



Synergistic effect of *Froriepia subpinnata*-functionalized Fe₃O₄ nanocomposite and ciprofloxacin on the expression of efflux pump genes in ciprofloxacin resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Asal Safaei Touchaei¹, Kossar ramaneh¹, Mohammad Nikpassand², Najmeh Ranji³, Mahdi Shahriarinour⁴

¹ MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

² professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

³ Associate professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

⁴ Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic gram-negative bacterium that is a major cause of nosocomial infections such as severe burns. *Froriepia subpinnata* is an herbal component have antioxidant, anticancer and antibacterial properties. The aim of this study was to evaluate antibacterial effects of *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized magnetic nanocomposite on ciprofloxacin resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Material and Methods: In this study, *Pseudomonas aeruginosa* isolates were obtained from some hospitals and laboratories in Tehran city. After disc diffusion and MIC tests, biofilm formation assay, FIC determination and evaluation of efflux pump genes in the isolates were treated by *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized Fe₃O₄ nanocomposite (1/2MIC) and ciprofloxacin (1/2MIC) (test group), and treated by ciprofloxacin (1/2MIC) (control group) were performed.

Results: Synergic effects of *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized Fe₃O₄ nanocomposite and ciprofloxacin was confirmed with checkerboard dilution method. Biofilm formation decreased in *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized Fe₃O₄ nanocomposite (1/2MIC) and ciprofloxacin (1/2MIC) treated bacteria in compared to ciprofloxacin (1/2MIC) treated bacteria. This study showed that combination of *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized Fe₃O₄ nanocomposite (1/2MIC) and ciprofloxacin (1/2MIC) led to downregulation of *mexA*, *mexB*, *mexX* and *oprM* genes in compared to ciprofloxacin (1/2MIC).

Conclusion: Our results suggested that *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized Fe₃O₄ nanocomposite (1/2MIC) in combination with ciprofloxacin inhibits the growth of *Pseudomonas aeruginosa* through decrease of biofilm formation and reducing the expression of efflux pump genes.

Keywords: Ciprofloxacin, *Froriepia subpinnata*, Efflux pump, Magnetic nanoparticles, *Pseudomonas Aeruginosa*.

Received: 28 February 2024

Revised: 23 April 2024

Accepted: 30 May 2024

Correspondence to: Mahdi Shahriarinour

Tel: +98 1333424080

E-mail: ma.shahriarinour@iau.ac.ir

Journal of Microbial World 2024, 17 (1): 73 - 83



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



اثر هم‌افزایی نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دارشده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین بر بیان ژن‌های پمپ افلاکس در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین

عسل صفائی‌توچائی^۱، کوثر رامنه^۱، محمد نیک‌پسند^۲، نجمه رنجی^۳، مهدی شهریارینور^{۴*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. ^۲ استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. ^۳ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. ^۴ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اناریجه، به‌عنوان یک ترکیب گیاهی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدباکتریایی است. و محافظت‌کننده کبدی دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضدباکتریایی نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دارشده با عصاره برگ اناریجه بر جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا از چند بیمارستان و آزمایشگاه در شهر تهران تهیه شد. پس از تست آنتی‌بیوگرام و تعیین MIC، ارزیابی تشکیل بیوفیلم، و تعیین FIC و بررسی بیان ژن‌های پمپ افلاکس در جدایه‌های تحت تیمار با نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دارشده با عصاره برگ اناریجه (۱/۲MIC) و سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) (گروه تست)، صورت گرفت. **یافته‌ها:** اثرات سینرژستیک نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دارشده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین با روش رقت چکربرد (checkerboard) تأیید شد. تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دارشده با عصاره برگ اناریجه (۱/۲MIC) و سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) در مقایسه با باکتری‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) کاهش یافت. این مطالعه نشان داد نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دارشده با عصاره برگ اناریجه (۱/۲MIC) و سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) باعث کاهش بیان ژن‌های *oprM* و *mexX*، *mexB*، *mexA* در مقایسه با سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) شد.

نتیجه‌گیری: نتایج ما پیشنهاد می‌کند که نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دارشده با عصاره برگ اناریجه در ترکیب با سیپروفلوکساسین رشد سودوموناس آئروژینوزا را از طریق کاهش تشکیل بیوفیلم و کاهش بیان ژن‌های پمپ افلاکس مهار می‌کند.

