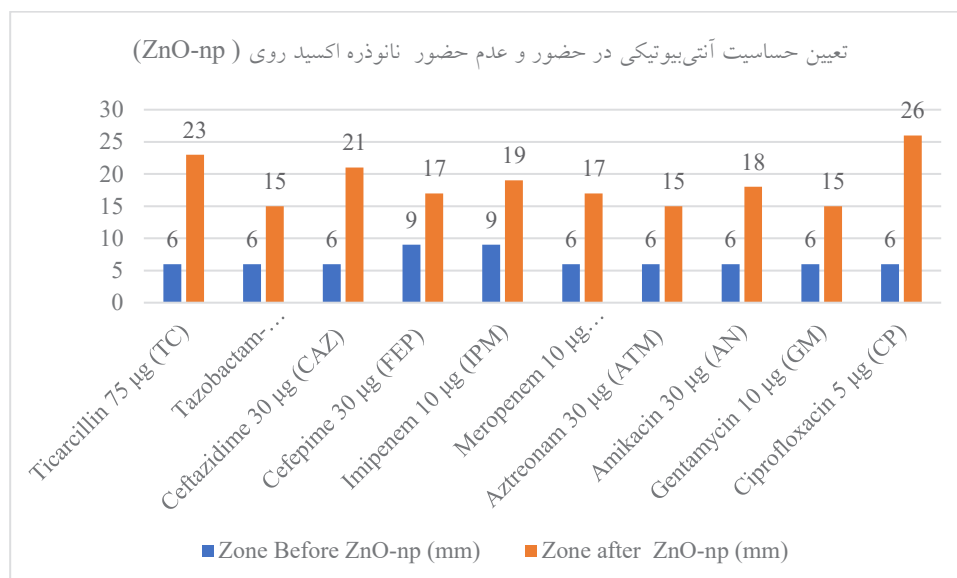
تمامی جدایه‌ها از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس به آنتی‌بیوتیک‌های اعمال شده برای تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی و پس از القای ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذره اکسیدروی مقاوم بودند. کاربرد ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسیدروی، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به جز آمیکاسین که روی آن الگوی مقاومت را به الگوی میانی اعطا کرد، طبق نمودار ۱ بر مابقی روند حساسیت آنتی‌بیوتیکی بود که نشان‌دهنده‌ی تأثیر مثبت نانوذره اکسیدروی بر حساس بودن جدایه به شمار رفت.

طبق شکل ۱، نانوذره سترشده میانگین اندازه حدود 44 ± 4 برآورد شد.

• نتیجه‌ی تعیین میزان مهارکنندگی و باکتری‌کشی نانوذره اکسیدروی

علیه سودوموناس آئروژینوزا

غلظت مختلف نانوذره اکسیدروی بین $3/0 - 40$ میکروگرم/میلی‌لیتر انتخاب گردید تا تأثیر مهارکنندگی آن در مهار رشد باکتری و حذف آن بررسی شود. براساس نتایج به‌دست آمده غلظت ۱۶ و ۲۳ میکروگرم/میلی‌لیتر را به‌ترتیب غلظت مهارکننده MIC و غلظت کشندگی MBC باکتری سودوموناس آئروژینوزا انتخاب گردید.



نمودار ۱: نتایج قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به روش انتشار دیسک در حضور نانوذره اکسیدروی

