ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحه ۴۵ - ۳۷

مطالعه مولکولی بیان ژن بیوفیلم *icaD* تحت اثر عصاره‌های گیاهی خارمریم و جینسینگ در *Staphylococcus aureus*

Molecular study of *icaD* biofilm gene expression by plant extracts of Mary thistle and ginseng in *Staphylococcus aureus*

مریم زاده گل محمدی[۱]، هادی حبیب اللهی[۱]، محمدرضا صفری مطلق*[۲]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، گروه زیست شناسی واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Zadegol Mohammadi M[1], Habibollahi H[1], Safari Motlagh MR*[2]

1- MSc Graduates, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University,Rasht, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ssafarimotlagh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸)

چکیده

تولید بیوفیلم توسط *Staphylococcus aureus* از عوامل مشکل ساز این باکتری‌هاست. یکی از لوکوس‌های ژنی بیوفیلم *icaD* است که نقش مهمی در تولید بیوفیلم دارد. بسیاری از گیاهان دارای خواص دارویی و ضد میکروبی هستند. در این پژوهش خواص ضد میکروبی و اثرات مولکولی عصاره های گیاهی خارمریم و جینسینگ بر بیان ژن بیوفیلم *icaD* در *S. aureus* مورد مطالعه قرار گرفت. عصاره‌های گیاهی خارمریم و جینسینگ تهیه شد و پس از بررسی هاله عدم رشد باکتری تحت تأثیر این عصاره‌ها، اثر مهارکنندگی رشد با استفاده از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی رشد بررسی شد. به دنبال استخراج RNA و سنتز cDNA از سویه‌های تیمار شده با عصاره‌های خار مریم، جینسینگ و سویه‌های بدون تیمار، میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* دو سویه استاندارد و پاتوژن *S. aureus* با روش Real time PCR بررسی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد سویه استاندارد تحت تأثیر غلظت ۱۰۰ mg/ml عصاره خارمریم و جینسینگ به‌ترتیب ۱۰ و ۸ میلی‌متر و در مورد سویه پاتوژن نیز به‌ترتیب ۱۰ و ۱۲ میلی‌متر تعیین شد. استفاده ترکیبی به نسبت مساوی از عصاره خار مریم و جینسینگ نیز هاله عدم رشدی به قطر ۱۵ میلی‌متر در هر دو سویه مورد مطالعه ایجاد نمود. در غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی (µg/ml ۳۹/۶ تا µg/ml ۵۰۰۰) به‌کار رفته در MIC، تمام سویه‌ها رشد یافتند. طبق نتایج حاصل از Real time PCR، بیان ژن بیوفیلم *icaD* در سویه استاندارد تحت تأثیر عصاره خار مریم افزایش ۱۷ برابری و تحت تأثیر عصاره جینسینگ افزایش ۲۴ برابری نشان داد. در سویه پاتوژن، بیان ژن *icaD* تحت تأثیر عصاره خار مریم به ۰/۳٪ کاهش یافت و بیان این ژن تقریبا مهار شد. عصاره جینسنگ نیز بیان این ژن در سویه پاتوژن را به نصف کاهش داد و به حدود ۴۹ ٪ رساند. استفاده هم‌زمان عصاره خار مریم و جینسینگ نیز بیان ژن *icaD* در سویه پاتوژن را به حدود ۶ ٪ نمونه کنترل رساند و باعث کاهش ۹۴ درصدی بیان این ژن شد.

واژه‌های کلیدی

بیوفیلم
جینسینگ
خارمریم
icaD
Staphylococcus aureus

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی یک معضل جهانی بوده و عوامل متعددی در بروز آن دخیل هستند. میکروارگانیسم‌هایی که عامل عفونت هستند سالانه در حال تغییر می‌باشند. از دهه ۸۰، باکتری‌های گرم مثبت به‌خصوص *Staphylococcus aureus* به‌عنوان عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده‌اند (Rahimi Alang et al. 2011). این باکتری از خانواده استافیلوکوکاسه و یک عامل عفونت فرصت‌طلب در انسان به‌شمار می‌آید (Tabaei et al. 2016). جایگاه سویه‌های *S. aureus* ناحیه قدامی مجاری بینی است و در حدود ۲۰ درصد جمعیت ناقل آن هستند (Vaziri et al. 2016). همچنین در زیر بغل، کشاله ران و دستگاه گوارش ممکن است باکتری کلونیزه شود (Tabaei et al. 2016).

