



Inhibition of Biofilm Formation by *Froriepia subpinnata* Leaf Extract-Functionalized Magnetic Nanocomposites and Ciprofloxacin and Downregulation of *pslA*, *algD*, and *pelA* Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Mahsa Ahmadzadeh Kelangestani¹, Sajedah Moazzami Mirak Mahaleh¹,
 Mohammad Nikpassand², Mahdi Shahriarinour¹, Najmeh Ranji^{1*}

¹Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

²Department of Chemistry, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

Article Info

Article History:

Recived 2025.08.19

Revised 2025.09.05

Accepted 2025.09.07

KeyWords:

Pseudomonas aeruginosa
 Biofilm
 Magnetic nanocomposite
Froriepia subpinnata
 Ciprofloxacin

*Corresponding author:

E-mail address:

na.ranji@iau.ac.ir

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic hospital-acquired pathogen with multidrug resistance, in which biofilm formation plays a critical role in therapeutic failure. This study aimed to evaluate the effects of *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized magnetic nanocomposites in combination with ciprofloxacin on the inhibition of biofilm formation and deregulation of biofilm-related gene in resistant clinical isolates.

Materials and Methods: In this study, 26 clinical isolates of *P. aeruginosa* were collected from hospitals in Tehran, Iran, and their antibiotic susceptibility profiles were determined using the Kirby-Bauer method. Minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated by broth microdilution. The *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized magnetic nanocomposites were synthesized and their anti-biofilm function were assessed in combination with ciprofloxacin. Synergistic activity was assessed by the checkerboard assay, biofilm formation was quantified using crystal violet staining, and the expression of *pslA*, *algD*, and *pelA* genes was analyzed by Q-RT-PCR.

Results: Physicochemical analysis confirmed the successful synthesis of *Froriepia subpinnata* leaf extract-functionalized magnetic nanoparticles with particle sizes ranging from 28 to 82 nm. All of isolates were resistant to ciprofloxacin, with MIC values ranging from 128 to 1024 µg/mL. Checker board analysis demonstrated a synergistic effect between the *Froriepia subpinnata*- functionalized nanocomposites and ciprofloxacin in the strain ATCC 9027 and several clinical isolates. Moreover, the combination treatment significantly led to decrease of biofilm formation and downregulation of *pslA*, *algD*, and *pelA* genes compared to treatment with ciprofloxacin alone ($P<0.05$).

Conclusion: The findings indicate that *Froriepia subpinnata*-functionalized magnetic nanocomposites can enhance the antibacterial efficacy of ciprofloxacin against resistant *P. aeruginosa* isolates by downregulating biofilm formation-related genes.

Cite this article: M Ahmadzadeh Kelangestani, S Moazzami Mirak Mahaleh, M Nikpassand, M Shahriarinour, N Ranji. Inhibition of Biofilm Formation by *Froriepia subpinnata* Leaf Extract-Functionalized Magnetic Nanocomposites and Ciprofloxacin and Downregulation of *pslA*, *algD*, and *pelA* Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Iranian Journal of Biological Sciences. 2025; 20 (1): 47-60



Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



مهار تشکیل بیوفیلم بواسطه تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین و کاهش بیان ژن های *pelA*، *pslA*، *algD* در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوز

مهسا احمدزاده کلنگستانی^۱، ساجده معظمی میرک محله^۱، محمد نیک پسند^۲،
مهدی شهریاری نور^۱، نجمه رنجی^{۱*}

^۱ گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۲ گروه شیمی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن بیمارستانی فرصت طلب با مقاومت چند دارویی است که به دلیل توانایی در تشکیل بیوفیلم، یک چالش مهم درمانی محسوب می شود. هدف این مطالعه، ارزیابی اثرات نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه در ترکیب با سیپروفلوکساسین بر مهار تشکیل بیوفیلم و تغییر بیان ژن های مرتبط با بیوفیلم در جدایه های بالینی مقاوم بود

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۵/۲۸
بازنگری ۱۴۰۴/۰۶/۱۴
پذیرش ۱۴۰۴/۰۶/۱۶

مواد و روش: در این مطالعه، 26 جدایه بالینی *P. aeruginosa* از بیمارستان های تهران جمع آوری و پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی آنها با روش کربی بائر تعیین شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به روش برات میکرو دیلوشن ارزیابی شد. نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه سنتز شده و عملکرد ضد بیوفیلمی آنها در ترکیب با سیپروفلوکساسین بررسی شد. اثرات هم افزایی با آزمون چکر بورد، میزان تشکیل بیوفیلم با روش رنگ آمیزی کریستال ویوله، و بیان ژن های *pelA*، *pslA*، *algD* با Q-RT-PCR بررسی شدند