کلمات کلیدی: سیپروفلوکساسین، اناریجه، پمپ افلاکس، نانوذرات مگنتیک، سودوموناس آئروژینوزا.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۳/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۲/۴

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۹

مقدمه

در بیماران با نقص ایمنی یا سایر شرایط مستعد کننده، نقش به‌سزایی دارد. اهمیت این پاتوژن بیمارستانی داشتن مقاومت طبیعی و هم‌اکتسابی به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها است (۱). اغلب سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند. درمان عفونت‌های سودوموناسی به دلیل مقاومت

سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی در ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های حاد و مزمن

(* آدرس برای مکاتبه: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
تلفن: ۰۹۱۱۲۴۰۲۱۴۳
پست الکترونیک: ma.shahriarinnour@iau.ac.ir



تری ترینوئید، ساپونین، فلاونوئید و کومارین است که به‌عنوان یک گیاه دارویی اشتهاآور، آرام بخش و ضد حساسیت مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین خواص ضدنفخ، ضدعفونی کننده، ضداسپاسم، ضدسرطان، آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچ، ضد میکروبی و ادرارآور عصاره گزارش شده است (۹). هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوکامپوزیت‌های مگنتیک (Fe_3O_4) عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه به همراه سیپروفلوکساسین بر بیان ژن‌های افلاکس پمپ و تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه و شناسایی باکتری: حدود ۵۰ جدایه در سال ۱۴۰۲ از چند بیمارستان در تهران جمع‌آوری و تعیین هویت به کمک رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، اکسیداز، سیمون سترات، TSI و کشت در محیط سیتریماید آگار و رشد در دمای $42^{\circ}C$ انجام شد (۱۰).

ب) سنتز نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه: در ابتدا حدود ۶ گرم برگ اناریجه (*Froriepia subpinnata*) خشک، آسیاب و پودر شد. سپس پودر خشک گیاه، در آب حل شده و تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت. در ادامه با سود در مگنت استیرر (Stirrer) مخلوط شد. سپس ۱ گرم اکسید آهن (Fe_3O_4) با زایلن مخلوط شد و تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس به مخلوط، ترکیب ۳-کلروپروپیل تری اتوکسی اضافه و سانتریفیوژ شد. عصاره گیاهی اناریجه، طی چند ساعت بصورت تدریجی به محتویات نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) اضافه و به مدت دو روز در دمای اتاق هم زده شد. محصول نهایی (نانوذرات مگنتیک عامل دار شده با برگ گیاه اناریجه) در دمای $60^{\circ}C$ خشک شد.

ج) بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک: برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار از دیسک برای ۲۰ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. به این منظور، از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مروپنم ($10\mu g$),

طبیعی آن در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌تواند مشکل ساز شود و درمان با آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر در صورت نیاز، ممکن است با عوارض جانبی همراه باشد (۲). علل مقاومت دارویی در سودوموناس آئروژینوزا شامل افزایش نفوذپذیری غشاء خارجی، فعالیت بتالاکتاماز کروموزومی و افزایش بیان پمپ‌های افلاکس چند دارویی است (۳).

پمپ‌های افلاکس مکانیسم اختصاصی دفاع از سودوموناس آئروژینوزا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، ضدعفونی کننده‌ها و مهارکننده‌های شیمیایی هستند. مهم‌ترین سیستم‌های پمپ افلاکس از خانواده RND (Resistance-Nodulation-Division) و شامل: *MexEF-OprN*, *MexCD-OprJ*, *MexAB-OprM* و *MexXY-OprM* هستند. سیستم‌های پمپ افلاکس *MexAB-OprM* و *MexXY-OprM*، نقش کلیدی در مقاومت طبیعی سودوموناس آئروژینوزا به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۴). افزایش بیان این سیستم‌های پمپ افلاکس در مقاومت به بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکوئینولون‌ها در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شده است (۵و۶).

تشکیل زائده‌های خارج سلولی همچون پیلی نوع IV و تاژک در سودوموناس آئروژینوزا از مراحل تشکیل بیوفیلم است. باکتری‌ها عمدتاً در جوامع سازمان یافته‌ای به نام بیوفیلم رشد می‌کنند. مطالعات نشان داده که سودوموناس آئروژینوزا به واسطه تشکیل بیوفیلم در ریه بیماران دچار فیبروز سیستیک توان رشد و بقا پیدا می‌کنند. سپس این جوامع میکروبی بواسطه کسب ویژگی‌های منحصر به فردی، در برابر عوامل آسیب رسان خارجی، از باکتری‌ها محافظت می‌کند، که مهم‌ترین آن‌ها افزایش مقاومت باکتری‌ها در ساختار بیوفیلم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و سیستم ایمنی میزبان است (۷).