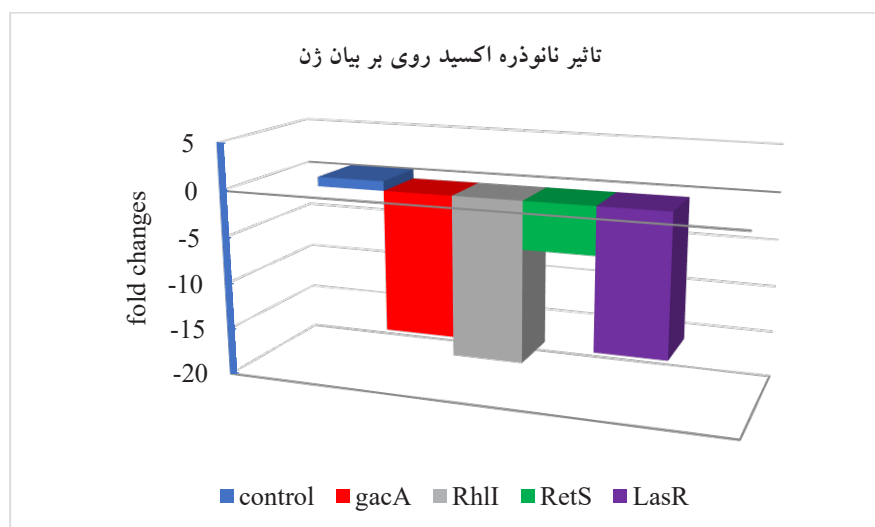
بیان نسبی ژن‌های مربوط به تشکیل بیوفیلم با استفاده از Real-Time PCR کمی ارزیابی شد و با توجه به نتایج به‌دست آمده از Real-Time PCR، میزان بیان ژن‌های تشکیل‌دهنده‌ی بیوفیلم سویه‌های باکتریایی تلقیح‌شده با نانواکسیدروی، نشان داد که نانوذره نانواکسیدروی می‌تواند به‌طور قابل توجهی میزان سطح بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم شامل ژن‌های *retS*، *LasR*، *gacA* و *rhlI* را کاهش دهند

با توجه به نمودار ۱ بیشترین میزان قطر هاله‌ی عدم رشد با افزودن نانوذره به آنتی‌بیوتیک‌ها، مربوط به هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود. برای آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آزترونام و تازوباکتام کمترین میزان قطر هاله‌ی به‌دست آمده مشاهده گردید.

• تأثیر نانوذره اکسیدروی بر بیان ژن‌های مربوط به تشکیل بیوفیلم

بیان ژن های *LasR*, *retS*, *rhII* و *gacA* در نمودار ۲ نشان داده شد و کاهش بیان ژنی در *retS*, *rhII*, *gacA* و *LasR* 15 ($P=0/0002$), *gacA* 15 ($P=0/0001$) و *retS* 5 ($P=0/2$) *rhII* 17 ($P=0/0001$) بود.

نانوذره اکسیدروی می تواند به طور قابل توجهی میزان سطح بیان *gacA*, *rasI* و *rhIR* را کاهش دهند، اگر چه کاهش *retS* بیشتر قابل توجه نبود و نانوذره اکسیدروی اثر مثبت قابل توجهی بر کاهش ژن *retS* نداشت. تغییرات



نمودار ۲: نمودار تأثیر نانوذره اکسیدروی بر بیان ژن های مورد مطالعه

طبق گفته‌ی سازمان غذا و دارو (FDA) به عنوان نانوذره ایمن شناخته شده است (۱۴). در این مطالعه، اثر مثبت نانوذره اکسیدروی بر تشکیل بیوفیلم سویه های سودوموناس آئروژینوزا در بیماران سیستمیک فیبروزیس بررسی گردید. مطالعات قبلی نشان داد که نانوذرات فلزی به ویژه، نانواکسیدروی، می تواند به عنوان یک عامل ضدباکتری برای عفونت های بیمارستانی استفاده شود که در آن اکثر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به نانواکسیدروی حساس بودند (۱۵). نتیجه ی مطالعه ی حاضر داده های جدیدی را در مورد اثر نانواکسیدروی بر خواص تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در بیماران سیستمیک فیبروزیس ارائه می دهد. مطالعات قبلی عمدتاً بر روی وضعیت پلانکتونیک باکتری هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا متمرکز بودند و اطلاعات کمتری در مورد رابطه ی بین نانواکسیدروی و تشکیل بیوفیلم وجود داشت (۱۶ و ۱۷). یک مطالعه بر روی تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی نشان داد که بیش از ۵۰ درصد جدایه ها به آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند و اکثریت آن ها به آنتی بیوتیک های پپراسیلین - تازوباکتام حساس بودند. تنها ۲۵ درصد از سویه ها توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند که با الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ارتباطی نداشت (۱۸). ولدبیگی و همکاران توانایی تشکیل بیوفیلم سویه های جدا شده از عفونت های سوختگی و ریوی را در مطالعه ی خود نشان دادند (۱۹). در مطالعه ی حاضر، تمام جدایه ها به آنتی بیوتیک های