از ویژگی‌های عفونت این سویه ایجاد بیوفیلم است (Beenken et al. 2004). از جمله ویژگی‌های بارز بیوفیلم کمک به بقای باکتری در شرایط سخت محیطی، ایجاد بیماری‌های مزمن، تاثیر در ایجاد و تقویت مقاومت دارویی به‌واسطه نفوذناپذیری آنتی‌بیوتیک در ماتریکس پلیمری، تسهیل در انتقال ژن از طریق کونژوگاسیون، ایجاد سویه‌های ژنوتیپی جدید در اثر موتاسیون در داخل بیوفیلم و فعال شدن ژن‌های مسوول ویرولانس باکتری است. این لایه به‌وسیله گروه‌های خاصی از اوپرون‌های ساختاری به اسم اوپرون‌های داخل سلولی[1] کد می‌شود و حاوی لوکوس‌های ژنی گوناگون از جمله *icaR*، *icaD* و *icaB* می‌باشد. *icaD* نوعی انتقال‌دهنده پیام (چاپرون) به سایر ژن‌های این لوکوس است که به‌کمک *icaR* باعث فعال شدن آنزیم‌های ویژه‌ای برای ایجاد ارتباط و بیان *icaR*، *icaD* و *icaB* می‌شود (Heydari et al. 2018). تشکیل این لایه‌ها طی چهار مرحله شروع، تشکیل کلونی، تکثیر و پراکندگی انجام می‌گیرد (Atshan et al. 2012).

این باکتری‌ها نه تنها باعث عفونت‌های موضعی می‌شوند بلکه در عفونت‌های ناشی از زخم و جراحی نیز وجود دارند. گزارش شده که بیش از ٦٠ درصد سویه‌های *S. aureus* توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند (Mahdavi et al. 2008). بروز عفونت‌های استافیلوکوکوسی در سال‌های اخیر به‌علت انتشار سویه‌های مقاوم، افزایش بیماران با ضعف ایمنی و استفاده بیش از اندازه از وسایل پزشکی مثل کاتتر در حال افزایش است. در بین گونه‌های استافیلوکوکوسی، *S. aureus* دارای بیشترین میزان توانایی بیماری‌زایی است. یکی از مکانیسم‌های اصلی توسعه عفونت‌های بیمارستانی، توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی وسایل پزشکی از جمله کاتترها و دریچه مصنوعی قلب است (Shahkarami and Rashki 2016). بیوفیلم در سیستم‌های آب صنعتی، تجهیزات پزشکی، صنایع غذایی (Mahdavi et al. 2008)، سیستم‌های تهویه هوا و مخازن نفتی (Yarwood et al. 2004) تشکیل می‌شود. در صنایع غذایی اتصال باکتری‌های پاتوژن و فاسدکننده مواد غذایی با سطوح در تماس با موادغذایی در فرآیندهای تولید و بسته‌بندی آن‌ها و نهایتا تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی، می‌تواند منبع بالقوه آلودگی محصولات و فرآورده‌های غذایی و انتقال بیماری‌ها باشد. همچنین تشکیل بیوفیلم روی وسایل، تجهیزات و دستگاه‌های پزشکی باعث آلودگی و در نتیجه انتقال عفونت‌های بیمارستانی می‌شود (Mahdavi et al. 2008).

علم پزشکی در سال‌های اخیر در مورد شناخت و جلوگیری از بیماری‌ها توانایی بسیار بالایی داشته است. در عین حال مصرف بیش از اندازه داروهای شیمیایی منجر به افزایش سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده و از این‌رو محققان به مطالعه گیاهان دارویی روی آورده‌اند (Hasanlooi et al. 2015).

گیاه خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* از خانواده Asteraceae (کاسنیان) است. ترکیبات موثر خارمریم (کمپلکس سیلی‌مارین) به‌طور عمده در دانه یافت می‌شود. این ترکیبات شامل سیلی‌بین (سیلی‌بین A و B، ایزوسیلی‌بین A و B) سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین و تاکسی‌فولین هستند که مجموعاً سیلی‌مارین نامیده می‌شوند (Nikzad et al. 2015). علاوه براین، سیلی‌مارین حاوی مقادیر قابل‌توجهی از سایر فلاونولیگنان‌ها شامل سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، ایزوسیلی‌بین، دی-هیدروسیلی‌بین است که به‌عنوان آنتی اکسیدان و محافظ کبدی شناخته شده است. این فلاوونوئیدها علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی، موجب تثبیت غشاء سلولی و افزایش گلوتاتیون سلولی می‌شوند که احتمالاً بر متابولیسم چربی

[1] Intracellular Adhesin (ICA)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

تأثیرگذار است (Bohm et al. 1998). درمان بیماری‌های طحال، کبد، سنگ مثانه، پیشگیری و درمان تب و لرز، طاعون، سوزش ادرار، درمان یرقان، مشکلات قاعدگی، پوست و زیبایی و خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آرتریت از جمله موارد درمانی این گیاه می‌باشند (Faezizadeh et al. 2014). اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاه خارمریم علیه چندین باکتری گرم مثبت از جمله *S. aureus* به اثبات رسیده است (Puri et al. 2015).

