

# Evaluation of the Expression of NLRP1 Inflammasome in Patients with Bacterial Septicemia

Hamid Mosahasankhani<sup>1</sup> , Ashraf Kariminik<sup>1\*</sup> 

1. Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

 [10.30699/ijmm.14.3.201](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.3.201)



## ABSTRACT

**Background:** Septicemia is the most important cause of mortality, especially in hospitalized patients, due to the influence of the immune response by infection. NLRP1 (Nod-like receptor P1) is an intracellular receptor that recognizes microbial-dependent molecular patterns. The main intracellular mechanism of anti-septicemia is still being investigated. The purpose of this study was to evaluate the expression of NLRP1 genes in patients with septicemia compared to healthy controls.

**Materials & Methods:** This cross-sectional study was done on 40 blood samples in patient with septicemia and 40 healthy controls using quota sampling. Bacterial species were identified by microbial culture. *NLRP1* gene expression was evaluated using Real Time PCR technique.

**Results:** Four bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* reported for causes of septicemia. The results also showed that the expression of NLRP1 inflammasome at mRNA level was significantly increased in patients with septicemia compared to healthy controls. NLRP1 gene expression was not different among patients with different bacterial infections.

**Conclusion:** NLRP1 appears to be an important receptor against bacteria during bacterial bloodstream infection, and further research, particularly in reducing the expression level of NLRP1 molecules, may play a key role in blood decontamination.

**Keywords:** Septicemia, NLRP1 (Nod-like receptor P1), gene expression

Received: 2020/02/28; Accepted: 2020/06/16; Published Online: 2020/06/18

**Corresponding Information:** Ashraf Kariminik, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. Email: a.kariminik@iauk.ac.ir



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Mosahasankhani H, Kariminik A. Evaluation of the Expression of NLRP1 Inflammasome in Patients with Bacterial Septicemia. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (3) :

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

Blood is one of the body's fluids that must be free of any microorganisms in a healthy state. However, under certain conditions, it may change and microorganisms may be transferred to the circulatory system and cause a blood infection. Currently, septicemia is one of the leading causes of death in critically ill patients in the intensive care unit (1,26). Gram-negative bacteria are among the most important causes of toxic septicemia, which has been on the rise in the last 20 years (2). The severity of the disease to some extent determines the

outcome of disease. In fact, mortality might occur in septicemia in up to 30%, severe septicemia in 50% and septic shock in 80% (3). At least part of the mortality in septicemia is due to a lack of specific warning clinical signs in its early diagnosis. In addition, the lack of a specific infection marker to diagnose the disease has led to problems in distinguishing infectious agents from non-infectious ones. For this reason, many studies have been conducted in recent decades to access markers that can be used to detect early toxic septicemia. Some recent

studies have reported an increase in serum procalcitonin levels in this group of patients (4). Cytokines play a major role in causing septicemia (5). The mechanism of induction of cytokine production in patients with septicemia has not yet been established. The gene expression of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes following septicemia is one of the causes of inflammation and induction of cytokine production in this group of patients. Inflammasomes are a group of cytoplasmic receptors as multi-protein complexes of the innate immune system that are activated in parenchymal and non-parenchymal liver cells and include AIM2, NLRP3, NLRP1 and NLRC4 (6). Stimulation of each of these molecules activates Caspase 1 by the ASC molecule, followed by Caspase 1 leading to activation of Pro-IL-1 and Pro-IL-18 inflammatory cytokines (7). Some studies have suggested that NLRPs may be important regulators of inflammation in microbial infections. The present study was performed to compare the expression of NLRP1 gene expression in patients with toxic bacterial septicemia. Attempts are being made to use the Real time PCR method as a new assay in diagnosing comparisons between NLRP1 gene expression in patients with septicemia and the control group with a general understanding of the human immune system, especially inflammatory cytokines and the *NLRP1* gene rely on the background of the research to be presented.

## Materials and Methods

### Blood Sampling and Culture

This cross-descriptive study was performed in 2018 during 6 months on 40 blood samples of patients with septicemia and 40 blood samples from healthy control individuals in Afzalipour Hospital in Kerman, as an available sample. Sampling was performed based on the hospital's routine treatment of patients and no blood sampling was performed solely for the present study. In addition, these patients were in the middle age group and did not have underlying diseases such as diabetes. 5 to 10 mL of blood from people with symptoms of septicemia was confirmed on a liquid blood culture medium with the approval of a specialist doctor, and blood culture glasses were incubated for 48 hours at 37°C (8). Then, blood culture was performed in aseptic conditions on Blood Agar and Mc-Conkey agar culture medium by streak method. From the grown and positive samples, bacteriological diagnostic tests including Gram staining, biochemical and diagnostic tests were performed to identify the bacterium causing infection (8).

### RNA Extraction and cDNA Synthesis

Buffy coat from a blood sample, 40 patients with septicemia and 40 healthy controls were obtained. The RNA extraction was performed using the based RNX-Plus kit (Cinaclon, Iran) protocol (9). After extracting RNA, the quantity and quality of RNA were evaluated by UV spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. In the spectrophotometric method, the concentration of RNA sample was measured using 260 nm wavelength absorption determination. The ratio of A260 / A280 was used to determine the purity of RNA. Samples with the appropriate OD (range 1.8 to 2) were selected for the next steps. In the electrophoresis method, 3 microliters of RNA dissolved in deionized water were used on 1% agarose gel. The presence of two 18S and 28S ribosomal bands indicated that RNA was purity. After extracting the appropriate quality RNA, it is necessary to convert it to cDNA to start RT-PCR. This was performed using the reversal transcriptase. For cDNA synthesise Pars Toos kit (Iran) was used. Thus, the cDNA generated was maintained at -20°C until the real time PCR was performed and expression of the *NLRP1* gene was assessed (10).

