

بررسی اثر فنوتیپی و ژنوتیپی اسانس الکی مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس بر بیان ژن آلكالین 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 زرنندی^۱، فروغ مریدی کیا^۱

^۱ گروه میکروبیشناسی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، 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 و پاتوژن فرصت طلب بوده که در بیماران با نقص سیستم ایمنی مرگ و میر بالایی ایجاد می‌کند. عمده فعالیت ضد میکروبی 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 الکی مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس بر بیان ژن آلكالین پروتئاز *پسودوموناس آئروژینوزا* بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه نیمه تجربی که در سال ۱۳۹۳ انجام شد، سویه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* از بیماران سوختگی در اهواز جداسازی شد و از طریق تست‌های استاندارد میکروبیشناسی 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 مهار (MIC) اسانس و نانوکمپلکس علیه سویه‌های به دست آمد. پس از مواجهه با غلظت MIC، تغییرات بیان ژن آلكالین پروتئاز به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. درصد حیات سویه‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف اسانس و نانوکمپلکس با روش MTT ASSAY تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری کروسکال والیس و تست تعقیبی شفه، فیشر، آنالیز واریانس و کولموگروف اسمیرنوف تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان MIC اسانس برای سویه استاندارد و بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۸ و ۴ 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 مهارتی علیه بیان ژن آلكالین 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 آلكالین پروتئاز دارد.

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

نویسنده مسئول: سید عبدالمجید خسروانی، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروبیشناسی

Email: khosravani2us@yahoo.com

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، سیستمیک فیبروزیس، سوختگی و غیره، عفونت‌های کشنده‌ای ایجاد کند (۱-۳). این باکتری دارای عوامل ویروانس متنوعی مانند؛ انواع پروتئازها، آگزوتوکسین‌ها، 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 (۴ و ۵). 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. آکالین 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 و یا 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)^(۱) در پستانداران و

FLS2^(۲) در گیاهان) را مختل می‌کند. AprD از فاگوسیته شدن و کشته شدن باکتری پسودوموناس آئروژینوزا به وسیله نوتروفیل‌های انسانی جلوگیری می‌کند (۶ و ۷).

عصر نانو تکنولوژی عصر دیگری از علوم است و تلفیقی از مهندسی و زیست‌شناسی، 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 میکروب‌ها، تشخیص و درمان بیماری‌ها 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 طولانی‌تر می‌کند این گیاه و ترکیبات آن موضوع تحقیق چندین محقق بوده است و فعالیت ضد میکروبی 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

نگهداری شد. در این روش اسانس گیاه با استفاده از بخار آب و بدون تماس زیاد گیاه با رطوبت، از بافت آن استخراج می‌شود و در دمای کم تر از ۵ درجه سانتی‌گراد 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، 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 5×10^5 کلونی بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

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

و/شریشیا 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 (۹ و ۱۰).

به دلیل مقاومت دارویی بالای *پسودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، هدف این تحقیق بررسی اثر عوامل ضد میکروبی 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 میکروبی‌شناسی 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 PA01 به عنوان کنترل مثبت جهت کنترل شرایط انجام آزمایش استفاده شد (۱۰).

اسانس الکی مرزه خوزستانی با روش تقطیر در بخار آب به وسیله دستگاه کلونجر تهیه شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد

$$100 \times (a/b) = \text{درصد حیات}$$

2X: جذب نوری چاهک تیمار شده - بلانک

b: جذب نوری کنترل شده - بلانک

انتخاب قطعات ژنی و طراحی پرایم‌های

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 ضد میکروبی مورد مطالعه و همچنین در عدم

حضور مواد ضد میکروبی 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 اسمیرنوف تجزیه و تحلیل شدند.

یک چاهک به عنوان کنترل مثبت بدون اساس

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 در ۳۷ 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

رنگ MTT 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 (۱۲ و ۱۳).

جدول ۱: توالی پرایمر DNA gyrase A و AprD

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

جدول ۲: مواد مورد نیاز واکنش PCR

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

جدول ۳: شرایط انجام واکنش PCR

مرحله	برنامه	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد سیکل
Primary Denaturation	۱	۹۵	۱ دقیقه	۱
Denaturation	۲	۹۵	۳۰ ثانیه	۲۵
Annealing	۲	۵۴	۳۰ ثانیه	۲۵
Extention	۲	۷۲	۳۰ ثانیه	۲۵
Final Extention	۳	۷۲	۷ دقیقه	۱

یافته‌ها

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 مرز خوزستانی و نانوکمپلکس مس بوده در صورتی که بیان ژن *gyrA* قبل و بعد از تیمار تفاوتی نداشته است.