گیاه جینسینگ گیاهی دارویی، معطر و پایا متعلق به خانواده Araliaceae (عشقه) و گونه *Panax ginseng* است و در طب سنتی کشورهای آسیایی رایج است. خاصیت دارویی گیاه مربوط به ریشه آن است. ریشه این گیاه حاوی ساپونین‌های تری‌ترپنی، روغن‌های ضروری، پلی‌استیلن، پلی‌ساکارید، پپتیدوگلیکان، ترکیبات نیتروژنی، اسیدهای چرب، کربوهیدرات‌ها و ترکیبات فنلی است (Hosseini et al. 2014). جینسینگ یک داروی تقویتی برای تحریک اشتها، از بین بردن افسردگی، تقویت سیستم ایمنی، تخفیف درد و سردرد و بهبود عملکرد ذهنی و نیروی بدنی است. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که عصاره ریشه جینسینگ اثر شبه ضدافسردگی در موش زنده دارد. اثر ضد افسردگی ریشه جینسینگ ممکن است مشابه اثر فلوکستین از طریق مهار بازجذب سروتونین باشد (Khakpour et al. 2009). در مطالعه‌ای مشخص گردید که عصاره جینسینگ از طریق کاهش بیان ژن‌های مؤثر در بیماری‌زایی *S. aureus*، باعث کاهش فعالیت این باکتری در جانورانی مانند گاو می‌شود (Beccaria et al. 2018).

هدف از این تحقیق مطالعه‌ی مولکولی بیان ژن بیوفیلم *icaD* تحت اثر عصاره خارمریم و جینسینگ در باکتری *S. aureus* بود.

مواد و روش‌ها

کپسول ۱۴۰ میلی‌گرمی عصاره خشک گیاه خارمریم با نام تجاری لیورگل[1] و کپسول ۲۵۰ میلی‌گرمی عصاره خشک گیاه جینسینگ با نام تجاری جین‌سین[2] از شرکت داروسازی گل دارو تهیه گردید. هر کپسول لیورگل محتوی ۱۹۰ تا ۱۹۵ میلی‌گرم عصاره خشک *Silybum marianum* بود که معادل با ۱۴۰ میلی‌گرم ماده مؤثره سیلی‌مارین است. هر کپسول جین‌سین نیز محتوی ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره Ginseng rhizome معادل ۷ میلی‌گرم ماده مؤثره Ginsenosides بود. با استفاده از آب‌مقطر و محاسبه تناسب دوزی از هر یک از مواد مذکور، محلول‌های آبی ذخیره ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد.

سویه‌های استاندارد بین المللی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) خریداری شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیک و سویه پاتوژن جمع‌آوری شده از زخم‌های پوستی در بیمارستان‌های شهر رشت مورد استفاده قرار گرفت. سپس به‌صورت چمنی روی محیط کشت مولر هینتون آگار در داخل پلیت کشت داده شد. پلیت‌های حاوی باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و سپس در محیط آبگوشت مولر هینتون کشت داده شد. ۲۴ ساعت پس از کشت، کدورتی معادل محیط نیم مک فارلند آماده شد.

برای این منظور از دیسک‌های خام (بلانک) استفاده شد. هر دیسک خام در ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر خارمریم و جینسینگ به‌طور جداگانه آغشته شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری، دیسک‌گذاری انجام شد. علاوه بر این از ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره‌های خارمریم و جینسینگ با نسبت مساوی ۱:۱ نیز برای آغشته‌سازی و دیسک‌گذاری استفاده شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، با استفاده از روش رقیق سازی سریالی، در هشت لوله آزمایش جداگانه، غلظت مختلف ۵۰۰۰µg/ml، ۲۵۰۰ µg/ml، ۱۲۵۰ µg/ml، ۶۲۵ µg/ml، ۳۱۲/۵ µg/ml، ۱۵۶/۲۵ µg/ml، ۷۸/۱ µg/ml و ۳۹/۶ µg/ml از عصاره‌های گیاهی همراه با محیط کشت آبگوشت مولر هینتون سترون تهیه شد. لوله‌های شماره ۹ و ۱۰ نیز به‌ترتیب به‌عنوان کنترل منفی (حاوی محیط کشت و عصاره گیاهی بدون باکتری) و کنترل مثبت (حاوی محیط کشت و باکتری بدون عصاره گیاهی) در نظر گرفته شدند. به غیر از لوله کنترل منفی به بقیه لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری با کدورت معادل نیم مک‌فارلند اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند.

[1] Livergol capsule
[2] Ginsin

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

بعد از ٢٤ ساعت از آزمون MIC، آزمون MBC انجام شد. در این آزمایش از نمونه‌های لوله‌های شماره ١ تا ٨ استفاده شد. این نمونه‌ها در هشت محیط مولر هینتون آگار جداگانه به‌صورت چمنی و یک‌دست کشت داده شدند و بعد از آن به‌مدت ٢٤ ساعت از لحاظ رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند.

برای استخراج DNA از دو سویه مورد مطالعه رشد یافته در محیط مولر هینتون مایع استفاده شد. مراحل کار با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت شرکت پیشگامان و طبق دستورالعمل این کیت انجام گرفت.

اثبات وجود این ژن با استفاده از روش PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. توالی جفت آغازگرهای مورد نظر در جدول ١ آمده است (Atshan et al. 2013).

