گزارش کوتاه

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۱۱، آبان ۱۳۹۶، صفحه ۴۹-۴۲

تغییر بیان ژن *mexB* در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به سیپروفلوکساسین تحت تیمار با سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات

زهرا احمدی رودبارکی (BSc)[۱]، نجمه رنجی (PhD)[۱*]، بهرام سلطانی تهرانی (PhD)[۲]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی
۲-مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

دریافت: ۹۶/۲/۱۰، اصلاح: ۹۶/۶/۱۴، پذیرش: ۹۶/۶/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: سیلیبینین (سیلیبین) یک ترکیب فعال سیلیمارین با فعالیت‌های ضدباکتریایی است. در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به سیپروفلوکساسین افزایش بیان ژن *mexB* گزارش شده است. هدف از این مطالعه، ارزیابی بیان ژن *mexB* در جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* تیمار شده و تیمار نشده با سیلیبینین بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، جدایه های *سودوموناس آئروژینوزا* از بیمارستان ها و آزمایشگاههای استان گیلان تهیه شد. بعد از تعیین حساسیت به چند آنتی بیوتیک (دیسک دیفیوژن و MIC)، ۵ جدایه *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (MIC ۱/۲) به تنهایی (گروه ۱) و در ترکیب با سیلیبینین انکپسوله در میسل (نانوذرات) (گروه ۲) قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، استخراج RNA و سنتز cDNA در گروه ۱ و ۲ صورت گرفت و بیان ژن *mexB* به روش Realtime-PCR کمی (Q-RT-PCR) و معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۶۹ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا*، ۳۳/۳۳٪ به روش دیسک دیفیوژن و ۳۷/۶۸٪ به روش MIC مقاوم به سیپروفلوکساسین تشخیص داده شدند. نتایج نشان داد که سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات (۴۰۰µg/ml)، مرگ را در جدایه‌های مقاوم تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (MIC ۱/۲) تا ۵۰٪ القاء می‌کند. در سلولهای تحت تیمار با سیلیبینین و سیپروفلوکساسین کاهش بیان ژن *mexB* در مقایسه با سلولهای تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی آشکار شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد سیلیبینین از طریق کاهش بیان ژنهای درگیر در سیستم های افلاکس پمپ نظیر mexB باعث افزایش تأثیر سیپروفلوکساسین در مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا شود.

واژه‌های کلیدی: سیپروفلوکساسین، *mexB*، نانوذرات، سودوموناس آئروژینوزا، سیلیبین.

مقدمه

سیلیبینین (سیلیبین) یک فلاونوئید پلی‌فنلی و ترکیب فعال سیلیمارین است که از گیاه خار مریم (Silybum marianum) بدست می‌آید. سیلیمارین از چندین ترکیب شامل سیلیبینین(سیلیبین)، ایزوسیلیبین، سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین می‌باشند(۱). سیلیبینین به عنوان آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و محافظت کننده کبد شناخته شده (۲) و در مطالعات مختلف خواص ضدسرطانی آن تأیید شده است (۳). همچنین خواص ضدباکتریایی آن در چند سال اخیر در مطالعات گزارش شده است (۴و۵). سودوموناي آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که بخاطر مقاومت ذاتی و اکتسابی به طیف گسترده‌ای از آنتی بیوتیکها از جمله فلوروکوئینولونها تهدیدی برای مراقبتهای پزشکی محسوب می‌شود(۶). استفاده خودسرانه آنتی بیوتیکها در افراد با نقص سیستم ایمنی همچون سوختگیهای شدید در درمان سودوموناس آئروژینوزا مشکل ساز شده است(۷) و لازم است راهکارهای جدید برای مقابله با این گروه از عوامل بیماریزا درنظر گرفته شود. استفاده از فلوروکوئینولونهایی چون سیپروفلوکساسین در درمان اشتباه عفونتهای مقاوم به این دارو می تواند باعث عدم پاسخ به دیگر آنتی بیوتیکها از جمله ایمی پنم(۸) (بخاطر شباهت در بعضی مکانیسمهای ایجادکننده مقاومت) شود. لزوم استفاده از داروهای مناسب از مهمترین مسائل درمان عفونت‌های با خطر مرگ چون سوختگیهای شدید و سرطانها می‌باشد. در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو مکانیسم‌های مختلفی چون افزایش بیان ژنهای افلاکس پمپ، تغییر ساختار آنزیم‌های هدف این داروها و انتقال افقی ژنهای بتالاکتامازها نقش ایفا می‌کنند(۷). پمپ‌های افلاکس با خروج داروها، رنگ‌ها، شوینده‌ها و سموم باعث بقای باکتری می‌شوند (۹). از جمله مهمترین سیستم‌های پمپ افلاکس می‌توان به سیستم MexAB-oprM اشاره نمود که در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در سودوموناس آئروژینوزا نقش دارد(۱۰). جهش در ژنهای تنظیم کننده بیان سیستم های پمپ افلاکس باعث افزایش بیان این ژنها (۱۱) و در نتیجه خروج بیشتر دارو از سلول و نیاز به غلظت بالاتر دارو برای اثربخشی و کشندگی باکتری می‌شود. از جمله راهکارهای دارویی جدید، استفاده از داروهای گیاهی در درمان عفونتها می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن MexB از سیستم افلاکس MexAB-oprM در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین تحت تیمار با سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات میسلی حاوی سیلیبینین و سیپروفلوکساسین به روش کمی realtime-PCR می باشد.