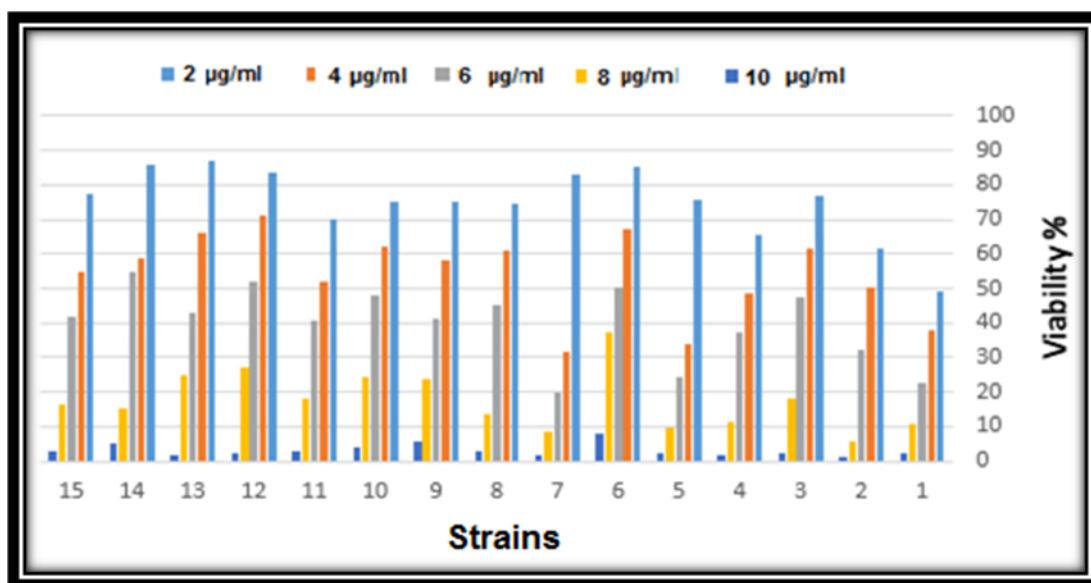
در این مطالعه، سویه استاندارد *PAO1* و ۱۴ سویه بالینی جدا شده از بیماران سوختگی تحت بررسی و تیمار قرار گرفتند.

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

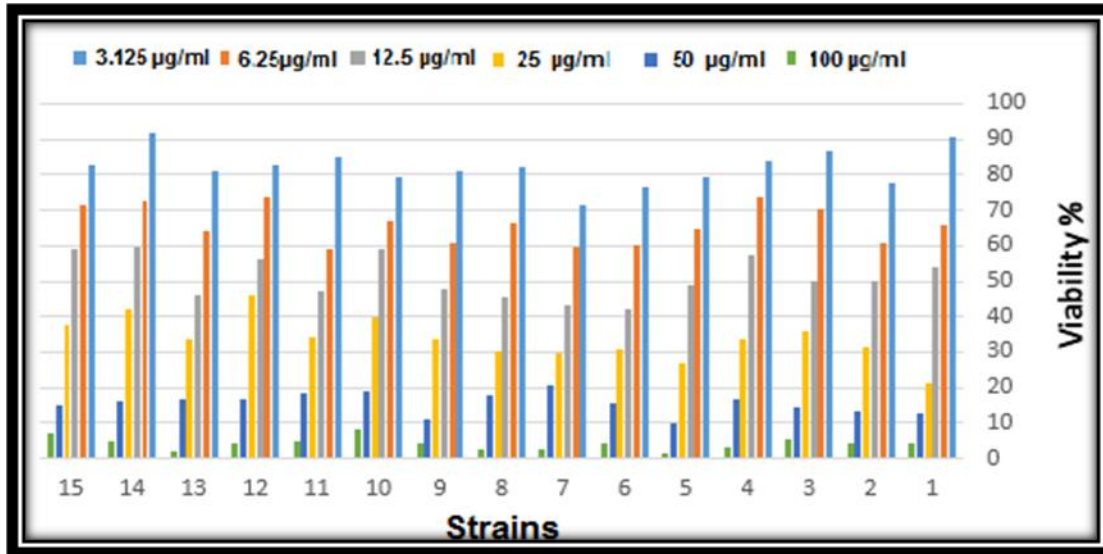
نمودار ۱ و ۲ به ترتیب نتایج حاصل از میزان درصد حیات سویه‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف اسانس مرز خوزستانی و