اناریجه با نام علمی *Froriepia subpinnata*، گیاهی دو ساله با ارتفاع ۲۲۱-۱۱ سانتی‌متر، از خانواده چتریان (Apiaceae) و *Pimpinella* می‌باشد. پراکندگی جغرافیایی اناریجه در آناتولی، ایران، ترکمنستان، افغانستان، قفقاز و عراق است (۸). این گیاه در ایران در مناطق شمالی، شمال غرب، مرکزی، شرق و شمال شرق پراکنده است. اناریجه دارای ترکیبات شیمیایی همچون

بورد دابلوشن استفاده شد. بدین منظور، نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین به صورت جداگانه در محیط کشت مولر هیتون برات در هشت غلظت مختلف رقیق‌سازی شدند. سپس در ستون‌های عمودی پلیت ۹۶ خانه‌ای غلظت‌های مختلف نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه MNCs (دارو A) ریخته شد، در حالی که در ردیف‌های افقی پلیت ۹۶ خانه‌ای غلظت‌های مختلف سیپروفلوکساسین (دارو B) قرار داده شد. به هر چاهک، سوسپانسیون باکتریایی (در غلظت نهایی 10^6 CFU/mL - 5×10^5) اضافه شد. شاخص غلظت‌های بازدارنده کسری (FICI) با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد (۱۲):

$$FICI = \frac{MIC(\text{drug A mixture})}{MIC(\text{drug A used alone})} + \frac{MIC(\text{drug B mixture})}{MIC(\text{drug B used alone})}$$

(و) بررسی بیوفیلم قبل و بعد از تیمار دارویی با نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین: ابتدا، تمامی ۲۰ جدایه از نظر تشکیل بیوفیلم بعد از ۲۴ ساعت کشت در دمای 37°C مورد ارزیابی قرار گرفتند سپس سه جدایه‌ی بیمارستانی و سویه استاندارد (ATCC 9027) سودوموناس آئروژینوزا از نظر تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور ابتدا کدروت 10^6 CFU/mL (۰/۵) مک فارلند برای هر باکتری تهیه شد. سپس هر باکتری با کدروت 10^6 CFU/mL (۰/۵) تحت تیمار با نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین (گروه تست) و تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (گروه کنترل) قرار گرفت. پس از شستشو با PBS و تثبیت با متانول ۹۵ درصد، چاهک‌ها با کریستال ویوله ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو، اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد اضافه و تشکیل بیوفیلم در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (Biotek Biotek ELx800, USA) به صورت OD خوانده شد (۱۳).

لوفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$) و سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$) از شرکت پادتن طب (تهران، ایران) استفاده شد. میزان حساسیت جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد هر دیسک بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در 37°C طبق استاندارد CLSI 2023 مشخص شد (۱۰).

د) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) سیپروفلوکساسین و اناریجه: برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد سیپروفلوکساسین، از روش برات میکرودایلوشن بهره برده شد. به این منظور بعد از کشت ۱-۲ ساعته هر جدایه در محیط کشت نوترینت برات در دمای 37°C درجه سلسیوس، کدورت $0.08-0.1$ (OD₆₃₀) تهیه شد و به رقت یک صد رسانده شد (10^6 CFU - 10^5). سپس رقت‌های متوالی سیپروفلوکساسین تزریقی در محدوده غلظتی $1 \mu\text{g/ml}$ - $1024 \mu\text{g/ml}$ در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، اضافه شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت جدایه مورد نظر (10^6 CFU - 10^5)، اضافه شد و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (۱۱). جهت تعیین MIC از سیپروفلوکساسین تزریقی ($20 \text{ mg}/20 \text{ ml}$)، شرکت روناک دارو، ایران) استفاده گردید. نتایج طبق استاندارد CLSI 2023 تفسیر شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با برگ گیاه اناریجه، از روش برات میکرودایلوشن بهره برده شد. به این منظور رقت‌های متوالی از نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با برگ گیاه اناریجه در محدوده غلظتی $1 \mu\text{g/ml}$ - $1024 \mu\text{g/ml}$ در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، اضافه شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت 10^6 مک فارلند جدایه مورد بررسی اضافه و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

ه) بررسی اثر سینرژستیک نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین: برای بررسی اثر هم‌افزایی (سینرژستیک) بین دو ترکیب دارویی، از روش چکر