▣ این مقاله حاصل پایان نامه زهرا احمدی رودبارکی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر نجمه رنجی
آدرس: رشت، پل تالشان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی. تلفن: ۰۱۳-۳۳۴۲۴۰۸۰
E-mail:najmehranji@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه های سودوموناس آئروژینوزا: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، در بازه زمانی ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ تعداد ۲۰۰ جدایه مشکوک به سودوموناس‌آئروژینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی شامل نمونه های سوختگی، نکروز بافتی، ادراری و ترشحات تنفسی از بیمارستانهای ولایت، آریا، قائم و رازی رشت و آزمایشگاههای مهر و رازی لاهیجان جمع آوری گردید. برای تشخیص سودوموناس آئروژینوزا نمونه‌ها در محیط مولرهینتون‌آگار (Quelab، کانادا) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. سپس شناسایی باکتری‌ها براساس مورفولوژی کلنی (میله ای شکل بودن) زیر میکروسکوپ، رنگ آمیزی گرم، تشکیل رنگدانه سبز رنگ در محیط کشت مولرهینتون‌آگار، مثبت بودن تست اکسیداز و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد بر روی آگار مغذی انجام گرفت.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: مقاومت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک، با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی آمیکاسین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg) و سیپروفلوکساسین (۵µg)، (HiMedia هند) صورت گرفت. بعد از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک: برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC=Minimum Inhibitory Concentration) از روش براث دایلوشن استفاده شد. رقت باکتری به میزان ۰/۵ مک فارلند تهیه و به همراه رقت‌های متوالی سیپروفلوکساسین (۲۰۰ mg/۲۰ml) (شرکت روناک دارو، ایران) در محدوده غلظت µg/ml ۱- ۲۰۴۸ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. اولین لوله‌ای که کدورت قابل مشاهده‌ای نداشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تهیه سیلیبینین محبوس شده در نانوذرات میسلی: در این تحقیق نانو ذرات میسلی (ترکیب اولئیک اسید و پلی اتیلن گلایکول در ابعاد نانو) توسط گروه تحقیقاتی تهیه و از نظر آزمایش‌های استاندارد بررسی گردید. سپس پودر سیلیبینین (Sigma aldrich، آلمان) در آن تعبیه شد (۱۲).

تیمار جدایه های سودوموناس آئروژینوزا با سیلیبینین و سیپروفلوکساسین: برای بررسی اثر ضدباکتریایی سیلیبینین، چندین جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی (نمونه کنترل) و یا در ترکیب با سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات میسلی (نمونه تست) قرار گرفت. هدف از این کار بررسی اثر سیلیبینین بر کاهش مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه های مقاوم به این دارو بود. به علت اینکه غلظت MIC سیپروفلوکساسین مربوط به هر نمونه توان مهارکنندگی رشد را داشت برای بررسی اثر سیلیبینین بر مهار رشد باکتریها، از یک غلظت پایینتر از MIC دارو (۱/۲MIC) به همراه سیلیبینین استفاده شد. باکتری ها توان رشد در ۱/۲MIC را دارند اما با حضور سیلیبین انتظار می رفت در این غلظت سیپروفلوکساسین، مهار رشد و مرگ باکتریها رخ دهد. به این منظور، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$)، سیپروفلوکساسین و سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات میسلی با غلظتهای (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به چاهک‌ها اضافه و در انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. برای اطمینان از اثر کشندگی سیلیبینین حداقل غلظت باکتری‌کشی دارو (MBC= minimum bactericidal concentration) تعیین گردید.