کلمات کلیدی

سودوموناس آئروژینوزا
بیوفیلم
نانوکامپوزیت مگنتیک
اناریجه
سیپروفلوکساسین

یافته ها: آنالیز فیزیکی شیمیایی سنتز موفق نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه را با اندازه ذرات 28 تا 82 نانومتر تأیید کرد. همه جدایه ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و MIC در محدوده 128 تا 1024 میکروگرم/میلی لیتر بود. آزمون چکر بورد، اثر هم افزایی بین نانوکامپوزیت های عامل دار شده با اناریجه و سیپروفلوکساسین در سویه ATCC 9027 و چندین جدایه بالینی نشان داد. علاوه بر این، تیمار ترکیبی باعث کاهش معنی دار تشکیل بیوفیلم و کاهش بیان ژن های *pelA*، *pslA*، *algD* در مقایسه با تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی شد ($P < 0.05$).

* مسئول مکاتبات:

na.ranji@iaub.ac.ir

نتیجه گیری: این یافته ها نشان می دهد که نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه می تواند اثر ضدباکتریایی سیپروفلوکساسین علیه جدایه های مقاوم *P. aeruginosa* را از طریق کاهش بیان ژن های مرتبط با تشکیل بیوفیلم، افزایش دهد

شیوه آدرس دهی این مقاله: م احمدزاده کلنگستانی، س معظمی میرک محله، م نیک پسند، م شهریاری نور، ن رنجی. مهار تشکیل بیوفیلم بواسطه تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین و کاهش بیان ژن های *pelA*، *pslA*، *algD* در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا. مجله

doi:

دانش زیستی ایران. ۲۰۱۴۰۴ (۱): ۴۷-۶۰

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

شابا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

شابا الکترونیکی: X ۴۵۹ - ۲۷۱۷

نویسندگان: حق مؤلف ©

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی با مقاومت های چند دارویی گزارش می شود. مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا یک چالش درمانی جدی است که به طور قابل توجهی باعث افزایش مرگ و میر بیمارستانی و افزایش هزینه های درمانی می شود (۱). یکی از علل تشدید کننده مقاومت های دارویی در سودوموناس آئروژینوزا، توانایی این پاتوژن در تشکیل بیوفیلم و اتصال به سطوح است. بیوفیلم ساختاری منسجم از تجمع باکتریایی است، که توسط سلول های پاتوژن تولید شده و به عنوان یک عامل محافظتی باکتریایی در برابر سیستم ایمنی بیمار، آنتی بیوتیک ها و دیگر عوامل محیطی محسوب می شود. بطوریکه به عنوان نمونه، در افراد مبتلا به سیستمیک فیروزیز مشاهده شده که تشکیل بیوفیلم علت اصلی زنده ماندن سودوموناس آئروژینوزا و همچنین یک یاز علل افزایش دهنده مقاومت به آنتی بیوتیکها و مقابله در برابر پاسخ دفاعی میزبان است (۲). ساختار بیوفیلم ها از پلی ساکاریدها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدهایی تشکیل می شود که باعث ثبات ساختار آن ها و افزایش چسبندگی به سطوح می شوند. این شبکه منسجم، باعث اتصال سلول های باکتری به هم و بی حرکت شدن آنها در محل اتصال می شود (۳). قابل ذکر است مقاومت سودوموناس آئروژینوزا در برابر آنتی بیوتیک ها هنگام رشد به صورت بیوفیلم نسبت به زمانی که در حالت پلانکتونی و معلق هستند، افزایش می یابد. پایداری ساختار بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا با تولید سه پلی ساکارید اصلی به نام های Pel، Psl و آلژینات (*algD*) تعیین می شود. حضور Pel و Psl در مراحل اولیه تشکیل بیوفیلم ضروری است. Psl یک پنتاساکارید است که از D-گلوکز، D-مانوز و L-رامنوز تشکیل شده است. پلی

ساکارید Pel عمدتاً از گلوکز تشکیل شده است و آلژینات یک پلیمر خطی متشکل از دی-مانورونیک اسید و ال-گلورونیک اسید است که مسئول پایداری ساختار، حفظ آب و مواد مغذی و همچنین محافظت از پاتوژن است (۴). تولید کپسول از جنس آلژینات یکی از مهمترین عوامل بیماریزایی سودوموناس آئروژینوزا محسوب می شود. عملکردهای بیماریزای مرتبط با آلژینات شامل مهار و تداخل مستقیم با فاگوسیتوز، حفاظت باکتری در برابر آنتی بیوتیک ها، ساخت بیوفیلم، ممانعت از کموتاکسی لکوسیت ها، جذب رادیکال های آزاد سمی و شکل گیری میکروکلونی های باکتریایی است (۵)