جدول ۴: حداقل غلظت مهارتی تیمارهای مطالعه در سویه‌های پseudomonas آئروژینوزا

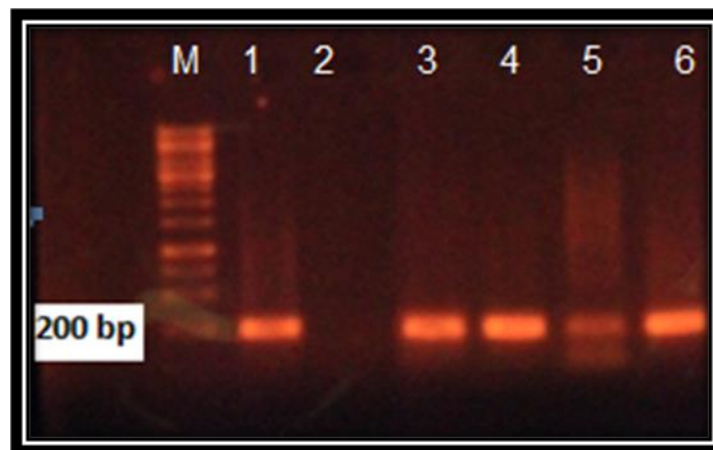
نوع مداخله	اسانس مرزه خوزستانی (میکروگرم بر میلی لیتر)	نانوکمپلکس مس (میکروگرم بر میلی لیتر)
سویه استاندارد	۴	۲۵
سویه بالینی ۱	۸	۵۰
سویه بالینی ۲	۸	۵۰
سویه بالینی ۳	۸	۵۰
سویه بالینی ۴	۴	۲۵
سویه بالینی ۵	۸	۵۰
سویه بالینی ۶	۴	۵۰
سویه بالینی ۷	۸	۵۰
سویه بالینی ۸	۸	۵۰
سویه بالینی ۹	۸	۵۰
سویه بالینی ۱۰	۸	۵۰
سویه بالینی ۱۱	۸	۵۰
سویه بالینی ۱۲	۸	۵۰
سویه بالینی ۱۳	۸	۵۰
سویه بالینی ۱۴	۸	۵۰



نمودار ۱: درصد حیات سویه‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف اسانس مرزه خوزستانی



نمودار ۲: درصد حیات سویه‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف نانو کمپلکس مس



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

بحث

سوختگی ایجاد شده به وسیله باکتری‌های گرم منفی هوازی نظیر *اسیتوباکتر* 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

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، سیستمیک فیبروزیس، سوختگی و غیره، عفونت‌های کشنده‌ای ایجاد کند (۳). از سال ۱۹۷۰ به بعد عفونت‌های بیمارستانی از جمله عفونت زخم

خاصیت چربی دوستی آنها مربوط است. کارواکرول یکی از مهم‌ترین ترکیب‌های 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 مهار بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد.

پژوهش‌های مختلفی در مورد اثرات ضد میکروارگانیزی 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 مهار 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 - ۲۸ میکروگرم بر میلی‌مول متغیر بوده است (۱۶).

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

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 مهار 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 آلكالین پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت که نشان می‌دهد اسانس مرزه خوزستانی و نانوکمپلکس مس دارای خاصیت مهار بر ژن آلكالین پروتئاز در سویه‌های 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

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

اکالین و اینسیسواثر کارواکرویل را بر روی سلول سرطانی H-RAS و N-RAS بررسی نمودند که نتایج نشان داد کارواکرویل 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 ویروالانس *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 ضد عفونی 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 مهارتی قابل توجهی بر بیان ژن آکالین پروتئاز در باکتری‌های مورد مطالعه دارند، لذا با مطالعه این مواد روی سایر

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 مهارتی 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 مهارتی ۶۲۵، ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی سیلیوم* بوده است (۱۹).

جالوندی و همکاران مشخص کردند که کارواکرویل با MIC=۰/۵ میکرو مول بر میلی‌لیتر دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. همچنین ثابت کردند که این اسانس علیه ژن‌های *mexA* و *mexR* *پسودوموناس آئروژینوزا* دارای خاصیت مهارتی می‌باشد (۲۰).

اسماعیلی و همکاران در تحقیقی با روش Real time PCR به بررسی اثر مهارتی اسانس مرزه خوزستانی بر روی بیان ژن مرتبط با بیوفیلیم *اسیتوباکتریومانی* (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).

ژن‌های ویرو لانس پسونوموناس 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 میکروشناسی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و گروه میکروشناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) به دلیل حمایت مالی و همکاری در اجرای این پروژه قدردانی می‌شود.

REFRENSSES

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, Dorodiyani 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 khuzestanica* 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 khuzestanica* 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. Yalcin 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 of *pseudomonas aeruginosa* by RT-PCR. *International Journal of Biotechnology* 2015 ;4(1): 1-8.
21. Burt SA, Vlieland 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.

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 R¹, Khosravani SA^{1*}, Sharifi A¹, Eilami O¹, Khorram rooz SS¹, Mollaqaqah Zarandi M², Meridi Kia F¹
¹Department of Microbiology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ²Iran, 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, Khorram rooz SS, Mollaqaqah 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