به این منظور ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه تیمار شده در لوله، به محیط مولر هینتون آگار منتقل و کشت چمنی داده شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه های تیمار شده با سیپروفلوکساسین به تنهایی و یا در ترکیب با سیلیبینین از نظر تشکیل میزان کلونی‌ها در محیط کشت آگار مورد بررسی قرار گرفت. هر تیمار دارویی حداقل دوبار تکرار گردید.

استخراج RNA: استخراج RNA از جدایه‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین (MIC ۱/۲) و غلظت مؤثر نانو ذرات میسلی حاوی سیلیبینین (نمونه تست) و جدایه‌های تیمار نشده با سیلیبین (تحت تیمار با غلظت ۱/۲MIC سیپروفلوکساسین به عنوان نمونه کنترل) بعد از ۲۴ ساعت به کمک کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما، ایران) زیر هود لامینار کلاس II و در شرایط استریل صورت گرفت. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده از نانودراپ ۲۰۰۰c (امریکا) استفاده شد.

سنتز cDNA و بررسی بیان ژن MexB به روش Q-RT-PCR: جهت سنتز cDNA از RNA های استخراج شده از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) استفاده شد. به این منظور RNA، اولیگو dT و آب RNase free با هم مخلوط شده، بـه مـدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار داده شد. سپس آنزیم و دیگر اجزای واکنش به مخلوط اضافه شده و در دمای ۴۲°C (بـرای انجـام واکـنش) بـه مـدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۷۰°C بـه مـدت ۱۰ دقیقـه (بـرای غیرفعالسازی آنـزیم RT) در دستگاه ترموسایکلر Analaytik Jena (آلمان) قرار داده شد. بعد از سنتز cDNA، واکنش Q-RT-PCR به کمک کیت SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa، ژاپن) در دستگاه ABI StepOne (امریکا) صورت گرفت. برنامه دمایی واکنش Q-RT-PCR به ترتیب شامل این موارد بود: مرحله واسرشت شده ابتدایی (۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه) و ۴۰ سیکل شامل ۹۵ °C به مدت ۵ ثانیه و ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه. از ژن *Rpsl* به عنوان ژن رفرنس استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده (جدول ۱) توسط شرکت Bioneer کره جنوبی سنتز گردید. آنالیز بیان ژن ها به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت.

آزمون آماری: برای بررسی میزان مقاومت به داروها و توزیع موضع عفونت از آزمون χ^2 استفاده شد. همچنین جهت آنالیز نتایج realtime PCR از آزمون T-test برای مقایسه اختلاف بین دو گروه مورد مطالعه استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار درنظر گرفته شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR	رفرنس
mexB	F	5'- GTGTTCGGCTCGCAGTACTC -3'	۲۴۴Bp	(۱۳)
mexB	R	5'- AACCGTCGGGATTGACCTTG -3'		
Rpsl	F	5'- GCTGCAAAACTGCCCGCAAC-3'	۲۴۹Bp	این مطالعه
Rpsl	R	5'- CCCGAGGTGTCCAGCGAACC-3'		

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]

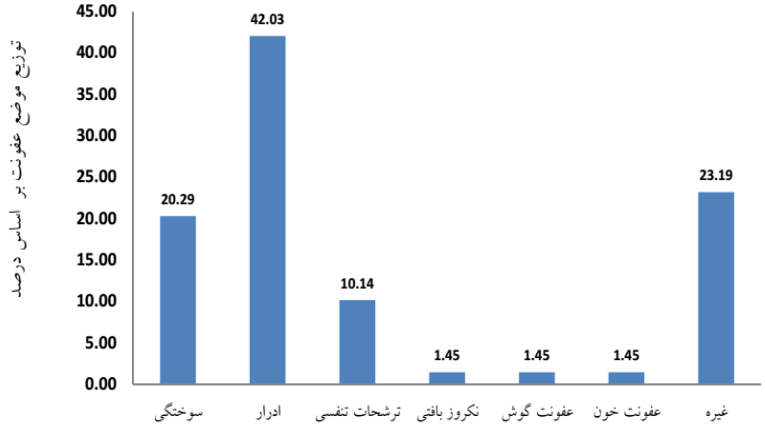
یافته‌ها

در این تحقیق از ۲۰۰ نمونه مشکوک، ۶۹ جدایه سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شد ک بیشترین موارد به ترتیب مربوط به نمونه‌های سوختگی (۲۰/۲۹٪) و نمونه های ادراری (۴۲/۰۳٪) بود (نمودار ۱). نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت این باکتری نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک نشان داد که تفاوت معنی دار ($p<0/05$) از نظر فراوانی بین نمونه‌های مقاوم (۴۰٪>)، حساس وابسته به دوز(۱۰٪>) و حساس (۶۰٪>) مشاهده گردید (جدول ۲). در این آزمون کمتر از ۴۰٪ نمونه‌ها به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و یا آمیکاسین مقاوم بودند. حدود ۳۳/۳۳ درصد نمونه‌ها به روش دیسک دیفیوژن به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند (جدول۲).