جدول ١- توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های *icaD* برگرفته از مقاله Atshan et al. 2013

نام آغازگر	توالی	دمای اتصال	طول قطعه تکثیری
Icad-F	ACCCAACGCTAAAATCATCG	٦٠ درجه سانتی‌گراد	٢١١ جفت باز
Icad-R	GCGAAAATGCCCATAGTTTC		

واکنش PCR ژن *icaD* در حجم کلی ٢٥ میکرولیتر و با دمای واسرشت ٩٤°C به‌مدت ٤٥ ثانیه، دمای اتصال آغازگر ٥٩°C به‌مدت ٦٠ ثانیه و دمای گسترش آغازگر ٧٢°C به‌مدت ٤٥ ثانیه طی ٣٥ چرخه صورت گرفت.

برای این منظور، الکتروفورز انجام شد. با استفاده از بافر TBE و پودر آگارز، ژل آگارز یک درصد تهیه شد و ٥ میکرولیتر از محصول PCR با رنگ بارگذاری پاورلود مخلوط و به درون چاهک‌ها تزریق شد. در یک چاهک نیز DNA Ladder 100 bp تزریق شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ١٢٠ ولت، با قرار دادن ژل روی دستگاه *UV* Transilluminator، باندهای محصول PCR رؤیت و ارزیابی شد.

به‌منظور بررسی میزان بیان ژن *icaD* در سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه و بر اساس نتایج حاصل از MIC و MBC، حداکثر غلظت مناسب از عصاره‌های خارمریم و جینسینگ برای تیمار در محیط کشت باکتریایی معادل نیم مک فارلند استفاده شد و پس از گرمخانه گذاری در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد، استخراج RNA از سویه‌های استاندارد و پاتوژن مورد نظر با استفاده از ترایزول شرکت ROJE Technologies، طبق دستورالعمل کیت و با رعایت شرایط استریل و در دمای پایین صورت گرفت و برای بررسی کیفت استخراج برروی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد.

با استفاده از RNAهای استخراج شده و با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت پارس توس بیوتکنولوژی و طبق پروتکل این کیت، سنتز cDNA انجام شد. برای این منظور از آغازگرهای تصادفی هگزامر استفاده شد و محصول این سنتز به‌منظور بررسی میزان بیان ژن *icaD* تحت تأثیر عصاره‌های خارمریم و جینسینگ در هر دو سویه مورد نظر برای Real time PCR به‌کار گرفته شد. در این روش از ژن *16s rRNA* به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد.

در این روش ١٠ میکرولیتر SYBR Green Premix به هر میکروتیوب اضافه شد. سپس ١ میکرولیتر از آغازگر مستقیم و معکوس، ٢ میکرولیتر از محلول cDNA و نیز ٤ میکرولیتر از ROX Reference Dye به میکروتیوب‌ها افزوده شد. برای رسیدن به حجم نهایی ٢٠ میکرولیتر، ٦ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز اضافه و مخلوط شد و ١٨ میکرولیتر از این مخلوط به میکروتیوب‌ها اضافه شد. آنالیز نسبی در سطح mRNA با سه تکرار و برای تجزیه و تحلیل نتایج ریل تایم PCR از روش Pfaffian با $e^{-\Delta\Delta CT}$ و از طریق مقایسه با ژن مرجع *16SrRNA* انجام شد. جدول ٢، توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های *icaD* و *16SrRNA* را نشان می‌دهد (Atshan et al. 2013).

نتایج

اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی خارمریم و جینسینگ

برای انجام این آزمایش، روش دیسک‌گذاری و آغشته‌سازی دیسک‌ها با محلول ١٠٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های گیاهان خارمریم و جینسینگ و نیز ترکیبی از هردو عصاره برای هر دو سویه استاندارد و پاتوژن باکتری *S. aureus* با دو تکرار صورت گرفت. قطر هاله عدم رشد در جدول ٣ نشان داده شده است.

آزمون MIC تحت تیمار عصاره‌های خار مریم و جینسینگ

به غیر از نمونه کنترل منفی در تمام غلظت‌های به‌کار گرفته از عصاره‌های گیاهی مورد نظر، سویه‌های استاندارد و پاتوژن

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

استافیلوکوکوس اورئوس رشد یافته و کدورت محیط کشت ایجاد شد (شکل‌های ۱ و ۲).

آزمون MBC تحت تیمار عصاره‌های خارمریم و جینسینگ

در این آزمایش، سویه‌های استاندارد و پاتوژن تیمار یافته با غلظت‌های تعیین شده عصاره گیاهی بر اساس آزمون MIC در پلیت حاوی محیط کشت آگار، کشت داده شدند. سویه‌های مورد مطالعه در تمام پلیت‌ها رشد کردند. در نتیجه غلظت‌های به‌کار رفته در این آزمون، اثر کشندگی روی سویه‌های مورد مطالعه نداشتند.