از آنجایی که ترکیبات طبیعی گیاهی به دلیل مصرف روزانه یا در طب سنتی، با بدن انسان سازگارترند و عوارض جانبی کمتری دارند (۶، ۷)، محققین به استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان منبعی از فیتوکمیکال ها جهت درمان های کمکی عفونتهای بیمارستانی (۸)، دیابت (۹)، سرطانها (۷) و ... توجه بسیاری دارند. اناریجه یک گیاه ارزشمند از خانواده چتریان (*Apiaceae*) دارای پراکندگی جغرافیایی محدود در آناتولی، ایران، ترکمنستان، افغانستان، قفقاز و عراق می باشد (۸). این گیاه در ایران در مناطق شمالی، شمال غرب، مرکزی، شرق و شمال شرق پراکنده است. اناریجه دارای ترکیبات شیمیایی همچون میرسنون، لیمون و ترپینولن است (۱۰) که دارای خواص دارویی متنوعی از جمله خواص ضد باکتریایی (۱۱)، ضد قارچی (۱۲) و ضد سرطانی (۱۳) می باشد (۹). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر نانوکامپوزیت های مگنتیک (Fe_3O_4) عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین بر مهار تشکیل بیوفیلم در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین بود

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و شناسایی باکتری

پنجاه و هشت جدایه مشکوک سودوموناس آئروژینوزا در سال ۱۴۰۳ با کد اخلاق IR.IAU.RASHT. 1403.030 از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، از بیمارستان های تهران جمع آوری گردید. تعیین هویت جدایه ها به کمک رنگ آمیزی گرم، تست های کاتالاز، اکسیداز، سیمون سیترات، TSI، کشت در محیط

سیتیماید آگار و رشد در دمای $42^{\circ}C$ صورت گرفت (۱۴)

سنتز نانوکامپوزیت Fe_3O_4 عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه

در ابتدا برگ اناریجه از بازارهای محلی در رودسر (شرق گیلان) خریداری شد. پس از شست و خشک کردن برگها، حدود ۶ گرم برگ اناریجه (*Froriepia subpinnata*)

پادتن طب (تهران، ایران) بررسی شد. بعد از 18 تا 30 ساعت انکوباسیون در 37°C ، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک مطابق با استاندارد CLSI 2023 ارزیابی شد

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

جهت تعیین MIC در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکسایین، از روش براث میکرودايلوشن استفاده شد. به این منظور کدورت نیم مک فارلند هر جدایه به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (0.1 nm - 0.08 OD_{630}) تعیین شد. در ادامه، رقت‌های متوالی سیپروفلوکسایین تزریقی (روناک دارو، ایران) در محدوده غلظتی 1 تا 1024 میکروگرم در میلی لیتر در پلیت 96 خانه ای ته صاف، اضافه شد. سپس، به رقت‌های مختلف سیپروفلوکسایین در هر چاهک، 100 میکرولیتر از کدورت نیم مک فارلند از هر جدایه، اضافه شد و در دمای 37°C به مدت 24-18 ساعت نگهداری شد. نتایج MIC، طبق استاندارد CLSI 2023 تفسیر گردید. از سوی دیگر، تعیین MIC نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ گیاه اناریجه، نیز صورت گرفت. به این منظور رقت‌های متوالی از نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با برگ گیاه اناریجه در محدوده غلظتی 1 تا 1024 میکروگرم در میلی لیتر در چاهک های پلیت 96 خانه‌ای ته صاف، اضافه شد. به هر چاهک 100 میکرولیتر از کدورت نیم مک فارلند جدایه مورد بررسی، اضافه شد و در دمای 37°C به مدت 24 ساعت انکوبه شد

بررسی اثر هم افزایی

به منظور ارزیابی اثرات هم افزایی (سینرژستیک) بین دو ترکیب دارویی سیپروفلوکسایین و عصاره برگ اناریجه، از روش چکر بورد بهره برده شد. بدین منظور، در ستون‌های عمودی میکروپلیت 96 خانه‌ای غلظت‌های مختلف سیپروفلوکسایین MNCs (دارو A) ریخته شد، و در ردیف‌های افقی میکروپلیت، غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه (دارو B) اضافه شد. به هر چاهک، سوسپانسیون باکتریایی در غلظت نهایی 5×10^5 - 7×10^5 CFU/mL افزوده شد. به این ترتیب هر دو داروی A و B با شیب غلظتی در میکروپلیت اضافه و هر چاهک ترکیبی از دو دارو را در اختیار سلول‌های باکتریایی جهت برر سی اثر بخشی