ز) بررسی بیان ژن‌های پمپ افلاکس تحت تیمار با اناریجه و

سیپروفلوکساسین: به منظور بررسی بیان ژن‌های *mexA*، *mexB*،

mexX، *mexY* و *oprM* دو جدایه بالینی و سویه استاندارد

انتخاب شدند و جدایه‌ها با کدورت $10^5 \times 7/5$ CFU/mL

تحت تیمار با (۱) نانوذرات مگنتیک عامل دار شده با عصاره

برگ اناریجه (MIC ۱/۲) و سیپروفلوکساسین (MIC ۱/۲) (گروه

تست) و (۲) سیپروفلوکساسین (MIC ۱/۲) (گروه کنترل) به

مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C قرار گرفتند. سپس طبق

دستورالعمل کیت RNXP^{PLUS} (سیناکلون، ایران)، استخراج

RNA از گروه‌های تست و کنترل صورت گرفت. در ادامه

جهت سنتز cDNA، از کیت سنتز cDNA (شرکت یکتا تجهیز

آزما، ایران) استفاده شد. به این منظور RNA، اولیگو dT

($50 \mu\text{M}$) و آب DEPC به حجم نهایی $13/5$ میکرولیتر با هم

مخلوط شده و در دمای 37°C در دستگاه ترموسایکلر

(BioRad، آلمان) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس بافر

MMLV آنزیم و RNasin، dNTPs ($10 \mu\text{M}$) و αx first strand

به اجزای واکنش اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 37°C

(برای انجام واکنش) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 70°C (برای

غیرفعالسازی آنزیم RT) در دستگاه ترموسایکلر BioRad

(آلمان) قرار داده شد. در ادامه، مقایسه سطح بیان ژن‌ها در دو

گروه سلولی قبل و پس از تیمار دارویی به کمک روش

Real-Time PCR کمی (qRT-PCR) به کمک کیت

SYBR Premix SYBR green (شرکت یکتا تجهیزآزما، ایران)

در دستگاه ABI StepOne (Applied Biosystems، امریکا)

بررسی شد. برنامه دمایی واکنش qRT-PCR به قرار ذیل بود:

مرحله واسرشت ابتدایی (95°C به مدت ۳ دقیقه) و 40

سیکل شامل 95°C به مدت ۵ ثانیه، 60°C به مدت ۱۰ ثانیه و

72°C به مدت ۱۰ ثانیه. ژن *rpsL* به عنوان ژن کنترل داخلی

مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱

ذکر شده است. واکنش qRT-PCR برای هر ژن، حداقل دو بار

تکرار شد و نتایج مربوط به تغییر بیان ژن‌ها به صورت

میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. آنالیز بیان ژن‌ها در

نمونه‌های تست و کنترل به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ انجام

گرفت (۱۲).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول (bp)
<i>mexA-F</i>	5'-CCATGCGTGTACTGGTTCCG-3'	۲۱۰
<i>mexA-R</i>	5'-TGAGGATGATGCCGTTACC-3'	
<i>mexB-F</i>	5'-ATCAACAGCACCGTGTCAT-3'	۲۰۶
<i>mexB-R</i>	5'-GGCGAACCGTATTCCCACTT-3'	
<i>mexX-F</i>	5'-GTCAAGGTGGTCAACCCAAA-3'	۱۳۳
<i>mexX-R</i>	5'-GTTCTCGACGATCACCCACT-3'	
<i>oprM-F</i>	5'-TTCGGGTTCTGGTTGTTCC-3'	۲۳۶
<i>oprM-R</i>	5'-GCTGGTAGTACTCGTCGCTG-3'	
<i>rpsL-F</i>	5'-CTCGGCACTGCGTAAGGTAT-3'	۲۱۶
<i>rpsL-R</i>	5'-CCGTACTCGAACGACCCTG-3'	

ح) آزمون آماری: اختلاف آماری بین دو گروه تست و کنترل، با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 8@software و آزمون t-test محاسبه شد. مقدار $P < 0.05$ ، عنوان معنی دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) تعیین پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک: در این تحقیق ۲۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های ادرار، سوختگی در محدوده سنی ۲۰ ساله تا ۶۰ ساله از بیمارستان‌های تهران در سال ۱۴۰۲ به روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شد. در این مطالعه مشخص شد در ۲۰ نمونه با دیسک آنتی‌بیوگرام به روش انتشار از دیسک طبق جدول CLSI2023، مقاومت به لووفلوکساسین، مروپنم و سیپروفلوکساسین حدود ۷۰٪ گزارش شد و بیشترین حساسیت به سفتازیدیم با ۵۰ درصد فراوانی مشاهده شد (جدول ۲).

ب) تعیین MIC: در این مطالعه به روش برات میکروداپلوشن، تعیین حداقل غلظت مهارشوندگی رشد (MIC) با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در ۲۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا مورد

ج) اثر هم‌افزایی بین نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین: برای بررسی اثر هم‌افزایی بین نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین در سه جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا و سویه استاندارد ATCC 9027 از آزمون رقیق‌سازی چکر برد بهره برده شد. مطابق جدول ۳ در سویه استاندارد ATCC8739 و سه جدایه بیمارستانی اثر هم‌افزایی (سینرژستیک) مشاهده شد.