در حالیکه نتایج MIC نشان داد که ۳۷/۶۸٪ نمونه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین MIC=۱۰۲۴ µg/ml در ۷ مورد و کمترین میزان آن MIC=۳۲ µg/ml در ۸ جدایه تعیین شد (نمودار ۲).

تیمار جدایه‌ها با سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات میسلی و سیپروفلوکساسین: ۵ نمونه مقاوم تحت تیمار با غلظت های مختلف سیپروفلوکساسین و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبینین به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. برای تأیید کشندگی ۵۰ درصدی جدایه های تحت تیمار، از تست MBC استفاده شد. نتایج MBC نشان داد که غلظت ۱/۲MIC سیپروفلوکساسین (که توان مهار رشد باکتری را نداشت) در صورت ترکیب با نانوذرات سیلیبینین قادر به کاهش رشد باکتری مقاوم به دارو تا ۵۰٪ بود. نتایج این مطالعه نشان داد که اثر کشندگی سیپروفلوکساسین بر جدایه های مقاوم در این مطالعه با غلظت ۴۰۰µg/ml نانوذرات میسلی حاوی سیلیبینین به مدت ۲۴ ساعت افزایش یافت (شکل ۱).

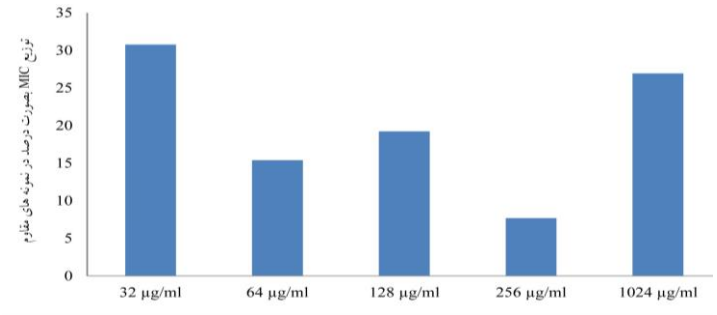
کاهش بیان ژن *mexB* در جدایه های تیمار شده با سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات میسلی: بعد از تیمار نمونه‌ها با سیپروفلوکساسین و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبینین، بررسی بیان ژن *mexB* نسبت به نمونه کنترل (تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) صورت گرفت. کاهش بیان *mexB* در همه نمونه‌های تیمار شده با سیلیبینین نسبت به نمونه کنترل مشهود بود (نمودار ۳).



نمودار ۱. توزیع عفونت های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین برحسب موضع عفونت

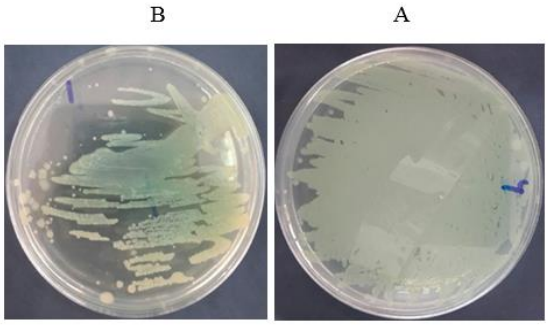
جدول ۲. قطر هاله عدم رشد استاندارد برای سویه های سودوموناس آئروژینوزا براساس روش رفرانس CLSI

آنتی بیوتیک	قطر هاله (mm)			تعداد جدایه ها (درصد)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
سیپروفلوکساسین	≥۲۱	۱۶-۲۰	≤۱۵	۴۱(۵۹/۴۲)	۵(۷/۲۴)	۲۳(۳۳/۳۳)
جنتامایسین	≥۱۵	۱۴-۱۳	≤۱۲	۳۵(۵۰/۷۲)	۷(۱۰/۱۴)	۲۷(۳۹/۱۳)
آمیکاسین	≥۱۷	۱۶-۱۵	≤۱۴	۳۸(۵۵/۰۷)	۵(۷/۲۴)	۲۶(۳۷/۶۸)