آسیاب شد. سپس پودر خشک گیاه، در 100 میلی لیتر آب مقطر حل شده و همراه با سود ۲ نرمال در استیرر مغناطیسی هم زده شد (مخلوط واکنش الف). سپس یک گرم اکسید آهن (Fe_3O_4) با زایلن مخلوط و تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس، ترکیب 3-کلروپروپیل تری اتوکسی به مخلوط واکنش اضافه شد و سانتیفیوژ شد (مخلوط واکنش ب). در ادامه عصاره گیاهی اناریجه (مخلوط واکنش الف)، طی 2-3 ساعت به تدریج به مخلوط واکنش ب اضافه و به مدت 48 ساعت در دمای اتاق در استیرر مغناطیسی هم زده شد. محصول نهایی (نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با برگ گیاه اناریجه) در دمای 60°C خشک گردید.

آزمون FTIR

طیف سنجی مادون قرمز مربوط به Fe_3O_4 ، عصاره برگ اناریجه و نانو کامپوزیت های عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه با دستگاه طیف سنج (Shimadzu FTIR(Europe Shimadzu 8400S - مورد بررسی قرار گرفت (۱۵)

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

ساختار نانو کامپوزیت های عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی MIRA3 (FE-SEM) TESCAN مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، FE-SEM برای بررسی اندازه ذرات مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور نمونه بصورت یک قطره 1 mg/ml از نانو کامپوزیت های عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه در سطح اسلاید کربنی با یک لایه طلا به ضخامت $100\text{ \AA}$ پوشانده شد و تصاویر با ولتاژ فزاینده 26 کیلو وات بدست آمد (۱۶)

بررسی پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک

به منظور تعیین پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی در 20 جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا از بین 58 جدایه بیمارستانی، از آزمون کربی بائر (انتشار از دیسک) استفاده شد. میزان حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکسایین ($5\text{ }\mu\text{g}$)، پایپراسیلین ($100\text{ }\mu\text{g}$)، جنتامایسین ($10\text{ }\mu\text{g}$)، ایمپی پنم ($10\text{ }\mu\text{g}$) و آمیکاسین ($30\text{ }\mu\text{g}$) به کمک دیسک‌های آنتی بیوگرام از شرکت

بررسی بیان ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم تحت

تیمار با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین

جهت بررسی بیان ژنهای *algD*, *pslA*, *pelA* سویه استاندارد ATCC 9027 و دو جدایه بالینی بصورت تصادفی انتخاب شد. جدایه ها با کدورت $5-7/5 \times 10^5$ CFU/mL تحت تیمار با (1) نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه (MIC ۲/۱ ترکیبی) و سیپروفلوکساسین (MIC1/2 ترکیبی) (گروه تست) و (2) سیپروفلوکساسین (MIC1/2 ترکیبی) (گروه کنترل) در دمای 37°C به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. سپس مطابق با دستور کار کیت RN^{PLUS} (سیناکلون، تهران)، استخراج RNA تام سلولی از دو گروه تست و کنترل صورت گرفت. از کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیز آزما (تهران) جهت سنتز cDNA استفاده شد. به این منظور RNA، ابتدا اولیگ dT (50M) و آب DEPC به حجم نهایی $13/5\text{ }\mu\text{L}$ رسیده و در دمای 70°C در دستگاه ترموسایکلر (BioRad، آلمان) به مدت 5 دقیقه قرار گرفت. سپس بافر $0 \times$ first strand، RNasin، dNTPs (10M) و آنزیم MMLV μM به اجزای واکنش اضافه و به مدت 60 دقیقه در دمای 42°C و به مدت 10 دقیقه در دمای 70°C در دستگاه ترموسایکلر BioRad (آلمان) قرار داده شد. بررسی سطح بیان ژن‌ها در دو گروه تست و کنترل به روش qRT-PCR با استفاده از کیت SYBR Premix SYBR green (یکتا تجهیز آزما، تهران) در دستگاه ABI StepOne (Applied Biosystems، امریکا) صورت گرفت. برنامه دمایی واکنش qRT-PCR به قرار ذیل بود: مرحله واسرشت شدن ابتدایی (95°C به مدت 3 دقیقه) و $40 \times$ سیکل شامل 92°C به مدت 5 ثانیه، 60°C به مدت 10 ثانیه و 72°C به مدت 10 ثانیه. ژن *rpsL* به عنوان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در جدول 1 ذکر شده است. واکنش‌ها حداقل دو بار تکرار شد و نتایج به بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد. آنالیز بیان ژن‌ها در نمونه‌های تست و کنترل به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ صورت گرفت