بررسی وجود ژن *icaD*

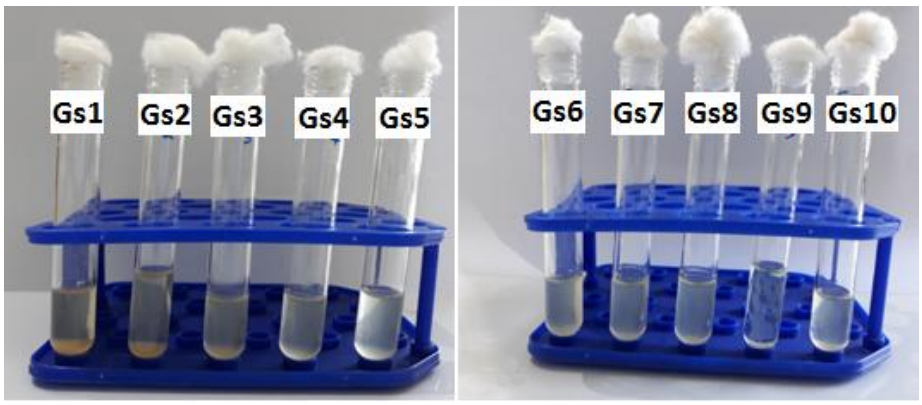
به‌منظور اثبات وجود ژن *icaD* در سویه‌های *S. aureus* مورد مطالعه، آغازگرهای اختصاصی این ژن مورد استفاده قرار گرفت و پس از انجام PCR در شرایط بهینه دمایی و زمانی مطلوب، تک باند مورد انتظار در محدوده ۲۱۰ جفت‌بازی حاصل شد.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده ژن مرجع *16SrRNA* و ژن *icaD* (Atshan et al. 2013)

آغازگر	توالی	اندازه محصول
icaD-F	ACCCAACGCTAAAATCATCG	211 bp
icaD-R	GCGAAAATGCCCATAGTTTC	
16SrRNA-F	GGGACCCGCACAAGCGGTGG	191 bp
16SrRNA-R	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA	

جدول ۳- قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه باکتری تحت تیمار به روش دیسک‌گذاری (بر حسب میلی‌متر)

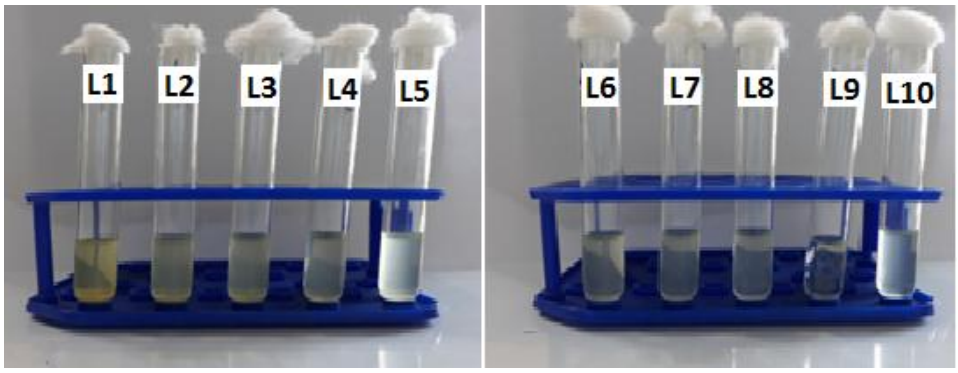
سویه	غلظت عصاره گیاهی	تیمار با خارمریم	تیمار با جینسینگ	تیمار توأم جینسینگ و خار مریم
پاتوژن	۱۰۰mg/ml	۱۰	۱۲	۱۵
استاندارد	۱۰۰mg/ml	۱۰	۸	۱۵



شکل ۱- نتایج MIC مربوط به سویه پاتوژن *S. aureus* + عصاره جینسینگ (Gs)

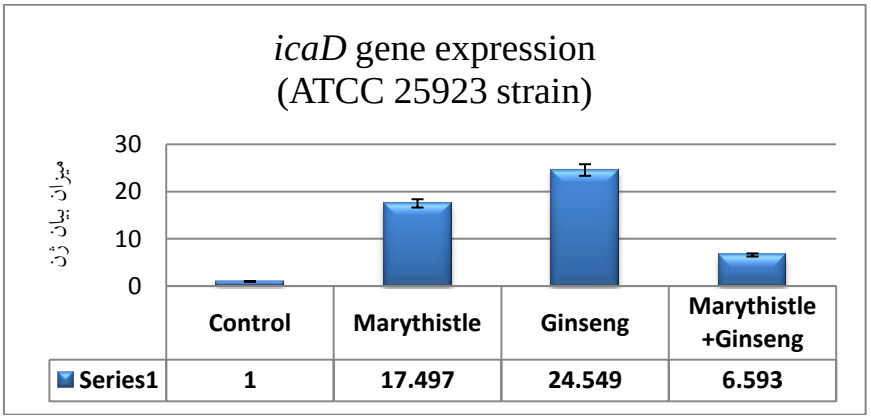
لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، لوله شماره ۹: کنترل منفی (عصاره جینسینگ بدون باکتری) لوله شماره ۱۰: کنترل مثبت (باکتری بدون عصاره جینسینگ)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۲- نتایج MIC مربوط به سویه استاندارد *S. aureus* + عصاره خارمریم (L)