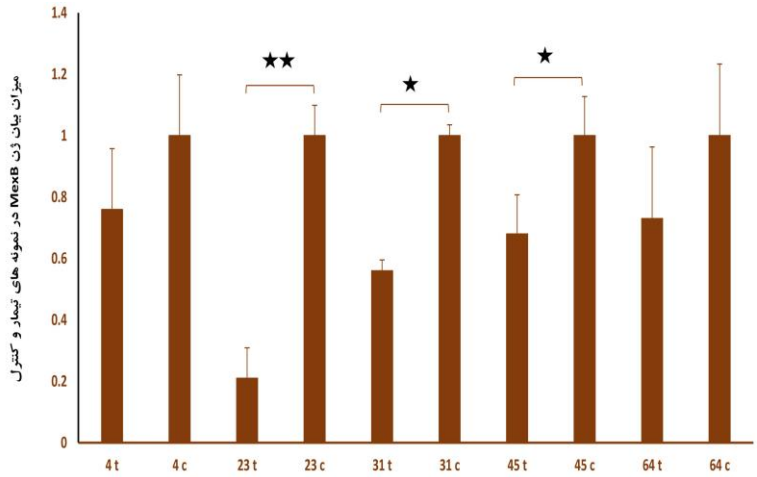


نمودار ۲. توزیع میزان MIC در جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]



شکل ۱. تیمار جدایه شماره ۶۴ سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین (MIC=۳۲ µg/ml). A: نمونه تیمارشده با سیپروفلوکساسین (۱۶ µg/ml) و B: نمونه تیمار شده با سیپروفلوکساسین (۱۶ µg/ml) و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبینین (۴۰۰ µg/ml)



نمودار ۳. بررسی بیان ژن در *mex B* نمونه های تحت تیمار با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبین در مقایسه با نمونه های کنترل تحت تیمار با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به تنهایی. باکتری های شماره ۴، ۲۳، ۳۱، ۴۵ و ۶۴ در این آزمون مورد بررسی قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات میسلی می‌تواند باعث افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین در این جدایه ها شود. در مطالعه‌ای که توسط Nahaei و همکاران انجام شد، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین به ترتیب ۵۱٪، ۲۲٪ و ۱۵٪ گزارش شد (۱۴). در مطالعه Taghvaee و همکاران در بین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و به ترتیب ۱۵/۷٪، ۱۹/۴٪، ۲۰/۴٪ گزارش شد (۱۵). در مطالعه Nikokar و همکاران بر روی نمونه های سوختگی میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۶۳/۳٪، آمیکاسین ۴۸/۸٪ و جنتامایسین ۳۷/۲ ٪ گزارش شد (۱۶).

پایین بودن میزان مقاومت به آنتی بیوتیکها در مطالعه Nahaei و همکاران و مطالعه Taghvaee و همکاران می تواند مربوط به سال تهیه گزارش باشد و انتظار می رود در اراک و تبریز نیز مشابه گیلان، افزایش مقاومت طی این سالها رخ داده باشد. علت تفاوت میزان مقاومت به سه آنتی بیوتیک در مطالعه حاضر با مطالعه Nikokar و همکاران به علت موضع عفونت است. در مطالعه Nikokar و همکاران فقط نمونه های سوختگی مورد بررسی قرار گرفته است که این موارد به دلیل نقص در پاسخ ایمنی شرایط مساعدتری برای عفونت های بیمارستانی محسوب شده و میزان مقاومت در آنها بالا می باشد. بر اساس نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر محققین به نظر می‌رسد در نواحی مختلف کشور و در سالهای مختلف میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها متفاوت، اما در حال افزایش می‌باشد. با توجه به سرعت بالای این باکتری بیماریزا در کسب مقاومت لازم است روش‌های مناسبی جهت شناسایی انواع مقاوم در بیمارستانها مورد استفاده قرار داد تا با انتخاب داروهای جایگزین مناسب با عوارض جانبی کمتر، درمان افراد مبتلا با موفقیت بیشتری همراه باشد. در مطالعه Hassanshahian و همکاران تاثیر ضدباکتریایی عصاره انار بر چندین باکتری از جمله سودوموناس آئروژینوزا تأیید شد (۱۷). در مطالعه Ramezani و همکاران اثر ضدباکتریایی بنفشه معطر بر ۳ باکتری پاتوژن شامل استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد و بیشترین تأثیر آن بر استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین آن بر سودوموناس آئروژینوزا مشاهده گردید(۱۸) در مطالعه Roshani و همکاران مشخص شد که عصاره های متانولی و استونی گزنه و آویشن شیرازی روی جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو اثر کشندگی دارند (۱۹). بر اساس مطالعات پیشین انتظار می رود از ترکیبات گیاهی بتوان در درمان عفونت ها بهره برد. در مطالعه Molana و همکاران مشخص شد که سیر از رشد سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری می‌کند (۲۰).