داروها قرار داد. شاخص غلظت مهارکنندگی کسری¹ (FICI) با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد (۱۶):

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

بررسی مهار تشکیل بیوفیلم تحت تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین

جهت بررسی مهار تشکیل بیوفیلم از رنگ آمیزی کریستال ویوله بهره برده شد. بیست جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا از نظر تشکیل بیوفیلم 24 ساعت بعد از کشت در محیط مولر هینتون آگار و انکوبه در دمای 37°C ، بررسی شدند.

در ادامه، سویه استاندارد (ATCC 9027) و سه جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا تحت تیمار با دو دارو (MIC هر دو دارو در حالت ترکیبی) در مقایسه با تیمار با سیپروفلوکساسین (MIC در حالت ترکیبی) به تنهایی و بدون تیمار با داروها به مدت 24 ساعت قرار گرفتند. هدف از این آزمون، بررسی اثربخشی عصاره برگ اناریجه بر سیپروفلوکساسین در حالت ترکیبی در مقایسه با سیپروفلوکساسین به تنهایی مشابه با مطالعات قبلی (15، 17) بود. بدین منظور، کدورت نیم مک فارلند ($0/5 \times 10^8$ CFU/mL) از هر باکتری تهیه شد.

سپس 100 میکرولیتر از هر باکتری با غلظت نهایی $5-7/5 \times 10^5$ CFU/mL، تحت تیمار با (1) نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه (MIC1/2 ترکیبی) و سیپروفلوکساسین (MIC1/2 ترکیبی) (2) سیپروفلوکساسین (MIC1/2 ترکیبی) و (3) بدون تیمار با دو دارو به مدت 24 ساعت در دمای 37°C قرار گرفتند. بعد از 24 ساعت، سلول های معلق و پلانکتونی با PBS (بافر نمکی فسفات) شسته و از چاهک ها خارج شد. در ادامه، با متانول 95٪ به مدت پنج دقیقه، تثبیت سلولهای چسبیده به سطح چاهک ها صورت گرفت. سپس، چاهک ها با کریستال ویوله 1٪ به مدت 10 دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از سه بار شستشو، اسید استیک 33٪ به هر چاهک اضافه و تشکیل بیوفیلم در طول موج 557 نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (Biotek USA، Biotek ELx800) به صورت OD خوانده شد (۱۶)

¹Fractional Inhibitory Concentration

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول (bp)	رفرنس
<i>algD-F</i>	5'-ATCTCATCACCAGCCACGAC-3'	187	GenBank: CP034908.2
<i>algD-R</i>	5'-TATTCCTTGTGGCCCCGTG-3'		
<i>pslA-F</i>	5'-ACCGGGCCTGGATGAAACGC-3'	127	(15)
<i>pslA-R</i>	5'-AAGCCGATGATGCCGAGCG-3'		
<i>pelA-F</i>	5'-CAGCAAGAAAGGAATCGCCG-3'	200	GenBank: CP034908.2
<i>pelA-R</i>	5'-AGTCGAAGTGGGAAAGCTCG-3'		
<i>rpsL-F</i>	5'-CTCGGCACTGCGTAAGGTAT-3'	216	(15)
<i>rpsL-R</i>	5'-CCGTACTTCGAACGACCCTG-3'		