لوله شماره ۱: غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، لوله شماره ۸: غلظت ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، لوله شماره ۹: کنترل منفی (عصاره خارمریم بدون باکتری) لوله شماره ۱۰: کنترل مثبت (باکتری بدون عصاره خارمریم)



شکل ۳- اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج Real time PCR مربوط به سویه استاندارد *S. aureus* تحت تیمار جینسینگ و خارمریم (نمونه کنترل، بیان ژن *icaD* بدون تیمار با عصاره گیاهی بوده و از ژن مرجع 16s rRNA استفاده شده است)

بررسی بیان ژن *icaD* در سویه استاندارد

با توجه به اطلاعات به‌دست آمده از آنالیز Real time PCR مشخص شد که تمام عصاره‌های مورد نظر باعث افزایش بیان ژن بیوفیلم در سویه‌های استاندارد *S. aureus* شد؛ به‌طوری که عصاره خارمریم منجر به افزایش ٤٩/١٧ برابری و عصاره جینسینگ باعث افزایش ٥٤/٢٤ برابری بیان *icaD* شد. استفاده هم‌زمان از عصاره‌های خارمریم و جینسینگ، میزان بیان ژن بیوفیلم *icaD* را ٥٩/٦ برابر نمونه بدون تیمار افزایش داد (شکل ۳).

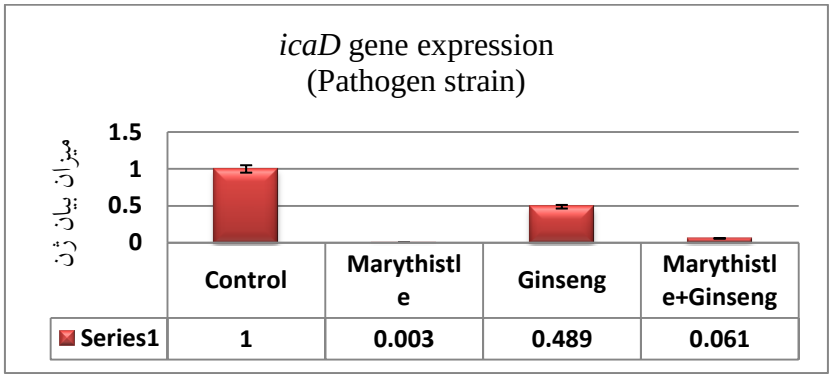
بررسی بیان ژن *icaD* در سویه‌های پاتوژن

میزان بیان ژن *icaD* سویه پاتوژن در نمونه‌های تیمار شده با عصاره خارمریم، تیمار شده با جینسینگ و تیمار توام با عصاره خارمریم و جینسینگ مقایسه شد. بر این اساس، کاهش بیان ژن *icaD* تحت تیمار با عصاره‌های خارمریم، جینسینگ و عصاره‌های ترکیبی مشاهده شد. عصاره خارمریم به‌تنهایی بیان این ژن را به‌طور تقریبی به صفر رساند. جینسنگ نیز در کاهش بیان این ژن مؤثر بود و بیان *icaD* را به نصف کاهش داد. تیمار هم‌زمان سویه پاتوژن باکتری *S. aureus* با عصاره‌های دو گیاه مورد آزمایش، کاهش ٩٤ درصدی در بیان این ژن بیوفیلم نشان داد (شکل ٤).

بحث

امروزه عفونت‌های بیمارستانی از بزرگ‌ترین مشکلات جهان بوده و یکی از عوامل ایجاد آن میکروارگانیسم‌های گرم مثبتی مانند *S. aureus* می‌باشند (Rahimi Alang et al. 2011). علم پزشکی در سال‌های اخیر در مورد شناخت و جلوگیری از بیماری‌ها پیشرفت بسیار سریعی داشته ولی در عین حال مصرف بیش از اندازه داروهای شیمیایی منجر به افزایش سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ٤- اطلاعات حاصل از آنالیز نتایج Real time PCR مربوط به سویه پاتوژن *S. aureus* تحت تیمار جینسینگ و خارمریم (نمونه کنترل، بیان ژن *icaD* بدون تیمار با عصاره گیاهی بوده و از ژن مرجع *16s rRNA* استفاده شده است)

از این رو محققان برای برطرف کردن این معضل به مطالعه گیاهان دارویی روی آورده‌اند (Hasanloo et al. 2014). عصاره‌های گیاهی مانند ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی، بیوفیلم باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را تحت تاثیر قرار می‌دهند. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاهان شناخته شده و دارای اثرات ضد باکتریایی می‌باشند (Shojaei et al. 2018). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که استفاده از عصاره گیاهان دارویی از روش‌های کاربردی در کنترل شکل‌گیری و توسعه بیوفیلم می‌باشد (Habibipour and Moradi Haghgou 2015).