### Gene Expression

To investigate gene expression, Cyber-Green real time PCR was used. To design the primers, the site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) and the Primer Blast software were used to evaluate the capabilities of these primers based on their physical and chemical properties, the specificity of the primers, and the possibility of their compatibility with other organisms. The Oligo and Nucleotid Blast programs were then used for more accurate primer verification. Primers designed by Iran Takapozist Company were synthesized. The sequence of primers used for NLRP1: F: 5'-ACTCTCCCTATTCTCCCCTAC-3', R: 5'-GCTGTCTCAAAACACCCTTCTC-3', and for beta actin: F: 5'-GGCACCCAGCACAATGAAG-3', R: 5'-CCGATCCACACGGAGTACTTG-3'. A suitable amount of deionized distilled water was added to the primers to obtain a 100 pmol/μL concentration. A certain volume was separated from the original solution and the residue was stored at -20°C. Before examining the gene expression, to evaluate the quality of the genes studied and also to determine the optimal value of the primer and the connection temperature of the primer, the molecular method of PCR with temperature gradient was used. Therefore, in each reaction, different concentrations of primer (5 and 10 picomoles) were used and the thermocycler system temperature gradient program was used to determine the optimal connection temperature. To perform PCR in a 0.2 mL sterile microtube, the following ingredients were added (Table 1) and then the microtubes were placed in a thermocycler and the system was set up in accordance with Table 2 protocol. For gene expression, SYBR Premix Ex Taq II Kit (Takara, Japan) using the design and optimized primers according to the kit instructions was used (11).

**Table 1.** PCR protocol for *NLRP1* and  $\beta$ -Actin

Materials	( $\mu$ l)	Concentration
Buffer 10X PCR	2.5	1X
dNTP 10nM	0.5	0.2 mM
Mgcl2 50mM	0.75	1.5 mM
Taq DNA Polymerase 5unit/ $\mu$ L	0.25	1.5 unit
Forward primers 10 $\mu$ M	0.5	1 $\mu$ M
Reverse primers 10 $\mu$ M	0.5	1 $\mu$ M
Distilled water	15	---
cDNA	5	---
Final volume	25	---

**Table 2.** Time program of thermal cycler for *NLRP1* and  $\beta$ -Actin

Stage	Tem( $^{\circ}$ C)	Time	No. of Cycles
Pre-denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	1 min	35
Annealing	55-63	55 Sec	
Extension	72	1 min	
Final extension	72	5 min	1

### Melt Curve Analysis

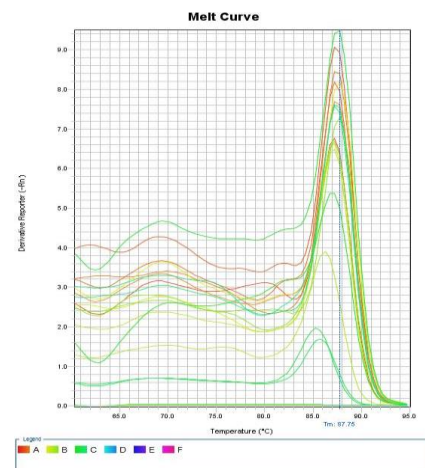
By analyzing the melting curve, the existence of non-specific bonds and dimmer primers can be detected. In the real-time PCR method, in addition to controlling DNA synthesis during the reaction and drawing the multiplication diagram, the melting point of the product was determined at the end of the reaction and the melting curve was drawn. This was done after the PCR process was completed. All PCR products produced by a particular pair of primers have the same melting point, as Cybergreen is unable to distinguish between target DNA and other long-distance DNAs. Using the melting curve, the variety of products in the PCR process can be examined. The melting diagram was drawn for each sample by measuring the fluorescence changes at different temperatures. The sudden decrease in the intensity of the fluorescence that occurs with the opening of the DNA strand can be seen as a peak in this curve. Each peak represents  $T_m$ , a PCR product.

### Data Analysis and Statistical Methods

The differences between patients with septicemia and healthy controls and female compared to male were calculated using Mann–Whitney U test, and the differences among the patients infected with various bacteria were examined using Kruskal–Wallis test using SPSS software version 18. P-value was considered significant at  $<0.05$ . Measurement of gene expression was measured using the conventional Livak method and with the evaluation of  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

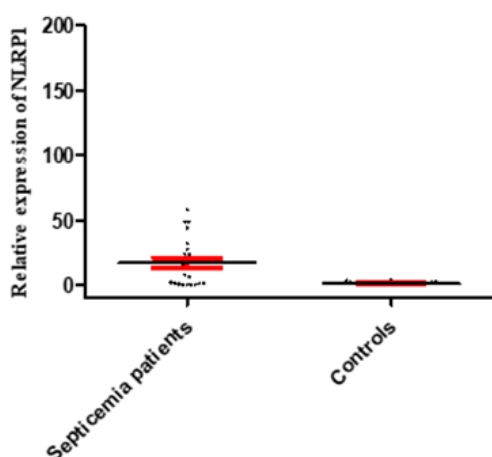
### Results

The results of blood culture were determined by observing the growth of bacteria. *Escherichia coli*: 7, *Staphylococcus aureus*: 10, *Acinetobacter baumannii*: 17 and *Pseudomonas aeruginosa*: 6 cases were responsible for septicemia in patients. The results of primer temperature optimization showed that the best temperature for connecting primer for *NLRP1*, beta-actin were  $57^{\circ}\text{C}$  and  $58^{\circ}\text{C}$ , respectively. The melting curve also confirmed the accuracy and specificity of the *NLRP1* gene expression (Figure 1). Based on the obtained diagram, it was observed that these genes had only one peak in the temperature range of  $85$  to  $90^{\circ}\text{C}$ , which indicates that they are single-band and the specificity of the related reaction and non-contamination.

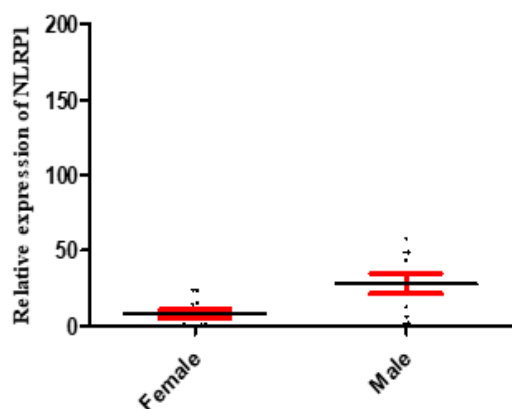
**Figure 1.** Melting curve of *NLRP1* gene

### Results of Inflammasome NLRP1 Gene Expression in Septicemia Patients and Control Group

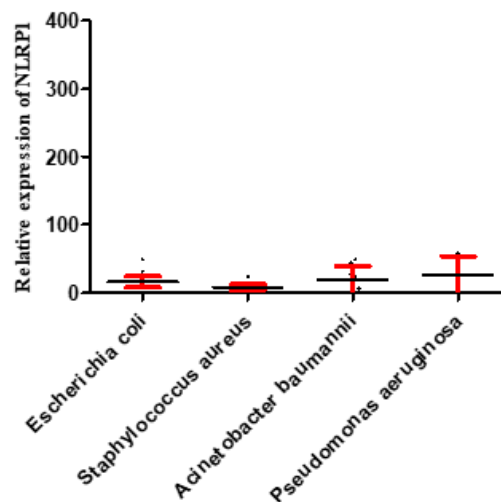
Inflammasome NLRP1 had a significant increase in expression in people with septicemia compared to healthy controls, as shown in Figure 2. As shown in Figure 3, the expression of the *NLRP1* gene in men was higher than women. Figure 4 shows that there is no significant difference in the expression of *NLRP1* gene expression in relation to the bacteria causing the infection isolated from septicemia samples such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 2.** Expression levels of NLRP1 in septicemia patients and healthy controls. The figure illustrates that the mRNA levels of NLRP1 was significantly increased in septicemia patients compared to healthy ones.