آنالیز آماری

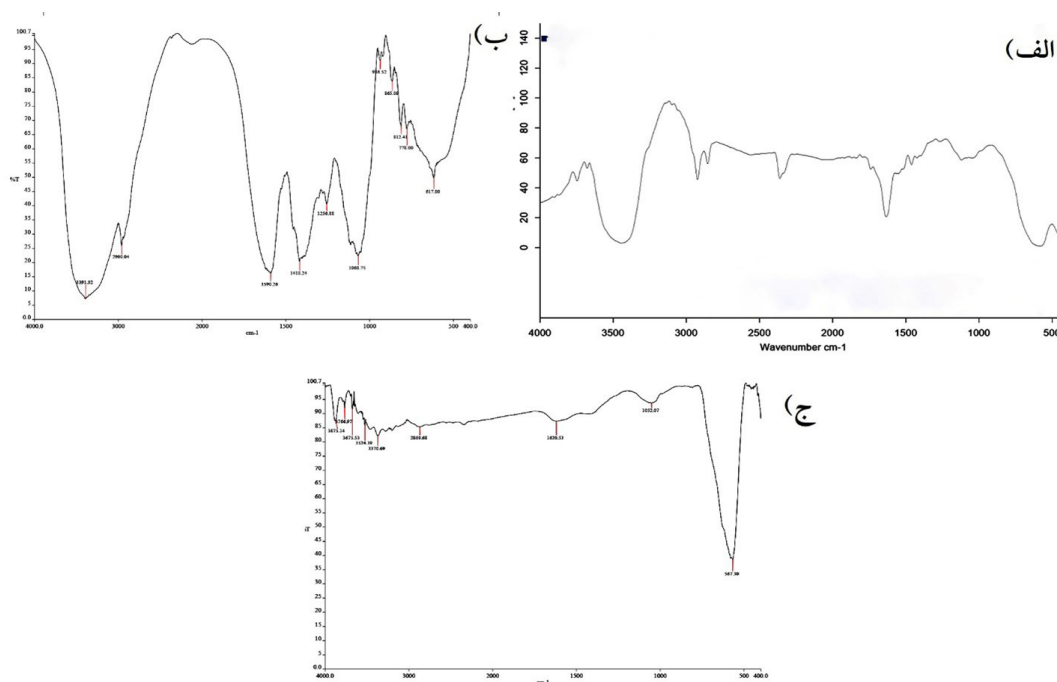
و آزمون t-test ارزیابی شد. مقدار $P < 0,05$ جهت بررسی معنی دار بودن نتایج استفاده شد

نتایج بیان ژن با توزیع نرمال، به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد. اختلاف آماری بین دو گروه تست و کنترل، به کمک از نرم افزار GraphPad Prism 8

نتایج

عاملی متصل به نانوکامپوزیت های سنتز شده انجام شد. طیف گیری FTIR در محدوده 4000 cm^{-1} و 400 به دست آمد. عدد موج در محدوده $3600-3300 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H گروه های فنلی موجود در عصاره برگ اناریجه و گروه های هیدروکسیل نانوکامپوزیت های اکسید آهن عامل دار شده با عصاره

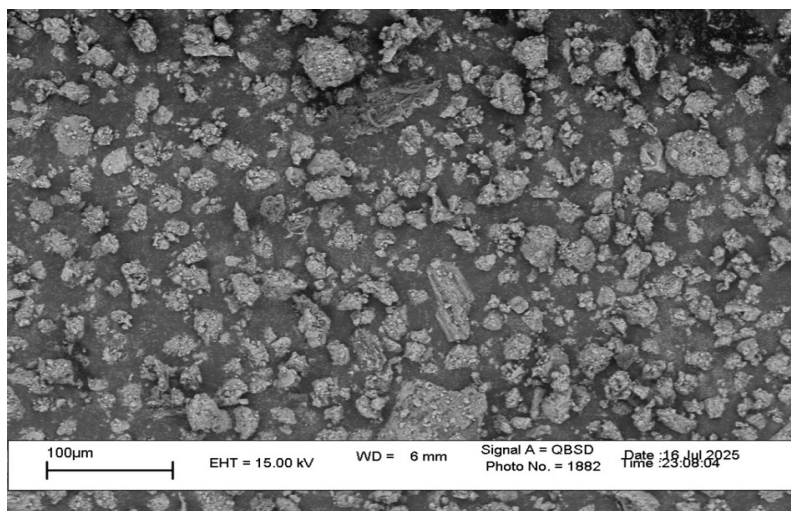
آنالیز فیزیکوشیمی نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه
طیف FT-IR ی اکسید آهن (Fe_3O_4)، عصاره برگ اناریجه و نانوکامپوزیت های اکسید آهن عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه با استفاده از طیف سنج (Shimadzu Europe) Shimadzu FTIR - 8400S برای شناسایی گروه های



شکل ۱. نتایج FTIR مربوط به الف) اکسید آهن (Fe_3O_4)، ب) عصاره برگ اناریجه و ج) نانوکامپوزیت های اکسید آهن عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه

Fe_3O_4 منطبق است، که وجود Fe_3O_4 در نانوکامپوزیت های مغنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه را تایید کرد (شکل ۱)

برگ اناریجه است. یک نواری در 11615 cm^{-1} قابل مشاهده است که به ارتعاشات کششی $\text{C}=\text{C}$ گروه آروماتیک و وینیل اختصاص دارد. همچنین، یک نواری در 550 cm^{-1} که به ارتعاشات $\text{Fe}-\text{O}$ در هسته نانو-



شکل ۲. تصویر FE-SEM مربوط به نانوکامپوزیت های مغنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه

(%)، سوختگی (50%) و عفونت خون (7/7%) با توزیع 61/53% در زنان و 38/46% در مردان، در محدوده سنی 20 تا 60 سال جداسازی شد. نتایج انتشار از دیسک با پنج دیسک آنتی بیوگرام برای 26 جدایه بالینی، نشان داد که 84/6% جدایه ها به روش انتشار از دیسک مقاوم به ایمنی پنم و 65/4% جدایه ها مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شد.