همان گونه که در نمودار ۲ مشخص است، تمامی ژن ها در حضور نانوذره اکسیدروی دارای تفاوت های کاهشی در سطح بیانشان بودند و نشان داد که نانوذره اکسیدروی به میزان زیادی می تواند دارای اثر کاهشی معنادار بر بیان ژن شود.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری فرصت طلب است و توانایی کلونیزه شدن در سطوح مختلف و انسان را دارد. سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عفونت بیمارستانی با پیش آگهی ضعیف به ویژه در بیماران نقص ایمنی در نظر گرفته می شود (۱۱). مشخصه ی اصلی عفونت باکتریایی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا خاصیت مقاومت آنتی بیوتیکی است که می تواند در شرایط محیطی مختلف در شرایط نامناسب با تشکیل بیوفیلم رشد کند (۱۲). علاوه بر این، سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن مهم و اصلی در سیستم تنفسی بوده که منجر به عفونت ریه و افزایش میزان مرگ و میر در بیماران با نقص ایمنی می شود (۱۳). بنابراین استفاده از عوامل ضد میکروبی جدیدی که بتواند بر خاصیت مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری غلبه کند و توانایی ریشه کن کردن عفونت را داشته باشد، یکی از موضوعات مهم و داغ در حیطه ی پزشکی محسوب می شود. در حال حاضر نانو تکنولوژی به دلیل نقش بالقوه ی آن در درمان عفونت های انسانی مورد توجه قرار گرفته است. در میان نانوذرات کاربردی، نانواکسیدروی

retS و *gacA* در حضور نانوذره اکسیدروی می باشد که می تواند به عنوان یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان عفونت مزمن *سودوموناس آئروژینوزا* به ویژه در بیماران دچار نقص ایمنی مانند سیستمیک فیبروزیس معرفی شود.

نتیجه گیری

مطالعه ای حاضر با هدف بررسی اثر نانوذره اکسیدروی بر خواص تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس انجام شد. نتیجه ای مطالعه نشان دهنده ای کارایی نانو اکسیدروی بر کاهش ژن های کروم سنسینگ از جمله *lasR* و *rhlR*، ژن های تشکیل دهنده ای بیوفیلم و فاکتورهای بیماریزایی باکتریایی است. تجویز نانوذره اکسیدروی در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس که از عفونت ریه ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* رنج می برند، میزان مرگ و میر را در بیماران سیستمیک فیبروزیس کاهش می دهد و می تواند به عنوان استراتژی های درمانی و پیشگیری استفاده شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر بخشی از پایان نامه مقطع دکتری و عنوان «بررسی اثر نانو اکسیدروی بر روی بیوفیلم، بیان ژن های ویرولانس و با جایگزین و شوئد تایپینگ مولکولی به روش MLVA ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو جدا شده از بیماران سیستمیک فیبروزیس در بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران» و مصوب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1401.272 می باشد. نویسندگان این مقاله از دکتر علی هاشمی از دانشکده پزشکی شهید بهشتی بابت در اختیار دادن برخی سوش های استاندارد و همچنین واحد توسعه تحقیقات بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران بابت همکاری در اجرای این پروژه قدردانی و تشکر می نمایند.

منتخب از جمله پپراسیلین تازوباکتام مقاوم بودند و توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند که نشان دهنده ای شدت عفونت در بیماران سیستمیک فیبروزیس نسبت به بیماران سوختگی است.