**Figure 3.** NLRP1 expression levels in male and female patients with septicemia. The results show that NLRP1 at the mRNA level significantly increased in male patients ( $28.06 \pm 6.76$ ) compared to women ( $2.82 \pm 2.86$ ) in septicemia patients ( $p = 0.011$ ).



**Figure 4.** Expression levels of NLRP1 in septicemia patients infected with various bacteria. The figure illustrates that the mRNA levels of MDA5 and RIG-1 did not significantly differ among groups.

### Discussion

Septicemia is the third leading cause of death after lung infection and AIDS, and is the most common cause of death in the intensive care unit, given the growing trend and subsequent problems, including septic shock and in the last 20 years; the trend has been increasing (12). Septicemia caused by gram-negative bacteria is more deadly than other bacteria, but gram-positive bacteria, anaerobes, fungi, and even viruses can be among the etiologies of these bacteria (13, 14). At least part of the cause of death due to septicemia is due to a lack of specific clinical signs for early diagnosis. In addition, the absence of specific markers of infection in this disease has led to problems in differentiating the syndrome of systemic inflammatory response caused by infectious agents from non-infectious, which in turn leads to low consumption or in some cases high consumption of antimicrobial agents (15). The presence of clinical symptoms alone is not enough to diagnose septicemia and a prompt and appropriate diagnosis of toxic sepsis should be a daily challenge for the emergency department and the intensive care unit. Today, various treatments have improved the survival of patients with septicemia, so a prompt and correct diagnosis is essential. Septicemia has no specific symptoms, microbial culture requires time, and does not show a systemic inflammatory response. At the same time, it does not show a defect in the function of organs and may not yield positive results in some patients with septicemia for various reasons. Septicemia is a systemic reaction of the body to invasive microorganisms, including bacteria and fungi

(16). About two-thirds of septicemia occurs in hospitalized patients, with a number of factors such as increasing population age, increasing duration of chronic disease, use of antibiotics and corticosteroids, and mechanical and intravascular devices to increase its incidence (1). Septicemia usually occurs in people with weakened immune systems (17). In the present study, similar to previous studies, the prevalence of toxic sepsis was determined, especially in hospitalized individuals, and this could be due to nosocomial infections, the use of catheters, and contaminated instruments. The highest levels of contamination in the present study were related to gram-negative bacteria, and 42.5% of the infections were caused by *Acinetobacter baumannii*. This bacterium is also one of the major causes of nosocomial infections, especially in the intensive care unit, and has a wide range of antibiotic resistance (27). Primary and innate immune responses play a key role in eradicating infections from tissues, including blood (18) and since NLRP1 and NLRP3, as intracellular receptors, play an important role in inducing primary immune responses; these molecules appear to play an important role in inducing primary immune responses against septicemia-causing bacteria (19). NLRP1 is one of the first known inflammasomes. In some bacterial infections, the path of pyroptosis is activated. ATP leakage from inflammatory macrophages and its entry into the cell through the connexin canal and ATP binding to the P2X7 receptor lead to NLRP1 activation. Decreased cellular ATP activates NLRP1. The two anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL prevent the activation of NLRP1. NLRP1 ability to detect cellular energy levels may establish a link between metabolism and the immune system. Some studies have suggested that NLRP1 may be a sensor for hematopoietic stress and an important regulator of inflammation (6, 20). In the present study, NLRP1 also had a significant increase in expression in patients with septicemia compared with the control group.

Investigations have shown that 3NLRP molecules play an important role in identifying and responding appropriately against intracellular infections (21). Other studies suggest that Inflammasome NLRP3 acts as part of the host defense against a large group of activated bacterial, fungal, and viral pathogens, producing IL-18 and IL-1 (22). Another study found that the innate immune system produces a set of cytoplasmic sensors that are activated against viral infections. Activation of these sensors leads to the production of interferon type 1, inflammasome activity, and the production of inflammatory IL-1 and IL-18 cytokines (23). Another study showed that inflammasomes play an important role in causing cirrhosis as well as liver cancer following liver inflammation (24). A study of patients with hepatitis C also found that NLRP3, as one of the inflammasomes, played an important role in activating IL-1 by identifying components of the hepatitis C virus (25).

## Conclusion

NLRP1 appears to be an important receptor for bacteria during bacterial bloodstream infection, and further research, especially in reducing the expression of NLRP1 molecules, could play a key role in purifying the blood. Determine the cause of infection.

## Acknowledgment

We thank from colleagues of the Microbiology Research Laboratory and the Research Department of the Islamic Azad University, Kerman Branch.

## Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



## بررسی بیان ژن کدکننده اینفلامازوم Nod-like receptor P1 در بیماران مبتلا به

سپتیسمی باکتریایی بستری در بیمارستان افضلی پور کرمان در سال ۱۳۹۷

حمید موسی حسنخانی<sup>۱</sup>، اشرف کریمی نیک<sup>۱\*</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** سپتیسمی مهمترین عوامل مرگ و میر افراد به‌ویژه در بیماران بستری بوده و تحت تأثیر پاسخ ایمنی توسط عفونت به وجود می‌آید. (NLRP1) Nod-like receptor P1 گیرنده داخل سلولی است که الگوهای مولکولی وابسته به میکروب‌ها را تشخیص می‌دهد. مکانیسم داخل سلولی اصلی بر علیه سپتیسمی هنوز در حال بررسی است. مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی میزان بیان اینفلامازوم NLRP1 در افراد مبتلا به سپتیسمی در مقایسه با افراد سالم گروه کنترل بوده است.