در این مطالعه اثر سیلیبینین ترکیب فعال و مؤثر گیاه خارمریم مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه Puri و همکاران اثرات ضدباکتریایی عصاره آبی و آلی گیاه خارمریم علیه چندین باکتری گرم مثبت مانند استافیلوکوک اورئوس و گرم

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]

منفی چون E.*coli* و سودوموناس آئروژینوزا تایید شد (۲۱). در مطالعه Evren و همکاران با تأثیر عصاره سیلیمارین بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مشخص شد این عصاره توان مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت را دارد (۲۲). در مطالعه Lee و همکاران اثر سینرژیک سیلیبینین با آمپی‌سیلین و جنتامایسین بر روی باکتری‌های حساس به دارو نظیر گونه استرپتوکوک مشاهده شد (۴). در مطالعه Oliveira و همکاران اثر سینرژیک سیلبین و سیلیمارین بر چندین آنتی بیوتیک در جدایه‌های کلینیکی و حساس به دارو نشان داده شد (۵). در دو مطالعه ذکر شده اثر این دارو بر چندین گونه باکتریایی حساس به آنتی بیوتیک های مختلف بررسی شد. در حالیکه مطالعه حاضر با تهیه جدایه های مختلف از چندین بیمارستان و آزمایشگاه استان، ۵ جدایه دارای مقاومت چند دارویی انتخاب و مورد بررسی از نظر اثر سیلیبینین قرار گرفت.

استفاده از سیلیبینین بصورت انکپسوله در نانوذرات میسلی، باعث افزایش کارآیی دارو حین انتقال به سلول و در نتیجه افزایش اثربخشی آن بر سلول گردید. بطوریکه نانوذرات حاوی سیلیبین به همراه سیپروفلوکساسین قادر به کاهش رشد سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به همان دوز سیپروفلوکساسین بودند؛ بنابراین می توان گفت که نانوذرات حاوی سیلیبین اثر سینرژیک بر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین داشته و می‌تواند برای درمان عفونت‌های سودوموناسی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه در این مطالعه برای اولین بار از نانوذرات حاوی سیلیبین و سیپروفلوکساسین جهت بررسی اثر کشندگی بر سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد و غلظت مناسب کشندگی ۴۰۰ $\mu g/ml$ در کمترین زمان ممکن (۲۴ ساعته) تعیین شد در حالیکه کمترین غلظت کشندگی توسط Lee و همکاران بعد از ۴۸ ساعت اثر بخش بود (۴).

بنابراین نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از نانوذرات در افزایش اثربخشی دارو می تواند مؤثر باشد. یکی از دلایل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سودوموناس آئروژینوزا افزایش بیان ژنهای سیستم های پمپ افلاکس نظیر mexAB-oprM است. در مطالعه Riou و همکاران ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری بین افزایش بیان ژن‌های *mexA* و *mexB* با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا مشاهده‌گردید (۲۳). همچنین در مطالعه Pourakbari و همکاران در چندین جدایه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا در ایران افزایش بیان ژنهای *mexA* و *mexB* مشاهده شد (۲۴). با توجه به اینکه بین مقاومت به سیپروفلوکساسین و افزایش بیان ژن‌هایی چون *mexB* در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا ارتباط وجود دارد و با توجه به اینکه سیلیبین اثرات ضد باکتریایی از خود در مطالعات پیشین نشان داده، فرض بر این بود که قادر است با اثر بر ژن‌های پمپ افلاکس و کاهش بیان آنها باعث کاهش خروج آنتی بیوتیک از سلول و در نتیجه محبوس شدن میزان بیشتری از آنتی‌بیوتیک در سلول شود. بطوریکه با غلظت پایین‌تر سیپروفلوکساسین بتوان میزان کشندگی نمونه‌ها را افزایش داد.

نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که سیلیبینین قادر به کاهش بیان *mexB* در جدایه‌های تحت تیمار می‌باشد. کاهش بیان این ژن با کاهش خروج سیپروفلوکساسین و محبوس شدن غلظت بالاتری از این آنتی‌بیوتیک در سلول همراه بوده و به این ترتیب سیلیبینین قادر به افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک خواهد بود. یافته های این مطالعه نشان داد که غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی به همراه آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین از طریق کاهش بیان ژن *mexB* سبب تاثیر بهتر سیپروفلوکساسین و در نتیجه مهار رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا پس از مدت زمان ۲۴ ساعت می‌شود. بنابراین انتظار می رود بتوان از این ترکیب فعال گیاهی به عنوان مکمل درمان در عفونتهای مقاوم به آنتی بیوتیک ها در آینده نزدیک استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل همکاری در این تحقیق و همچنین از آقایان دکتر مجید صادقی زاده، دکتر فرهود نجفی و دکتر علی ناظمی، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]

Deregulation of *Mexb* Gene in Ciprofloxacin Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Treated with Silibinin-Encapsulated in Nanoparticles

Z. Ahmadi Roudbaraki (BSc)[1], N. Ranji (PhD)[1*], B. Soltani Tehrani (PhD)[2]

1.Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R.Iran
2.Cellular and Molecular Research Center, Gilan Islamic Azad University, Rasht, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(11); Nov 2017; PP: 42-9
Received: Apr 30th 2017, Revised: Sep 5th 2017, Accepted: Aug 21st 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND AIM: Silibinin (silybin) is an active component of silymarin with anti-bacterial activities. In drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* has been reported overexpression of *mexB* gene. The aim of this study was evaluation of *mexB* gene expression in silibinin treated and untreated isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

METHODS: In this descriptive analytical study, *Pseudomonas aeruginosa* isolates were obtained from hospitals and laboratories of Guilan province. After determining several antibiotics susceptibility (disc diffusion and MIC), 5 ciprofloxacin resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were treated by ciprofloxacin (1/2MIC) only (group1) and in the combination with silibinin-encapsulated micelles (nanoparticles) (group2). After 24h, RNA extraction and cDNA synthesis was performed in group1 and group2 and *mexB* gene expression was evaluated by quantitative-realtime PCR (Q-RT-PCR) and $2^{-\Delta\Delta CT}$ equation.

FINDINGS: In this study from 69 isolates, 33.33% by disc diffusion test and 37.86% by MIC test were determined ciprofloxacin resistant. Our analysis showed that silibinin -encapsulated nanoparticles (400µg/ml) induced death up t0 50% in ciprofloxacin (1/2MIC) treated resistant isolates during 24h. In treated cells with silibinin and ciprofloxacin revealed downregulation of *mexB* gene compared to treated cells with ciprofloxacin alone.

CONCLUSION: It seems that silibinin is cause of increasing ciprofloxacin effect on inhibition of growth of *Pseudomonas aeruginosa* through decreasing expression of genes implicated in efflux pomp systems such as *mexB*.

KEYWORDS: *Ciprofloxacin, mexB, Nanoparticles, Pseudomonas aeruginosa, Realtime PCR, Silybin.*

Please cite this article as follows:

Ahmadi Roudbaraki Z, Ranji N, Soltani Tehrani B. Deregulation of Mexb Gene in Ciprofloxacin Resistant Isolates of Pseudomonas Aeruginosa Treated with Silibinin-Encapsulated in Nanoparticles. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(11):42-9.

*** Corresponding author: N. Ranji (PhD)**
Address: Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Taleshan Bridge, Rasht, I.R.Iran
Tel:+98 13 33424080
E-mail: najmehranji@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]

References

1.Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. Antioxidants. 2015;4(1):204-47.

2.Zadeh MM, Motamed N, Ranji N, Majidi M, Falahi F. Silibinin-Induced apoptosis and downregulation of microRNA-21 and microRNA-155 in MCF-7 human breast cancer cells. J Breast Cancer. 2016;19(1):45-52.

3.Malaki Zadeh MM, Ranji N, Motamed N. Deregulation of miR-21 and miR-155 and their putative targets after silibinin treatment in T47D breast cancer cells. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(12):1209-14.

4.Lee YS, Jang KA, Cha JD. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. J Biomed Biotechnol .2012.

5.de Oliveira DR, Tintino SR, Braga MF, Boligon AA, Athayde ML, Coutinho HD, et al. In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. BioMed Res Int. 2015;201(5).