د) مهار تشکیل بیوفیلم: آزمون تشکیل بیوفیلم در ۲۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا نشان داد بیش از ۴۰٪ جدایه‌ها، توان تشکیل بیوفیلم قوی، بیش از ۵۰٪ جدایه‌ها توان تشکیل بیوفیلم متوسط و حدود ۱٪ جدایه‌ها، توان تشکیل بیوفیلم ضعیف داشتند (نمودار ۲).

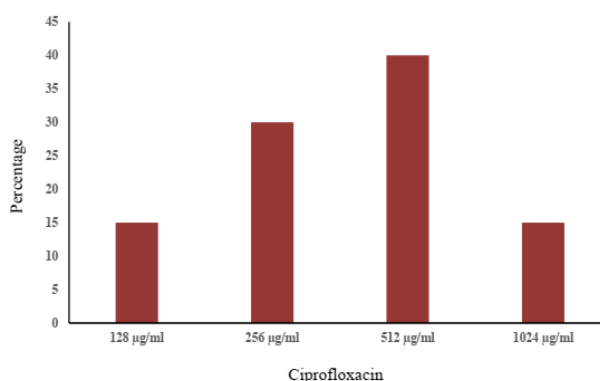
آزمون تشکیل بیوفیلم در سویه استاندارد ATCC 9027 و سه جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا در سه گروه الف) تیمار با نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه (MIC ۱/۲ ترکیبی) و سیپروفلوکساسین (MIC ۱/۲ ترکیبی)، ب) تیمار با سیپروفلوکساسین (MIC ۱/۲ ترکیبی) و ج) کنترل (بدون تیمار دارویی) کاهش تشکیل بیوفیلم در گروه ۱ نسبت به گروه ۲ و گروه ۳ را نشان داد (نمودار ۳).

ه) مهار بیان ژن‌های پمپ افلاکس در حضور اناریجه و سیپروفلوکساسین: برای بررسی بیان ژن‌های پمپ افلاکس از روش qRT-PCR استفاده شد. بیان ژن‌های پمپ افلاکس در

بررسی قرار گرفت. طبق جدول CLSI2021، MIC سیپروفلوکساسین در همه جدایه‌ها، بیش از ۱۲۸ µg/ml گزارش شد. در مجموع درصد بالایی از جدایه‌ها، دارای MIC=512 µg/ml بودند (نمودار ۱). همچنین MIC نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه در همه جدایه‌ها، بیشتر از ۱۰۲۴ µg/ml بود.

جدول ۲: الگوی حساسیت جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر طبق CLSI 2023 به روش انتشار از دیسک.

آنتی‌بیوتیک	لوفلوکساسین	سفتازیدیم	مروپنم	سیپروفلوکساسین
حساس (susceptible)	۲۵٪	۵۰٪	۳۰٪	۳۰٪
نیمه حساس (Intermediate)	۵٪	۰٪	۰٪	۰٪
مقاوم (resistance)	۷۰٪	۵۰٪	۷۰٪	۷۰٪



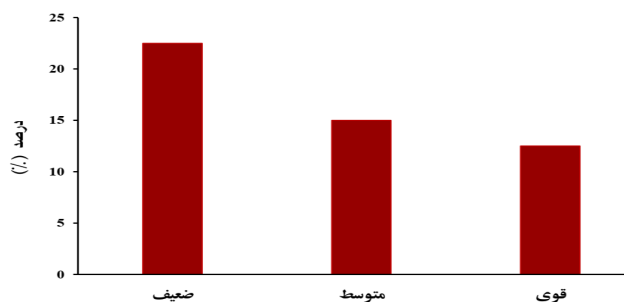
نمودار ۱: درصد توزیع MIC در ۲۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به

جدول ۳: اثر هم‌افزایی نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین.

FIC (µg/mL)	MIC (µg/mL) ترکیبی		MIC (µg/mL) به تنهایی		شماره باکتری
	نانوذرات مگنتیک با اناریجه	سیپروفلوکساسین	نانوذرات مگنتیک با اناریجه	سیپروفلوکساسین	
۰/۲۶۵	۱۶	۸	>۱۰۲۴	۳۲	ATCC 9027
۰/۲۸۱	۳۲	۱۶	>۱۰۲۴	۶۴	P77
۰/۲۸۱	۳۲	۱۶	>۱۰۲۴	۶۴	P93
۰/۲۸۱	۳۲	۱۶	>۱۰۲۴	۶۴	P94

*FICI≤0.5 means synergy; **0.5<FICI≤0.75 means partial synergy; ***0.76 <FICI≤1 means additive