**مواد و روش کار:** این مطالعه مقطعی-توصیفی بر روی ۴۰ نمونه خون فرد مبتلا به سپتیسمی و ۴۰ نمونه خون گرفته شده از افراد کنترل سالم به‌صورت نمونه‌گیری در دسترس، انجام گرفت. عوامل باکتریایی موجود در خون بیماران به‌وسیله کشت میکروبی مشخص شدند. میزان بیان ژن NLRP1، با استفاده از تکنیک ریل تایم پی سی آر ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** چهار باکتری اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، اسیتوباکتر بومانی و سودوموناس آئرژینوزا از علل سپتیسمی در بیماران گزارش شدند. همچنین نتایج نشان داد که بیان اینفلامازوم NLRP1 در سطح mRNA در بیماران مبتلا به سپتیسمی در مقایسه با افراد سالم گروه کنترل دارای افزایش معنی‌داری بوده است. میزان بیان ژن NLRP1 در میان بیماران با عفونت‌های باکتریایی مختلف تفاوتی نداشت.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که NLRP1 گیرنده مهمی در برابر باکتری‌ها در عفونت خونی-باکتریایی باشد و تحقیقات بیشتر، به‌خصوص در کاهش میزان بیان مولکول‌های NLRP1 می‌تواند نقش اصلی در برابر پاکسازی خون از علل عفونت را رقم بزند.

**کلیدواژه‌ها:** سپتیسمی، (NLRP1) Nod-like receptor P1، بیان ژن

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۰۹

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۳/۲۹

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

اشرف کریمی نیک، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران  
ایمیل: a.kariminik@iauk.ac.ir

### مقدمه

خون یکی از مایعات بدن است که در حالت سلامت شخص بایستی عاری از هر نوع میکرواورگانیسم باشد. اما در شرایطی ممکن است دستخوش تغییرات شود و میکرواورگانیسم‌ها به سیستم گردش خون انتقال یابند و عفونت خون ایجاد شود. در حال حاضر سپتیسمی از علل اصلی مرگ در بیماران شدیداً بدحال بستری در بخش مراقبت‌های ویژه محسوب می‌شود (۱، ۲). باکتری‌های گرم منفی از جمله مهم‌ترین علل سپتیسمی هستند که در بیست سال اخیر روند ابتلا به آنها رو به افزایش بوده است (۲). شدت بیماری تا حدودی نتیجه بیماری را تعیین می‌کند و در واقع سپتیسمی یا گندخونی معمولی تا ۳۰٪، گندخونی شدید تا ۵۰٪ و نوع شوک

سپتیک تا ۸۰٪ خطر مرگ دارند (۳). حداقل بخشی از وقوع مرگ و میر در سپتیسمی به علت کمبود علائم بالینی هشداردهنده اختصاصی در تشخیص زودهنگام آن است. همچنین نبود مارکر اختصاصی عفونت جهت تشخیص این بیماری منجر به بروز مشکلاتی در افتراق عوامل عفونی از غیر عفونی شده است. به همین دلیل مطالعات زیادی در دهه اخیر برای دسترسی به مارکری که بتوان از آنها برای تشخیص زودرس سپتیسمی استفاده نمود، انجام شده است. در برخی از مطالعات اخیر افزایش سطحی سرمی پرو کلسیتونین نیز در این دسته از بیماران گزارش شده است (۴). سابتوکاین‌ها نقش عمده‌ای در ایجاد التهاب متعاقب سپتیسمی ایفا

کشت افتراقی مکانیکی آگار به روش استریک انجام شد. از نمونه‌های رشد کرده و مثبت شده تست‌های تشخیصی باکتریولوژی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی و تشخیصی برای شناسایی باکتری عامل عفونت انجام گرفت (۸).

### استخراج RNA و سنتز cDNA

از نمونه خون ۴۰ فرد مبتلا به سپتی‌سمی و ۴۰ فرد کنترل سالم، بافی کوت تهیه شد و با استفاده از پروتکل کیت RNX-Plus ساخت شرکت سیناکلون، ایران، استخراج RNA انجام شد (۹). پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش اسپکتروفتومتری غلظت نمونه RNA، با استفاده از تعیین جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین خلوص RNA از محاسبه نسبت A260/A280 استفاده شد. نمونه‌های دارای OD مناسب (محدوده ۱/۸ تا ۲) برای انجام مراحل بعد انتخاب شدند. و در روش الکتروفورز ۳ میکرولیتر از RNA حل شده در آب دیونیزه بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. وجود دو باند ۱۸S و ۲۸S ریبوزومی نشان‌دهنده سالم بودن RNA بوده است. پس از استخراج RNA با کیفیت مناسب لازم است که برای شروع RT-PCR به cDNA تبدیل گردد. این عمل با استفاده از خاصیت آنزیم ریورس ترانس کریپتاز انجام می‌شود. برای سنتز cDNA، از کیت پارس توس، ایران، استفاده شد. به این ترتیب cDNA ساخته شده تا زمان انجام ریل تایم پی سی آر و بررسی بیان ژنی اینفلامازوم NLRP1 در دمای ۲۰°C- نگهداری شد (۱۰).

### بیان ژن

برای بررسی بیان ژن، از ریل تایم پی سی آر روش سایبرگرین استفاده شد (۱۱). ژن بتا اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد. به منظور طراحی پرایمرها، از سایت [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) و نرم‌افزار Primer Blast استفاده شد تا توانایی این پرایمرها بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، اختصاصیت پرایمرها و احتمال وجود همولوژی آنان با سایر ارگانیزم‌ها مورد بررسی قرار گیرد. سپس به‌منظور تأیید دقیق‌تر پرایمرها از برنامه Oligo و Nucleotid Blast استفاده شد. پرایمرهای طراحی شده به‌وسیله شرکت تکاپوزیست ایران سنتز شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای NLRP1: F: 5'-ACTCTCCCTCATTCCCCTAC-3'، R: 5'-GCTGTCTCAAACCCCTTCTC-3' و برای بتا اکتین: F: 5'-GGCACCCAGCACAATGAAG-3' و R: 5'-