6.Hakimi F, Ranji N, Faezi Ghasemi M. Mutations in nalC gene in ciprofloxacin resistant strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from hospitals and laboratories of Guilan province in 2014-2015 years. Arak Med Univ J. 2016;19(7):12-21. [In Persian].

7.Rahnamay Roodposhti F, Ranji N, Asadpour L. Mutations of GyrA gene in fluoroquinolone resistant isolates of pseudomonas aeruginosa in Guilan province. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;26(139):84-92.

8.Rajkumari N, John NV, Mathur P, Misra MC. Antimicrobial resistance in pseudomonas sp. causing Infections in trauma patients: a 6 year experience from a south asian country. J Global Infec Dis. 2014;6(4):182-5.

9.Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, Ma S. RND-type drug e ffl ux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. Frontiers in microbiology. 2015;6:377.

10.Sacha P, Wieczorek P, Ojdana D, Hauschild T, Milewski R, Czaban S ,et al. Expression of MexAB-OprM efflux pump system and susceptibility to antibiotics of different Pseudomonas aeruginosa clones isolated from patients hospitalized in two intensive care units at University Hospital in Bialystok (northeastern Poland) between January 2002 and December 2009. APMIS. 2014;122(10):931-40.

11.Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of mexZ gene in ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates in Guilan province. J Urmia Univ Med Sci. 2017;27(10):902-13. [In Persian].

12.Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, et al. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. Prog Biolog Sci. 2015;5(2):143-58. [In Persian].

13.Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H, et al. Measurement of pseudomonas aeruginosa multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. FEMS microbiol lett. 2005;243(1):125-31.

14.Nahaei M, Bohloli Khiavi R, Asgarzadeh M, Hasani A, Sadeghi J, Akbari Dibavar M. Antibiotic resistance and plasmid profiles of pseudomonas aeruginosa strains isolated from in-patients of sina hospital-tabriz. J Ardabil Univ Med Sci. 2007;7(1):90-8 [In Persian].

15.Taghvaee R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabaie AA. The study of antibiotic resistance pattern and the frequency of extended-spectrum beta-lactamases (esbl) in pseudomonas aeruginosa strains isolated from medical centers in arak city, iran. Qom Univ Med Sci J. 2013;7(4):36-41. [In Persian].

16.Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among pseudomonas aeruginosa, isolated from burn patients in Guilan, Iran. Iran J Microbiol. 2013;5(1):36-41.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]

17.Hassanshahian M, Mohsenipour Z. The antimicrobial effects of the alcoholic extracts of pomegranate (Punica Granatum) on the planktonic forms and biofilm structures of six pathogenic bacteria. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(1):77-84. [In Persian].

18.Ramezani M, Zarrinkamar F, Bagheri M, Rajabnia R. Study of Environment temperature effect on the antibacterial activity of water extract of different organs of viola odorata in the different stages of growth. J Babol Univ Med Sci. 2012;14(2):16-21.

19.Roshani M, Heidary M, Goudarzi H, Hashemi A, Eslami G, Yousefi N. Investigating the antibacterial effect of methanoland acetone extracts of urtica dioica and zataria multifloraagainst Metallo Beta-lactamase Producing Pseudomonas aeruDecember 5, 2015 ginosa. J Ilam Univ Medical Sci. 2016;24(3):70-8. [In Persian].

20.Molana Z, Shahandeh Z. Effect of Garlic (Allium Sativum) and Garlic extract on growth inhibition of Pseudomonas Aeruginosa. JBUMS. 2003; 5(3):57-62. [In Persian]

21.Puri S SMC, Tewari R, Sharma A. Study of phytochemicals, trace elements and antibacterial activity of silybum marianum.Gaertn. J Plant Sci Res. 2015;2(2):1-5.

22.Evren E, Yurtcu E. In vitro effects on biofilm viability and antibacterial and antiadherent activities of silymarin. Folia Microbiol. 2015;60(4):351-6.

23.Riou M, Avrain L, Carbonnelle S, El Garch F, Pirnay JP, De Vos D, et al. Increase of efflux-mediated resistance in Pseudomonas aeruginosa during antibiotic treatment in patients suffering from nosocomial pneumonia. Int J Antimicrob Agent. 2016;47(1):77-83.

24.Pourakbari B, Yaslianifard S, Yaslianifard S, Mahmoudi S, Keshavarz-Valian S, Mamishi S. Evaluation of efflux pumps gene expression in resistant pseudomonas aeruginosa isolates in an Iranian referral hospital. Iran J Microbiol. 2016;8(4):249-56.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.11.6.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.11.42]