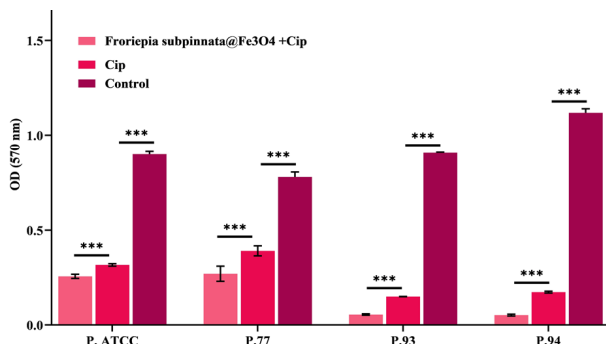
جدایه بالینی (نمونه ۷۷) و سویه استاندارد (ATCC9027) تحت تیمار با نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه ($1/2MIC$ ترکیبی) و سیپروفلوکساسین ($1/2MIC$ ترکیبی) در مقایسه با جدایه‌های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین ($1/2MIC$ ترکیبی) کاهش معنی‌دار نشان داد (نمودار ۴).



نمودار ۲: توزیع میزان تشکیل بیوفیلم در ۲۰ جدایه سودوموناس آتروژینوزا (به صورت درصد).

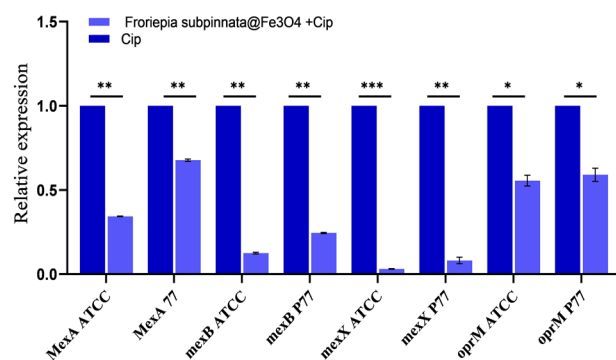
بحث

اناریجه با نام علمی *Froriepia subpinnata*، دارای ترکیبات ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی و ضد باکتریایی از جمله فلاونوئیدها است. بدلیل حلالیت کم ترکیبات دارویی این گیاه، در این مطالعه تلاش شد نانوکامپوزیت‌های Fe_3O_4 با عصاره برگ اناریجه عامل‌دار شده و سپس خواص ضد باکتریایی آن مورد ارزیابی قرار گیرد. در این مطالعه مشخص شد که نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه دارای خواص ضد میکروبی علیه جدایه‌های بالینی سودوموناس آتروژینوزا از طریق کاهش بیان ژن‌های پمپ افلاکس و مهار تشکیل بیوفیلم می‌باشد.



نمودار ۳: تشکیل بیوفیلم در سویه استاندارد (ATCC 9027) و سه جدایه بالینی سودوموناس آتروژینوزا تحت تیمار با سه گروه (۱) کنترل، (۲) تحت تیمار با سیپروفلوکساسین و (۳) تحت تیمار با نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین.

ایمانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ با مطالعه بر روی ۶۹ جدایه‌های سودوموناس آتروژینوزا بدست آمده از چندین آزمایشگاه و بیمارستان در شهرهای رشت و لاهیجان از نمونه‌های سوختگی، ادراری، ترشحات تنفسی، نکروز بافتی، خون، و گوش نشان دادند که $33/33\%$ این جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک و $37/68\%$ جدایه‌ها به روش تعیین MIC به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌ها به روش برات دایلوژن (MIC) بین ۳۲ تا ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد (۱۴). در مطالعه مشیریان فرهی و همکاران در سال ۲۰۱۸ از میان ۵۷ جدایه سودوموناس آتروژینوزا جدا شده از بیمارستان‌های تهران، $41/37\%$ جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک، به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. همچنین از ۳۰ جدایه مورد ارزیابی، ۲۲ جدایه دارای MIC بیشتر از $4 \mu g/ml$ شناسایی شد (۱۵). در مطالعه رجب‌پور و همکاران، در سال ۲۰۱۳ از



نمودار ۴: نمودار تغییر بیان کمی ژن‌های پمپ افلاکس به روش Real time PCR در سویه استاندارد و جدایه بالینی P.77 تحت تیمار با نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه ($1/2MIC$ ترکیبی) و سیپروفلوکساسین ($1/2MIC$ ترکیبی) در مقایسه با جدایه‌های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین ($1/2MIC$ ترکیبی). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است (هر تست حداقل دو بار تکرار شد).

آئروژینوزا بود. در این مطالعه اثرات سینرژستیک اناریجه با سیپروفلوکساسین مشاهده شد.