می‌کنند (۵). مکانیسم القای تولید سایتوکاین‌ها در بیماران مبتلا به سپتی‌سمی هنوز مشخص نشده است. بیان ژنی اینفلامازوم‌های NLRP1 و NLRP3 به دنبال سپتی‌سمی به‌عنوان یکی از عوامل ایجادکننده التهاب و القای تولید سایتوکاین‌ها در این دسته از بیماران مطرح است. اینفلامازوم‌ها گروهی از گیرنده‌های سیتوپلاسمی به‌صورت کمپلکس‌های مولتی پروتئین سیستم ایمنی ذاتی هستند که در سلول‌های کبدی پارانشیمال و غیر پارانشیمال فعال می‌شوند و شامل 2AIM، 3NLRP، 1NLRP و 4NLRC هستند (۶). تحریک هر یک از این مولکول‌ها موجب فعال شدن 1Caspase به‌واسطه مولکول ASC می‌شود و به دنبال آن 1Caspase منجر به فعال شدن سایتوکاین‌های التهابی 1-IL-18 و Pro-IL-18 می‌شود. سایتوکاین‌های IL-1 و IL-18 پاسخ بهینه علیه سپتی‌سمی ایجاد کرده و مسیرهای التهابی را فعال می‌کند (۷). بعضی از مطالعات نشان دادند که NLRPها ممکن است به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مهم التهاب در عفونت‌های میکروبی مطرح باشند. تحقیق حاضر به‌منظور مقایسه میزان بیان ژنی اینفلامازوم NLRP1 در بیماران مبتلا به سپتی‌سمی باکتریایی صورت پذیرفت. سعی بر آن است که بتوان با استفاده از روش ریل تایم پی سی آر (RT-PCR) به‌عنوان یک روش نوین در تشخیص مقایسه بین بیان ژن NLRP1 در افراد مبتلا به سپتی‌سمی و گروه کنترل با شناخت کلی از سیستم ایمنی بدن انسان به‌ویژه سایتوکاین‌های التهابی و ژن NLRP1 یک مدل مفهومی با تکیه بر پیشینه پژوهش ارائه گردد.

## روش پژوهش

### نمونه‌گیری و کشت خون

این مطالعه مقطعی-توصیفی در سال ۱۳۹۷ طی مدت ۶ ماه بر روی ۴۰ نمونه خون فرد مبتلا به سپتی‌سمی و ۴۰ نمونه خون گرفته شده از افراد کنترل سالم در بیمارستان افضل‌پور شهر کرمان، به‌صورت نمونه‌گیری در دسترس، انجام گرفت. نمونه‌گیری بر اساس روند معمول درمانی بیمارستان از بیماران گرفته شده و خون‌گیری صرفاً برای انجام تحقیق حاضر به عمل نیامد. ضمناً این بیماران در رده سنی میانسالی قرار داشته و فاقد بیماری‌های زمینه‌ای از قبیل دیابت بودند. میزان ۵ تا ۱۰ سی‌سی از خون از افراد مراجعه‌کننده با علائم سپتی‌سمی با تأیید پزشک متخصص، بر روی محیط کشت مایع خون کشت داده شد و شیشه‌های کشت خون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد (۸). سپس از هر شیشه کشت خون در شرایط اسپتیک، کشت بر روی محیط کشت‌های پایه بلاد آگار و محیط

از برنامه شیب دمایی دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. برای انجام پی سی ار در یک میکروتیوب استریل ۰/۲ میلی لیتری، مواد زیر (جدول ۱) اضافه گردید و سپس میکروتیوبها در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شد و مطابق با پروتکل جدول ۲ سیستم راه اندازی شد. برای بررسی بیان ژن از کیت ریل تایم پی سی آر (SYBR Premix Ex Taq (II، شرکت TAKARA- ژاپن با کاربرد پرایمرهای طراحی و بهینه سازی شده مطابق دستورالعمل کیت استفاده شد (۱۱).

پرایمرها مقدار مناسب آب مقطر دیونیزه اضافه شد تا غلظت  $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$  به دست آید. حجم مشخصی از محلول اصلی جدا و باقی مانده در  $20^\circ\text{C}$  - نگهداری شد. قبل از بررسی میزان بیان ژن، به منظور ارزیابی کیفی ژنهای مورد مطالعه و نیز تعیین بهینه مقدار پرایمر و دمای اتصال پرایمر، از روش مولکولی پی سی آر با شیب دمایی استفاده شد. بدین منظور در هر واکنش غلظت های مختلف پرایمر (۵ و ۱۰ پیکومول) به کار رفت و برای تعیین دمای بهینه اتصال

جدول ۱. پروتکل تهیه مواد پی سی آر برای ژن های NLRP1 و ACTIN  $\beta$  -

غلظت نهایی	مقدار ( $\mu\text{l}$ )	مواد و غلظت اولیه
X1	۲/۵	Buffer 10X PCR
Mm۰/۲	۰/۵	dNTP 10nM
mM۱/۵	۰/۷۵	Mgcl2 50mM
unit۱/۵	۰/۲۵	Taq DNA Polymerase 5unit/ $\mu\text{L}$
$\mu\text{M}$ ۱	۰/۵	Forward primers 10 $\mu\text{M}$
$\mu\text{M}$ ۱	۰/۵	Reverse primers 10 $\mu\text{M}$
---	۱۵	آب مقطر
---	۵	cDNA
---	۲۵	حجم نهایی

جدول ۲. برنامه زمانی ترمال سیکلر جهت ژن های NLRP1 و ACTIN  $\beta$  -

تعداد سیکل	زمان	دما ( $^\circ\text{C}$ )	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۴	واسرشت اولیه
۳۵	۱ دقیقه	۹۴	واسرشت
	۵۵ ثانیه	۶۳-۵۵	اتصال
۱	۱ دقیقه	۷۲	طولیل شدن
	۵ دقیقه	۷۲	طولیل شدن نهایی

اندازه گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف صورت گرفت. کاهش ناگهانی شدت فلورسانس که با باز شدن دورشته DNA از هم اتفاق می افتد، به صورت یک قله در این منحنی قابل مشاهده است. هر یک از قله ها، نمایانگر  $T_m$  یک محصول پی سی آر است.

### تجزیه و تحلیل داده ها

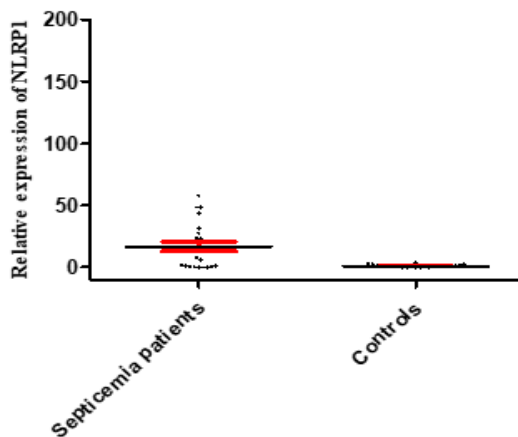
با توجه به توزیع داده های ناهنجاری، آزمون مان-ویتنی U، به منظور تجزیه و تحلیل تفاوت های بین بیماران سستی سمی و گروه کنترل سالم و مردان در مقابل موارد خانمها و آزمون کروسکال-والیس، به منظور تجزیه و تحلیل تفاوت های بین بیماران آلوده به باکتری های مختلف، تحت SPSS نسخه ۱۸ (SPSS Inc.)