در این بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی خارمریم و جینسینگ روی سویه‌های استاندارد و پاتوژن بررسی شد و مشخص شد که توانایی رشد سویه‌ها در غلظت‌های بالای حاوی عصاره‌های خارمریم و جینسینگ به یک اندازه بوده و تمامی سویه‌ها رشد کرده‌اند. بر پایه نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌ها در برابر غلظت‌های بالای عصاره‌های گیاهی مقاوم بودند. در روش دیسک فیوژن قطر هاله عدم رشد سویه پاتوژن تحت تیمار با عصاره خارمریم بیشتر از سویه با تیمار جینسینگ بود و این امر نشان‌دهنده میزان بازدارندگی بیشتر عصاره خارمریم است (Hasanloo et al. 2014).

در مطالعه حاضر مشخص شد که عصاره‌های خارمریم و جینسینگ و ترکیبی از عصاره‌های این دو گیاه در سویه‌های استاندارد منجر به افزایش بیان ژن بیوفیلم *icaD* شدند در حالی‌که در سویه‌های پاتوژن، میزان بیان ژن تحت تیمار با عصاره خار مریم به ۰/۳ درصد، جینسینگ به ٤٨ درصد و ترکیب دو عصاره، به ٦ درصد کاهش یافت. این یافته‌ها حاکی از احتمال وقوع جهش و ایجاد ژنوتیپ‌های جدید در سویه‌های پاتوژن است. این یافته‌ها می‌تواند حاکی از آن باشد که هرچند دو سویه پاتوژن و استاندارد مورد مطالعه از لحاظ فنوتیپی و آزمون‌های آنتی بیوگرام و MIC مشابه هستند ولی احتمالاً به‌دلیل وقوع جهش در توالی ژن بیوفیلم *icaD* و یا توالی تنظیمی این ژن، تفاوت‌های ژنتیکی در دو سویه مورد مطالعه ایجاد شده و تأثیرپذیری این دو سویه نسبت به تیمار عصاره‌های خارمریم و جینسینگ، کاملاً متفاوت شده است به‌طوری که این عصاره‌ها در سویه استاندارد باعث افزایش بیان *icaD* و در سویه پاتوژن منجر به کاهش بیان این ژن شده‌اند. بر اساس نتایج تحقیق Heydari et al. (2018) بیوفیلم‌ها منجر به ایجاد سویه‌های ژنوتیپی جدید در اثر جهش می‌گردند. همچنین در مطالعه دیگری نیز نشان داده شده است که عصاره گیاه گل بی‌مرگ برروی تشکیل بیوفیلم و ژن *icaD* تاثیر دارد و باعث کاهش بیان این ژن می‌شود (Mirzaie et al. 2017) که هر دو مورد با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌سو بودند.

Shojaei et al. (2018) نشان دادند که عصاره الکلی آرتمیزیا در غلظت‌های بالا باعث مهار بیان ژن‌های بیوفیلم *icaA*، *icaD* در MRSA سویه ATCC33591 می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت. بیوفیلم که شامل اجتماعی از باکتری‌ها است توسط گروه خاصی از اپرون‌ها به‌نام ICA کد می‌شود. یکی از لوکوس‌های ژنی *icaD* می‌باشد که توانایی انتقال پیام به سایر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

ژن‌ها را دارد (Heydari et al. 2018). Shahkarami and (2016) Rashki در تحقیقات خود نشان دادند که از ۲۷ جدایه *S. aureus*، ۲۲٪ دارای *icaA*، ۳۰٪ دارای *icaD*، ۱۱٪ دارای *icaB* و ۱۵٪ دارای *icaC* هستند که با تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. در مطالعه Puri et al. (2015) اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاه خارمریم علیه چندین باکتری گرم مثبت از جمله *S. aureus* به اثبات رسید که با نتایج مطالعه حاضر هم‌سو بود. همچنین Beccaria et al. (2018) نشان دادند که عصاره جینسینگ از طریق کاهش بیان ژن‌های موثر در بیماری‌زایی *S. aureus*، باعث کاهش فعالیت این باکتری در جانورانی مانند گاو می‌گردد که با نتایج یافته حاضر منطبق بود.

با توجه به موارد ذکر شده در مطالعه حاضر پیشنهاد می‌شود که تعداد سویه‌های بیشتری از *S. aureus* مورد مطالعه قرار گیرد و نیز برای بررسی بیان یا عدم بیان ژن، از عصاره‌های گیاهی مختلفی استفاده شود. در مرحله بعد، تاثیر عصاره‌های گیاهی جینسینگ و خارمریم بر بیان سایر ژن‌های این سویه بررسی شود و در نهایت، تأثیر عصاره‌های گیاهی خارمریم و جینسینگ بر روی تولید فنوتیپی بیوفیلم نیز مورد سنجش قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره گیاهی خارمریم و جینسینگ توانایی از بین بردن سویه‌های *S. aureus* حاوی ژن بیوفیلم *icaD* را دارا هستند. ولی تأثیرگذاری عصاره خارمریم در مهار ژن بیوفیلم *icaD* بسیار بیشتر از عصاره جینسینگ در سویه پاتوژن *S. aureus* بود. این تحقیق، تفاوت ژنتیکی دو سویه استاندارد و پاتوژن *S. aureus* را نشان داد و مشخص کرد که این تفاوت ژنی در حدی است که عصاره‌های گیاهی خارمریم و جینسینگ در یک سویه می‌توانند منجر به افزایش بیان و در سویه دیگر همین باکتری منجر به کاهش بیان ژن گردند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مساعدت و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به‌دلیل حمایت‌های لازم از پژوهش حاضر قدردانی می‌شود.