ابعاد نانوکامپوزیت ها در محدوده 28 تا 82 نانومتر مطابق با تصویر FE-SEM در شکل 2 تعیین شد. نمایش فوق، یکنواختی اجزای ذره و آرایش متقارن نانوکامپوزیت ها را نشان می دهد

پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی

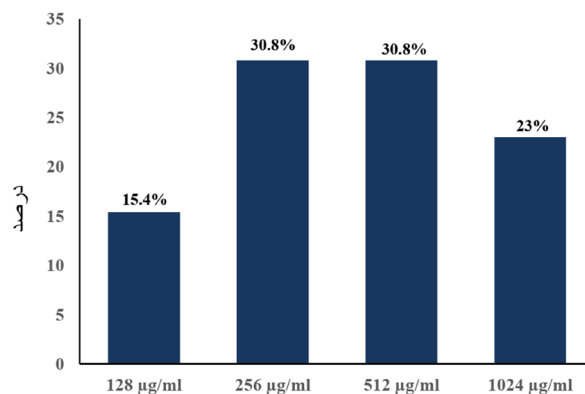
در این مطالعه توصیفی تحلیلی، 26 جدایه سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان های تهران از عفونت ادراری (42/3)

جدول ۲. الگوی حساسیت جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بر طبق CLSI 2023 به روش کربی بائر (انتشار از دیسک)

آنتی بیوتیک	سیپروفلوکساسین	پایراسیلین	جنتامایسین	ایمنی پنم	آمیکاسین
حساس (Susceptible)	9 (34/6%)	7 (26/9%)	9 (34/6%)	2 (7/7%)	8 (30/8%)
نیمه حساس (Intermediate)	0 (0%)	2 (7/7%)	1 (3/8%)	2 (7/7%)	1 (3/8%)
مقاوم (Resistant)	17 (65/4%)	17 (65/4%)	16 (61/5%)	22 (84/6%)	17 (65/4%)

محدوده 128 تا 1024 میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد (نمودار ۱). MIC نانوکامپوزیت های مغنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه در همه جدایه ها، بیشتر از 1024 میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد

تعیین MIC سیپروفلوکساسین و نانوکامپوزیت های مغنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه در همه جدایه ها به روش برات میکرودايلوشن، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) سیپروفلوکساسین در



نمودار ۱. توزیع میزان MIC سیپروفلوکساسین بصورت درصد در 26 جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا

ارزیابی اثر هم افزایی بین عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین

جهت بررسی اثر هم افزایی (سینرژستیک) بین نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین در سویه استاندارد ATCC 9027 و پنج جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا از آزمون چکر بورد بهره برده شد. مطابق فرمول محاسبه شاخص FIC (۱۶)، اثر هم افزایی در سویه استاندارد و پنج جدایه بالینی، مشاهده شد (جدول ۳)

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

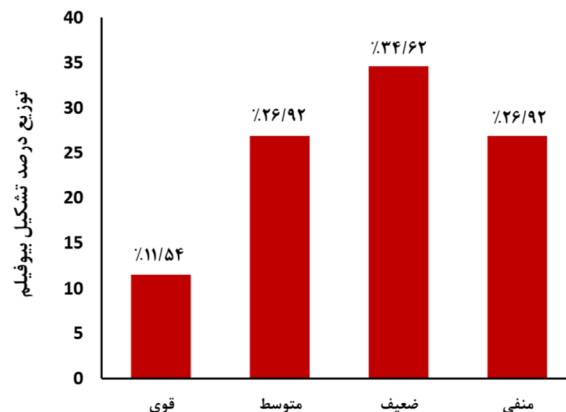
مهار تشکیل بیوفیلم

جهت بررسی میزان تشکیل بیوفیلم در 26 جدایه بالینی مورد مطالعه، همه جدایه ها بعد از کشت 24 ساعته با کریستال ویوله رنگ آمیزی و میزان تشکیل بیوفیلم بر اساس میزان جذب خوانده شده توسط دستگاه الیزا ریدر به چهار گروه قوی، متوسط، ضعیف و منفی (بدون تشکیل بیوفیلم) دسته بندی شد. میزان تشکیل بیوفیلم در 26 جدایه سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که 11/54٪، 26/92٪ و 34/62٪ از جدایه ها به ترتیب توان تشکیل بیوفیلم قوی، متوسط، ضعیف و 26/92٪ از جدایه ها عدم توان تشکیل بیوفیلم را داشتند (نمودار ۲).