### آنالیز منحنی ذوب برای تعیین اختصاصی بودن محصولات

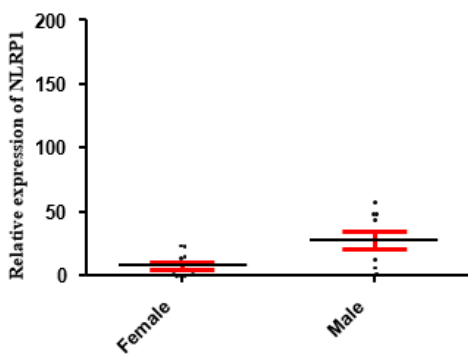
با آنالیز منحنی ذوب می توان وجود باندهای غیر اختصاصی و پرایمر دایمر را تشخیص داد. در روش ریل تایم پی سی آر، علاوه بر کنترل سنتز DNA در واکنش و رسم نمودار تکثیر، نقطه ذوب محصول در انتهای واکنش تعیین و منحنی ذوب ترسیم گردید که این عمل پس از اتمام فرایند پی سی آر انجام گرفت. تمام محصولات پی سی آر که توسط یک جفت پرایمر خاص تولید می شوند دمای ذوب یکسانی دارند. از آن جاکه سایبر گرین قادر به تمایز بین DNA هدف و دیگر DNA های دورشته ای نیست، می توان با استفاده از منحنی ذوب، تنوع محصولات را در فرایند پی سی آر بررسی نمود. رسم نمودار ذوب برای هر نمونه به وسیله



اینفلامازوم NLRP1 دارای افزایش بیان معنی داری در افراد مبتلا به سپتی سمی نسبت به افراد کنترل سالم بود که در شکل ۲ مشخص گردیده است. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است بیان ژن NLRP1 در آقایان از خانمها بالاتر بوده است. در شکل ۴ نشان داده شده است که تفاوت معنی داری نسبت به میزان بیان ژن NLRP1 در ارتباط با باکتری های عامل عفونت جدا شده از نمونه های سپتی سمی از قبیل استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، اسینتوباکتر بومانی و سودوموناس آئروژینوزا وجود ندارد.



شکل ۲. سطوح بیان NLRP1 در بیماران سپتی سمی و کنترل سالم. شکل نشان می دهد که NLRP1 در سطح mRNA در بیماران مبتلا به سپتی سمی نسبت به شاهد سالم در مقایسه با گروه شاهد (۴۰۰ ± ۱۶/۷۷) افزایش یافته است ( $P < ۰/۰۰۱$ ,  $۱۰۰ ± ۰/۲۱$ ).

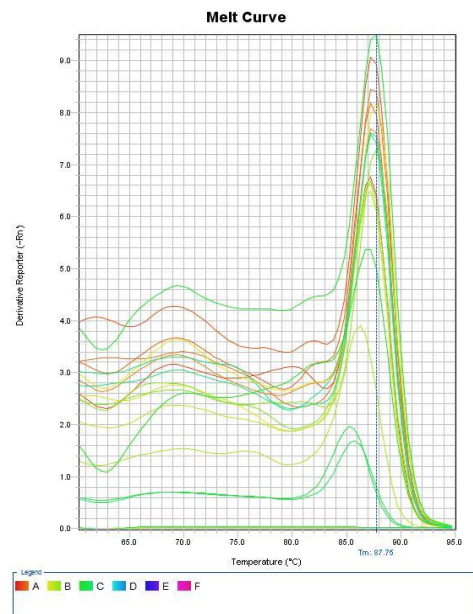


شکل ۳. سطوح بیان NLRP1 در بیماران مرد و زن مبتلا به سپتی سمی. نتایج نشان می دهد که NLRP1 در سطح mRNA به طور معنی داری در بیماران مرد (۶/۷۶ ± ۲۸/۰۴) در مقایسه با زنان (۲/۸۶ ± ۸/۰۲) بیماران سپتی سمی افزایش یافته است ( $P = ۰/۰۱۱$ ).

انجام گرفت. اندازه گیری میزان افزایش بیان ژن از روش مرسوم Livak و با ارزیابی میزان  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ، استفاده شد. مقدار P-value در ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

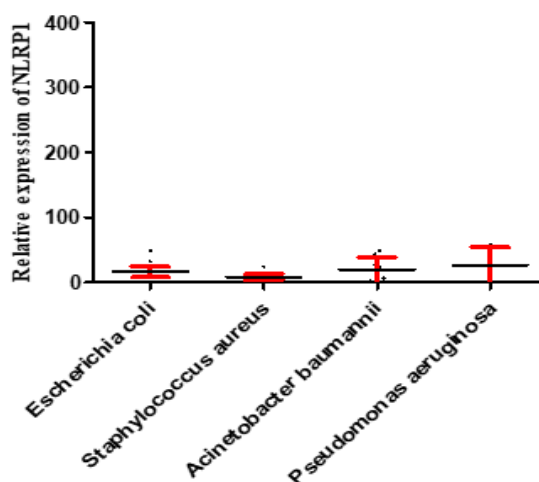
نتایج کشت خون روی محیط های کشت افتراقی و پایه بررسی با مشاهده رشد باکتری ها مشخص گردید و با توجه به نتایج تست های تشخیصی و شناسایی انجام گرفته، باکتری های اشرشیا کلی: ۷ مورد، استافیلوکوکوس اورئوس: ۱۰ مورد، اسینتوباکتر بومانی: ۱۷ مورد و سودوموناس آئروژینوزا: ۶ مورد مسئول سپتی سمی در بیماران مورد نظر بودند. لازم به ذکر است تنها چهار باکتری ذکر شده از نمونه های خون مورد بررسی در مدت تحقیق به دست آمد و معیار ورود باکتری های عامل عفونت به تحقیق تنها همین چهار باکتری بودند. نتایج بهینه سازی دمای پرایمرها نشان داد که بهترین دما برای اتصال پرایمر برای NLRP1 و بتا اکتین به ترتیب ۵۷ و ۵۸ درجه سلسیوس به دست آمد. رسم منحنی ذوب نیز صحت و اختصاصیت بیان ژن NLRP1 مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱). بر اساس نمودار به دست آمده مشاهده شد که این ژن ها فقط یک پیک در محدوده دمایی ۸۵ تا ۹۰ درجه سلسیوس داشته که نشان دهنده تک باند بودن و اختصاصیت واکنش مربوط به آن و عدم آلودگی است.