در مطالعه *Riou* و همکاران ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری بین افزایش بیان ژن‌های *mexA* و *mexB* با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در *S. aureus* مشاهده گردید (۱۹). در مطالعه احمدی و همکاران سیلیبین (از گیاه خارمریم) محبوس شده در نانوذرات میسلی باعث کاهش بیان ژن افلاکس پمپ *mexY* در جدایه‌های *S. aureus* آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین شد (۱۰). در مطالعه ایمانی و همکاران، نانوذرات میسلی حاوی کورکومین (از گیاه زردچوبه) بیان ژن‌های افلاکس پمپ *mexC* و *mexD* را در جدایه‌های *S. aureus* آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین کاهش داد (۱۴). در مطالعه فکری کهن و همکاران در سال ۲۰۲۴ کاهش بیان ژن‌های افلاکس پمپ *AcrAB-ToIC* در جدایه‌های *S. aureus* /شریشیاکلی مقاوم به سیپروفلوکساسین تحت تیمار با سیلیبین و سیپروفلوکساسین مشاهده شد (۲۰). در مطالعه‌ی دیگر احمدی و همکاران سیلیبین (از گیاه خارمریم) محبوس شده در نانوذرات میسلی باعث کاهش بیان ژن افلاکس پمپ *mexB* در جدایه‌های *S. aureus* آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین شد (۲۱). به نظر می‌رسد اناریجه با خواص ضد میکروبی قادر به کاهش بیان ژن‌های پمپ افلاکس شامل *mexA*، *mexB*، *mexX* و *oprM* بوده و به این طریق مانع خروج آنتی‌بیوتیک و باعث محبوس شدن مقدار بیشتری از سیپروفلوکساسین در درون سلول‌ها شده و به این ترتیب با مهار خروج این آنتی‌بیوتیک باعث افزایش اثربخشی آن بر سلول‌ها و مرگ آن‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به کمک نانوذرات مگنتیک عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه، خواص ضدباکتریایی آن در حضور سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی شد. نتایج این مطالعه اثر سینرژستیک بین دو ترکیب گیاهی و دارویی را تأیید کرد. همچنین تیمار با نانوذرات

۱۰۰ جدایه بیمارستانی *S. aureus* آئروژینوزا، حدود ۹۰ درصد موارد به روش MIC، مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شدند (۱۶). در مطالعه حاضر از بین ۲۰ جدایه تهیه شده از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های تهران، ۷۰٪ جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک به لووفلوکساسین، مروپنم و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در حالی که همه جدایه‌ها به روش برات میکرودايلوشن در محدوده ۱۲۸ تا ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر مقاومت به سیپروفلوکساسین را نشان دادند. مشابه با مطالعه ایمانی و همکاران، تفاوت میزان مقاومت در دو روش تعیین حساسیت به دارو، به خاطر دقت بالاتر روش MIC نسبت به روش انتشار از دیسک می‌باشد. با اینحال نرخ مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در مطالعات مختلف متفاوت بوده اما مشابه با مطالعه مشیریان فرهی و همکاران و مطالعه رجب‌پور و همکاران، نرخ مقاومت به سیپروفلوکساسین در مطالعه حاضر بالا بوده و نیاز به توجه بیشتر در مدیریت درمان در این استان دارد.

در مطالعات مختلف، از نانوذرات جهت افزایش رهایش دارو و همچنین جهت انتقال ترکیبات نامحلول در آب به بدن بهره برده می‌شود. در مطالعه حسین زاده و همکاران در سال ۲۰۱۹ از نانوذرات پلیمرزومی برای رهایش سیلیبین (جزء فعال و نامحلول گیاه خارمریم یا *Silybum marianum* در آب) با خواص ضدسرطانی، استفاده شد. نانوذرات با تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM ابعادی بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر داشتند (۱۷). در مطالعه شاهمرادی و همکاران در سال ۲۰۲۳ با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم عامل‌دار شده با گلوتامین و کانزوگه با تیوسمی کاربازون با خواص ضدسرطانی، اندازه نانوذرات ۱۰ تا ۸۰ نانومتر تخمین زده شد (۱۸). در مطالعه پوراصغر و همکاران در سال ۲۰۲۴ نانوذرات مگنتیت عامل‌دار شده با کورکومین (جزء فعال و نامحلول زردچوبه در آب) با خواص ضدباکتریایی و ضدسرطانی، اندازه نانوذرات ۴۰ تا ۸۰ نانومتر تخمین زده شد (۱۲). در مطالعه حاضر نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل‌دار شده با عصاره برگ اناریجه دارای خواص ضد میکروبی علیه جدایه‌های بالینی *S. aureus*