علاوه بر این، نتایج این مطالعه اثر نانوذره اکسیدروی بر بیان ژن های تشکیل دهنده ای بیوفیلم مانند ژن های کروم سنسینگ شامل *retS* و *rhlI*، *gacA*، را نشان داد. ژن ها در تغییر فاز متحرک باکتری ها به وضعیت تشکیل بیوفیلم نقش مهمی دارند. ژن های فوق در حضور نانوذره اکسیدروی دارای کاهش قابل قبول در بیان سطح ژنی بودند که میزان بیان ژن *gacA* و *lasR* در حضور نانوذره اکسیدروی حدود ۱۵ برابر و برای ژن *rhlI* حدود ۱۷ برابر و برای ژن *retS* ۵ برابر کاهش نشان داد ($P < 0.001$). صالح و همکاران نیز نتایج مشابهی را در مورد کاهش قابل توجه ژن های *pqsA*، *rhlR*، *rhlI*، *lasR*، *lasI* و *pqsR* را در حضور نانوذره اکسیدروی گزارش کردند (۲۰). ژن *retS* یک حسگر ترکیبی است که در عفونت حاد بیان می شود و بیان ژن های مسئول تشکیل بیوفیلم و ژن های کروم سنسینگ را در عفونت مزمن *سودوموناس آئروژینوزا* افزایش می دهد (۲۱). علاوه بر این، ژن *gacA* یک پروتئین بسیار حفاظت شده برای تولید آگروزیم ها و متابولیت های ثانویه در *سودوموناس آئروژینوزا* تولید می کند که به طور مثبت بیان ژن های *lasR* و *rhlR* را تنظیم می کند (۲۲). باید در نظر گرفته شود که غلظت های خاص نانوذرات روی دارای خواص ضد باکتریایی هستند، در نتیجه رشد باکتری ها و تشکیل بیوفیلم را مهار می کنند. از آن جا که *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری موجود در همه جا است باید به درک برهمکنش این باکتری که زمینه ساز اثر قرار گرفتن این باکتری در معرض نانوذرات فلزی با دوز کم در محیط است نیز توجه شود (۲۳). با بررسی های انجام شده، مشخص شد که هیچ مطالعه ای در رابطه با اثر نانو اکسیدروی بر بیان ژن *retS* و *gacA* وجود ندارد و این اولین گزارش در مورد کاهش تنظیم ۵ و ۱۵ برابری ژن های

References

1. Wu M & Li X. Chapter 87-*Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, in book: Molecular medical microbiology. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2015: 1547-64.
2. Moradali MF, Ghods S & Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2017; 7(39): 1-29.
3. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011-2014. Infection Control and Hospital Epidemiology 2016; 37(11): 1288-301.

4. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S & Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. BMC Pulmonary Medicine 2016; 16(174): 1-22.
5. Tuon FF, Dantas LR, Suss PH & Tasca-Ribeiro VS. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: A review. Pathogens 2022; 11(300): 1-19.
6. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. FEMS Microbiology Reviews 2006; 30(2): 274-91.
7. Agha-Mohammadi A, Keivanfar M, Navaei S, Shirzadi R, Masiha F, Allameh Z, et al. First cystic fibrosis patient registry annual data report-cystic fibrosis foundation of Iran. Acta Medica Iranica 2019; 57(1): 33-41.
8. Reyne N, Mc-Carron A, Cmielewski P, Parsons D & Donnelley M. To bead or not to bead: A review of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection models for cystic fibrosis. Frontiers in Physiology 2023; 2023(1104856): 1-13.
9. Rasha E, Al-Khulaifi MM, Al-Othman M, Khalid I, Doaa E, Alaa K, et al. Effects of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Aspergillus niger* on Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumonia* in vitro and in vivo. Fronters in Cellalaraad Infection Micobiology 2021; 11(748739): 1-11.
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. Available at: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints. 2019.
11. Lewenza S, Falsafi RK, Winsor G, Gooderham WJ, Mc-Phee JB, Brinkman FSL, et al. Construction of a mini-Tn5-luxCDABE mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: A tool for identifying differentially regulated genes. Genome Research 2005; 15(4): 583-9.
12. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S & Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents 2010; 35(4): 322-32.
13. Hassett DJ, Korfhagen TR, Irvin RT, Schurr MJ, Sauer K, Lau GW, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: Insights into pathogenic processes and treatment strategies. Expert Opinion on Therapeutic Targets 2010; 14(2): 117-30.
14. Espitia PJP, Soares NFF, Coimbra JSR, De-Andrade NJ, Cruz RS & Medeiros EAA. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. Food and Bioprocess Technology 2012; 5(1): 1447-64.
15. 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): 92-184.
16. Banoe M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballegh A, et al. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 2010; 93(2): 557-61.
17. Feris K, Otto C, Tinker J, Wingett D, Punnoose A, Thurber A, et al. Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Langmuir Journal - ACS Publications 2010; 26(6): 4429-36.
18. Kunwar A, Shrestha P, Shrestha S, Thapa S, Shrestha S & Amatya NM. Detection of biofilm formation among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Burns Open 2021; 5(3): 125-9.
19. Valadbeigi H, Sadeghifard N, Kaviar VH, Haddadi MH, Ghafourian S & Maleki A. Effect of ZnO nanoparticles on biofilm formation and gene expression of the toxin-antitoxin system in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2023; 22(89): 1-8.