شکل ۱. منحنی ذوب ژن NLRP1

نتایج بیان ژنی اینفلامازوم NLRP1 در بیماران سپتی سمی و گروه کنترل

ضروری است. سپتی‌سمی فاقد علائم و نشانه‌های اختصاصی است، کشت میکروبی مستلزم صرف وقت بوده و پاسخ التهابی سیستمیک بیمار را نشان نمی‌دهد. در عین حال نقص در عملکرد ارگان‌ها را نشان نداده و ممکن است به دلایل متفاوت در بیماران مبتلا به سپتی‌سمی مثبت نباشد. سپتی‌سمی واکنش سیستمیک بدن به میکروارگانیزم‌های مهاجم از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها است (۱۶). حدود دو سوم موارد سپتی‌سمی در بیماران بستری در بیمارستان اتفاق افتاده و عوامل متعددی مثل افزایش سن جمعیت، افزایش مدت‌زمان ابتلا به بیماری‌های مزمن، استفاده از آنتی‌بیوتیک و کورتیکواستروئیدها و وسایل مکانیکی و داخل عروقی در افزایش بروز آن مشخص شده است (۱). سپتی‌سمی معمولاً در افرادی که دچار ضعف در سیستم ایمنی می‌باشند، اتفاق می‌افتد (۱۷) در مطالعه حاضر هم مشابه مطالعات پیشین، شیوع سپتی‌سمی به ویژه در افراد بستری در بیمارستان‌ها مشخص گردید و این می‌تواند به دلیل عفونت‌های بیمارستانی، استفاده از کاتترها و ابزار آلوده باشد. بیشترین میزان آلودگی در تحقیق حاضر مربوط به باکتری‌های گرم منفی بوده و ۴۲/۵٪ از موارد عفونت را باکتری *اسینتوباکتر بومانی* تشکیل داد. این باکتری از علل عمده عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه در بخش‌های مراقبت ویژه بوده و دارای طیف مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترده‌ای است. پاسخ‌های ایمنی اولیه و ذاتی نقش اساسی برای ریشه‌زدایی عفونت‌ها از بافت‌ها از جمله خون را برعهده دارند (۱۸) و از آنجایی که NLRP1 و NLRP3 به عنوان رسپتورهای داخل سلولی نقش مهمی در القاء پاسخ‌های ایمنی اولیه ایفا می‌کنند به نظر می‌رسد که این مولکول‌ها نقش مهمی در القاء پاسخ‌های ایمنی اولیه بر ضد باکتری‌های ایجادکننده سپتی‌سمی داشته باشند (۱۹). NLRP1 جزء اولین اینفلامازوم‌های شناخته شده است. در بعضی از عفونت‌های باکتریایی باعث فعال شدن مسیر پیروپتوز می‌شود. نشت ATP از ماکروفاژهای التهابی و ورود آن به سلول از طریق کانال کانکسین و اتصال ATP به گیرنده P2X7 منجر به فعال شدن NLRP1 می‌شود. کاهش ATP سلولی باعث فعال شدن NLRP1 می‌شود. دو پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و Bcl-XL جلوی فعال شدن NLRP1 را می‌گیرند. توانایی NLRP1 برای تشخیص سطح انرژی سلولی ممکن است یک ارتباطی را بین متابولیسم و سیستم ایمنی برقرار کند. بعضی از مطالعات نشان دادند که NLRP1 ممکن است به‌عنوان یک حسگر استرس‌های هماتوپوتیتیک و یک تنظیم‌کننده مهم التهاب مطرح باشد (۲۰، ۶). در تحقیق حاضر نیز NLRP1 دارای افزایش بیان معنی داری در بیماران مبتلا به سپتی‌سمی در مقایسه با گروه کنترل بود. تحقیقات نشان داد که



شکل ۴. سطوح بیان NLRP1 در بیماران سپتی‌سمی که آلوده به باکتری‌های مختلف هستند شکل نشان می‌دهد که NLRP1 در سطح mRNA تغییر معنی‌داری در بین بیماران آلوده به باکتری‌های زیر ندارد ( $P=0.1603$ ). *Escherichia coli* ( $19.16 \pm 9.43$ ), *Staphylococcus aureus* ( $8.15 \pm 4.48$ ), *Acinetobacter baumannii* ( $19.04 \pm 6.98$ ) and *Pseudomonas aeruginosa* ( $26.58 \pm 15.79$ ).

## بحث

سپتی‌سمی یک بیماری با وجود عفونت در خون است. سپتی‌سمی بعد از عفونت‌های ریه و بیماری ایدز سومین علت مرگ به دلیل عفونت بوده و با در نظر گرفتن روند رو به افزایش بروز و مشکلات متعاقب آن از جمله شوک سپتیک شایع‌ترین علت مرگ در بخش‌های مراقبت ویژه است و در ۲۰ سال اخیر روند ابتلا به آن رو به افزایش بوده است (۱۲). سپتی‌سمی ناشی از باکتری‌های گرم منفی مرگ‌ومیر بیشتری نسبت به باکتری‌های دیگر دارد اما باکتری‌های گرم مثبت، بی‌هوازی‌ها، قارچ‌ها و حتی ویروس‌ها هم می‌توانند در زمره علت شناسی این باکتری‌ها قرار گیرند (۱۳، ۱۴). حداقل بخشی از علل مرگ‌ومیر بالای سپتی‌سمی در اثر کمبود علائم بالینی اختصاصی برای تشخیص زود هنگام بیماری است. همچنین در این بیماری نبود مارکر اختصاصی عفونت منجر به بروز مشکلاتی در افتراق سندرم پاسخ التهابی سیستمیک ناشی از عوامل عفونی از غیر عفونی شده است که در نتیجه موجب کم مصرف شدن یا در برخی موارد زیاد مصرف شدن عوامل ضد میکروبی می‌شود (۱۵). وجود علائم بالینی به‌تنهایی برای تشخیص سپتی‌سمی کافی نیست و باید تشخیص سریع و مناسب سپتی‌سمی جزء چالش‌های روزمره بخش‌های اورژانس و بخش مراقبت ویژه باشد. امروزه روش‌های مختلف درمانی منجر به بهبود وضعیت زنده ماندن بیماران مبتلا به سپتی‌سمی شده است، لذا تشخیص سریع و صحیح امری

## نتیجه گیری

با توجه به یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که NLRP1 گیرنده مهمی در برابر باکتری‌ها در طی عفونت خونی باکتریایی باشد و تحقیقات بیشتر، به خصوص در کاهش میزان بیان مولکول‌های NLRP1 می‌تواند نقش اصلی در برابر پاکسازی خون از علل عفونت را رقم بزند.