مگنتیک عامل دار شده با اناریجه و سیپروفلوکساسین در مقایسه با تیمار با سیپروفلوکساسین به‌تنهایی باعث کاهش تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و کاهش بیان ژن‌های افلاکس پمپ *mexA*، *mexB*، *mexX* و *oprM* شد. کاهش بیان ژن‌های افلاکس پمپ می‌تواند به افزایش میزان سیپروفلوکساسین محبوس شده در سلول و در نتیجه افزایش مهار رشد سلولی بواسطه سیپروفلوکساسین و به عبارتی افزایش حساسیت به سیپروفلوکساسین، کمک نماید.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله کلیه موارد اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Feng X, Zhang Z, Li X, Song Y, Kang J, Yin D, et al. Mutations in gyrB play an important role in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and drug resistance. 2019;261-72.
2. Spagnolo AM, Sartini M, Cristina ML. *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. Reviews and Research in Medical Microbiology. 2021;32(3):169-75.
3. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2003;51(1):9-11.
4. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(5):1797-802.
5. Hocquet D, Muller A, Blanc K, Plésiat P, Talon D, Monnet DL, et al. Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(3):1173-5.
6. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(5):1797-802.
7. Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Cámara M, Ventre I, Lory S, et al. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. Journal of bacteriology. 2004;186(9):2880-90.
8. Nabavi S, Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Jafari M. Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of *Eryngium caucasicum* Trautv and *Froripia subpinnata*. 2008.
9. Otaghsara SH, Garoosi G, Najafzadehvarzi H, Kazemi S. Effects of *Froriepia subpinnata* extract on serum biochemicals and histopathological changes of liver in rats treated with trichloroacetic acid. Iranian Veterinary Journal. 2020:72.
10. Roudbaraki ZA, Ranji N, Mohammadipour A, Ghasemnegad Z. The effect of silybin-encapsulated micelle nanoparticles on mexY expression in ciprofloxacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Microbial World. 2018;36(11):269-77.
11. Jung HJ, Lee DG. Synergistic antibacterial effect between silybin and N, N'-dicyclohexylcarbodiimide in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The Journal of Microbiology. 2008;46(4):462-7.
12. Pourasgar S, Ranji N, Asadpour L, Shahriarinour M, Nikpassand M. Antibacterial and Anti-cancer Properties of Curcumin-Functionalized Silica-Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles. Arabian Journal for Science and Engineering. 2024.
13. Honarmand Jahromy S, Zare Karizi S. Evaluation of Biofilm Formation and Frequency of Genes Encoding Curli Fiber, Colanic Acid Capsule and F1c Fimberia Among Uropathogenic

- Escherichia coli Isolates With Strong Cell Surface Hydrophobicity. Avicenna J Clin Microbiol Infect. 2019;6(1):2-8.
14. Imani Pirsaraei B, Ranji N, Asadpour L. Investigation the Effect of Micelle Nanoparticles Containing Curcumin on Ciprofloxacin Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and on mexC and mexD Genes Expression. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2018;21(2):10-20.
 15. Farahi RM, Ali AA, Gharavi S. Characterization of gyrA and parC mutations in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Tehran hospitals in Iran. Iran J Microbiol. 2018;10(4):242-9.
 16. Rajabpour M, Alikhani MY. MIC determination of *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). Iranian Journal of Medical Microbiology. 2013;7(3):18-25.
 17. Hossainzadeh S, Ranji N, Naderi Sohi A, Najafi F. Silibinin encapsulation in polymersome: A promising anticancer nanoparticle for inducing apoptosis and decreasing the expression level of miR-125b/miR-182 in human breast cancer cells. Journal of Cellular Physiology. 2019;234(12):22285-98.
 18. Shahmoradi SS, Salehzadeh A, Ranji N, Habibollahi H. Trigger of apoptosis in human liver cancer cell line (HepG2) by titanium dioxide nanoparticles functionalized by glutamine and conjugated with thiosemicarbazone. 3 Biotech. 2023;13(6):195.
 19. Riou M, Avrain L, Carbonnelle S, El Garch F, Pirnay J-P, De Vos D, et al. Increase of efflux-mediated resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic treatment in patients suffering from nosocomial pneumonia. International journal of antimicrobial agents. 2016;47(1):77-83.
 20. Fekri Kohan S, Nouhi Kararoudi A, Bazgosha M, Adelifar S, Hafezolghorani Esfahani A, Ghaderi Barmi F, et al. Determining the potential targets of silybin by molecular docking and its antibacterial functions on efflux pumps and porins in uropathogenic *E. coli*. International Microbiology. 2024.
 21. 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. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2017;19(11):42-9.