20. Saleh MM, Sadeq RA, Latif HKA, Abbas HA & Askoura M. Zinc oxide nanoparticles inhibits quorum sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. African Health Sciences 2019; 19(2): 2043-55.
21. Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS & Lory S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. Developmental Cell 2004; 7(5): 745-54.
22. Chieda Y, Iiyama K, Yasunaga-Aoki C, Lee JM, Kusakabe T & Shimizu S. Pathogenicity of gacA mutant of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 in the silkworm, Bombyx mori. FEMS Microbiology Letters 2005; 244(1): 181-6.
23. Al-Momani H, Aolymat I, Ibrahim L, Albalawi H, Al Balawi DA, Albiss BA, et al. Low-dose zinc oxide nanoparticles trigger the growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*: A hormetic response. BMC Microbiology 2024; 24(290): 1-17.

The Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Expression of Genes Involved in the Production of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Isolated from Cystic Fibrosis Patients

Mona Konkuri¹ (M.S.), Yousef Erfani^{2*} (Ph.D.), Sharmin Kharrazi³ (Ph.D.),
Setareh Haghighat^{4*} (Ph.D.)

1 PhD. Candidate in Microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 Associate Professor, Department of Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Associate Professor, Department of Medical Nanotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Associate Professor, Department of Microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Received: 21 Oct. 2024

Accepted: 29 Dec. 2024

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic pathogen that is often found in patients with cystic fibrosis, burn wounds, immunodeficiency, and chronic obstructive pulmonary disorder. In addition, *P. aeruginosa* is also considered one of the most important pathogens causing hospital infections, widely found in medical devices (ventilation), because they tend to grow on moist surfaces. Considering the importance of cystic fibrosis treatment and the ability of *P. aeruginosa* to form biofilms, this study examines the effect of nano zinc oxide particle on the expression of genes associated in biofilm formation in isolated *P. aeruginosa* from cystic fibrosis patients.

Materials and Methods: Sputum and throat samples from 150 patients with cystic fibrosis were cultured on MacConkey agar culture medium. After an overnight incubation, the grown colonies were determined and confirmed by biochemical tests. An antibiotic sensitivity test by disk diffusion method (Kirby –bauer) were used to determine the antibiotic susceptibility pattern. Zinc nanoparticles were synthesized following established protocols and evaluated using scanning electron microscopy (SEM). The multi-antibiotic-resistant strains were inoculated with 16 µg/ml of 2 nm ZnO nanoparticles and inhibition zone were measured. The impact of these nanoparticles on the expression levels of *gacA*, *retS*, *lasR*, and *rhlR* genes was assessed using Real-Time PCR. The relative gene expression level was determined using the gene expression method: ($\Delta\Delta Ct-2$).

Results: Of the total 150 samples, 73 (48.66%) isolates were identified as *P. aeruginosa*. All *P. aeruginosa* isolates were resistant to selected antibiotics. SEM evaluation indicated that the synthesized nanoparticles had an average size of approximately 4 ± 0.44 nm. The results from the Real-Time PCR tests showed a decrease in the expression of the *gacA*, *retS*, *lasR*, and *rhlR* genes in the presence of the zinc nanoparticles in *P. aeruginosa* strains. The most significant reduction in gene expression was observed for the *rhlR* gene, whereas the least reduction was noted for the *retS* gene.

Conclusion: The use of nano zinc oxide can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* infection by preventing biofilm formation and providing better treatment results for cystic fibrosis patients with lung infection.

Keywords: *Pseudomonas Aeruginosa*, Biofilm, Zinc Oxide, Nanoparticles, Real-Time PCR, Gene Expression

* Corresponding Authors:

Erfani Y
Haghighat S

Emails:
y Erfani@tums.ac.ir
haghighat.s@iau.ac.ir