## سپاسگزاری

از همکاران محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی و حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، سپاسگزاری می‌گردد.

## تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

## Referance

- Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. NCHS data brief. 2011; (62): 1-8.
- Blomberg B, Jureen R, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile DS, Urassa WK, et al. High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of clinical microbiology*. 2005; 43(2):745-9. [DOI:10.1128/JCM.43.2.745-749.2005] [PMID] [PMCID]
- Jawad I, Lukšić I, Rafnsson SB. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *Journal of global health*. 2012; 2(1):1-9. [DOI:10.7189/jogh.01.010404]
- Nnanna II, Ehis OJ, Sidiqo II, Nnanna IG, Adekunle O. Serum procalcitonin: Early detection of neonatal bacteremia and septicemia in a tertiary healthcare facility. *North American journal of medical sciences*. 2011;3(3):157-160. [DOI:10.4297/najms.2011.3157] [PMID] [PMCID]
- Friedland J, Suputtamongkol Y, Remick D, Chaowagul W, Strieter R, Kunkel S, et al. Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas pseudomallei* infection. *Infection and immunity*. 1992;60(6):2402-8. [DOI:10.1128/IAI.60.6.2402-2408.1992] [PMID] [PMCID]
- Chavarría-Smith J, Vance RE. The NLRP 1 inflammasomes. *Immunological reviews*. 2015;265(1):22-34. [DOI:10.1111/immr.12283] [PMID]
- Proell M, Gerlic M, Mace PD, Reed JC, Riedl SJ. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. *Biochemical Journal*. 2013;449(3):613-21. [DOI:10.1042/BJ20121198] [PMID] [PMCID]
- Winn WC. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*: Lippincott williams & wilkins. 2006.
- Kariminik A, Yaghoobi R, Dabiri S. CXCL9 expression and polyomavirus BK infectivity in renal transplant patients with nephropathy. *Cellular and Molecular Biology*. 2016;62(1):104-8.
- Kariminik A, Dabiri S, Yaghoobi R. Polyomavirus BK induces inflammation via up-regulation of CXCL10 at translation levels in renal transplant patients with nephropathy. *Inflammation*. 2016;39(4):1514-9. [DOI:10.1007/s10753-016-0385-4] [PMID]
- Kariminik A, Yaghoobi R, Dabiri S. Association of BK Virus Infection with CXCL11 Gene Expression and Protein Levels in Kidney Transplant Patients. *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2018;16(1):50-4.
- Haddy RI, Richmond BW, Trapse FM, Fannin KZ, Ramirez JA. Septicemia in patients with AIDS admitted to a university health system: a case series of eighty-three

- patients. *J Am Board Fam Med.* 2012;25(3):318-22. [DOI:10.3122/jabfm.2012.03.110106] [PMID]
13. Mehta M, Dutta P, Gupta V. Antimicrobial susceptibility pattern of blood isolates from a teaching hospital in North India. *Japanese journal of infectious diseases.* 2005;58(3):174-76.
  14. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods.* 2000;42(2):139-47. [DOI:10.1016/S0167-7012(00)00174-3]
  15. Kurt B, Flynn P, Shenep JL, Pounds S, Lensing S, Ribeiro RC, et al. Prophylactic antibiotics reduce morbidity due to septicemia during intensive treatment for pediatric acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2008;113(2):376-82. [DOI:10.1002/cncr.23563] [PMID]
  16. Nwadioha S, Nwokedi E, Kashibu E, Odimayo M, Okwori E. A review of bacterial isolates in blood cultures of children with suspected septicemia in a Nigerian tertiary Hospital. *African Journal of Microbiology Research.* 2010;4(4):222-5.
  17. Paglia MG, D'Arezzo S, Festa A, Del Borgo C, Loiacono L, Antinori A, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia and HIV. *Emerging infectious diseases.* 2005;11(7):1128-30. [DOI:10.3201/eid1107.041268] [PMID] [PMCID]
  18. Dabiri S, Kariminik A, Kennedy D. The role of CXCR3 and its ligands in renal transplant outcome. *European cytokine network.* 2016;27(2):34-40. [DOI:10.1684/ecn.2016.0375] [PMID]
  19. Chi W, Li F, Chen H, Wang Y, Zhu Y, Yang X, et al. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production in acute glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(30):11181-6. [DOI:10.1073/pnas.1402819111] [PMID] [PMCID]
  20. Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration.* 2016;11(23):1-14. [DOI:10.1186/s13024-016-0088-1] [PMID] [PMCID]
  21. Shimada K, Crother TR, Arditi M. Innate immune responses to *Chlamydia pneumoniae* infection: role of TLRs, NLRs, and the inflammasome. *Microbes and infection.* 2012;14(14):1301-7. [DOI:10.1016/j.micinf.2012.08.004] [PMID] [PMCID]
  22. Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunological reviews.* 2011;243(1):152-62. [DOI:10.1111/j.1600-065X.2011.01043.x] [PMID] [PMCID]
  23. Kanneganti T-D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nature Reviews Immunology.* 2010;10(10):688-98. [DOI:10.1038/nri2851] [PMID] [PMCID]
  24. Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2015;12(7):387-400. [DOI:10.1038/nrgastro.2015.94] [PMID]
  25. Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1 $\beta$  via caspase-1-inflammasome complex. *The Journal of general virology.* 2012;93(2):235-246. [DOI:10.1099/vir.0.034033-0] [PMID] [PMCID]
  26. Tehrani FH, Moradi M, Ghorbani N. Bacterial Etiology and Antibiotic Resistance Patterns in Neonatal Sepsis in Tehran during 2006-2014. *Iranian Journal of Pathology.* 2017;12(4):356. [Article] [PMCID] [PMID]
  27. Niakan S, Niakan M, Hesaraki S, Nejadmoghaddam MR, Moradi M, Hanafiabdar M, et al. Comparison of the Antibacterial Effects of Nanosilver With 18 Antibiotics on Multidrug Resistance Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol.* 2013;6(5):e8341. [Article] [DOI:10.5812/jjm.8341]