منابع

Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Than LTL, Awang Hamat R, Karunanidhi A, Alreshidi MA, Ghaznavi-Rad E, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Chong Seng JS, Jeevajothi Nathan J, Chong PP (2012) Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus.* Journal of Biomedicine and Biotechnology DOI: 10.1155/2012/976972.

Beccaria C, Silvestrini P, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE, Baravalle C (2018) *Panax ginseng* extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells but does not affect macrophages phagocytic activity. Microbial Pathogenesis 122: 63-72.

Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. Journal of Bacteriology 186:4665-4684.

Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A (1998) Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. Z-Ernahrunqswiss 37:147-63.

Faezizadeh Z, Gharib A, Godarzee M (2014) Investigation of antibacterial activity of silymarin-loaded nanoliposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Advances in Medical and Biomedical Research 22:86-95. (In Farsi).

Habibipour R, Moradi Haghgou L (2015) Study on hydro-alcoholic extract effect of pomegranate peel on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences 22:195-202. (In Farsi).

Hasanloo T, Salehi M, Sepehrifar R, Farahmand S (2014) The effect of different doses of silymarin, extracted from the seeds of the *Silybum marianum* L. *Gaertn* on the growth of 6 bacterial species. Research in Medicine 38:193-199.

Heydari N, Tahmasebi H, Zeini B, Dehbashi S (2018) Expression of aap and icaR genes involved in biofilm production in clinical strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and gentamicin. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 23:64-75.

Hosseini A, Zare S, Ghaderi P, Ahmadi A (2011) Effects of vitamin e and ginseng extract on fertility changes induced by cyclophosphamide in rats. Journal of Reproduction and Infertility 11:227-237. (In Farsi).

Khakpour SH, Khosravi M, Masoompour Askari S (2009) Antidepressant effect of red ginseng hydro-alcoholic

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

extract by forced swimming and tail suspension tests in female mice. Biological Sciences 4:15-20. (In Farsi).
Mahdavi M, Kasra Kermanshahi R, Jalali M (2008) The assessment of disinfectants on various bacterial biofilms. Research Journal of University of Isfahan "Science" 31:35-46. (In Farsi).
Mirzaie A, Noorbazargan H, Khatami H, Sadat Shandiz A, Rahimi A, Bagheri Kashtali A (2017) Valuation of chemical composition of *Helichrysum artemisioides* extract its effect on biofilm formation and icad gene expression in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ilam University of Medical Sciences 25:180-194. (In Farsi).
Nikzad Z, Chaji M, Mirzadeh KH, Mohammadabadi T, Sari M (2015) Effect of diets containing different levels of milk thistle and grains with different degradation rate on rumen fungi of Khuzestan buffalo. Journal of Veterinary Research 70:213-225. (In Farsi).
Puri S, Sidhu MC, Tewari R, Sharma A (2015) Study of phytochemicals, trace elements and antibacterial activity of *Silybum marianum*.Gaertn. Journal of Plant Science and Research 2:1-5.
Rahimi Alang S, Asmar M, Cheraghali F, Yazarlou S, Amini A, Shakeri F, Ghaemi E (2011) Frequency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers in Gorgan. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 13:17-22. (In Farsi).
Shahkarami F, Rashki A (2016) Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Iranian Journal of Medical Microbiology 9:16-23. (In Farsi).
Shojaei GH, Akhavan Sepahy A, Rafiei Tabatabaei R, Tahvildari K (2018) The effects of ethanolic extract of *Artemisia oliveriana* on expression of icaa, icad, and ebps genes in mrsa: a short report. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services 17:169-176. (In Farsi).
Tabaei S, Kouhi Noghondar M, Mohammadzadeh M, Ataei L, Amel Jamehdar S (2016) Pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) strains isolated from clinical specimens: Imam Reza hospital in Mashhad. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 59 :64-70. (In Farsi).
Vaziri MS, Mirzaii M, Kalalian Moghadam H, Fazli M, Khoramrooz SS, Darban Sarokhalil D, Yaslianifard S (2016) The Relationship between antibiotic resistance and Agr type in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from burn wound of hospitalized patient in Tehran. Journal of Knowledge and Health 11:DOI: 10.22100/jkh.v11i1.1199. (In Farsi).
Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. Journal of Biotechnology 186:1838-1850.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]