جدول ۳. اثر هم افزایی (سینرژستیک) بین نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین

شماره باکتری	سیپروفلوکساسین	MIC (µg/mL) به تنهایی		MIC ترکیبی (µg/mL)		FICI
		نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه	سیپروفلوکساسین	نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه	سیپروفلوکساسین	
ATCC 9027	32	>1024	8	16	>0/265	
P.14	1024	>1024	128	32	>0/156	
P.15	512	>1024	64	32	>0/156	
P.21	512	>1024	32	32	>0/093	
P.35	512	>1024	128	64	>0/312	
P.44	1024	>1024	128	128	>0/25	

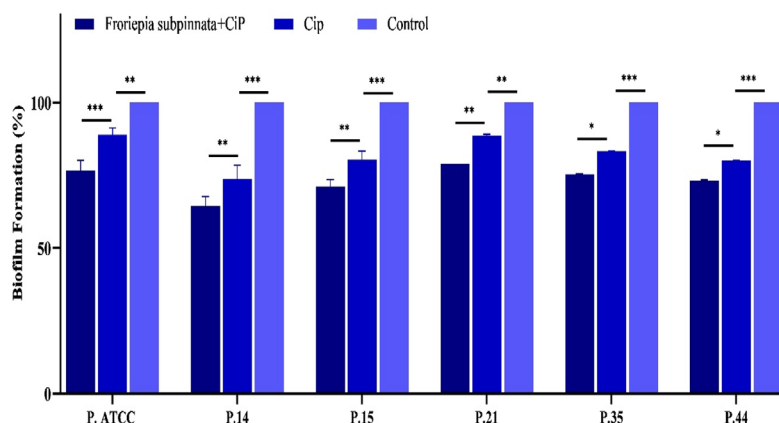
اثر هم افزایی $FICI < 0/5$ ، اثر هم افزایی جزئی $FICI < 0/75$ ، اثر افزایشی $FICI < 0/76$ *** 1



نمودار ۲. توزیع درصد تشکیل بیوفیلم در 26 جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا.

سیپروفلوکساسین (1/2 MIC در حالت ترکیبی) بیشتر از تحت تیمار به تنهایی با سیپروفلوکساسین (1/2 MIC در حالت ترکیبی) و در مقایسه با بدون تیمار با هر دو دارو بود (نمودار ۳)

میزان مهار تشکیل بیوفیلم در سویه استاندارد ATCC 9027 و پنج جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوز تحت تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه (1/2 MIC در حالت ترکیبی) و

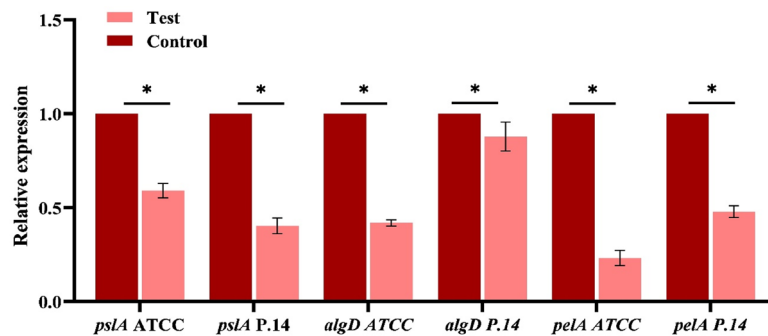


نمودار ۳. میزان مهار تشکیل بیوفیلم (بصورت درصد) در سویه استاندارد (ATCC 9027) و پنج جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوز تحت تیمار با سه گروه (1) تحت تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه (*Freriepia subpinnata*) و سیپروفلوکساسین، (2) تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی و (3) کنترل. هر آزمون حداقل دو بار تکرار شد. نتایج بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است. اختلاف معنی دار بین گروه های مورد مقایسه، بصورت $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, و $P < 0,001$ *** نشان داده شده است

دار شده با عصاره برگ اناریجه (1/2 MIC در حالت ترکیبی) و سیپروفلوکساسین (1/2 MIC در حالت ترکیبی) در مقایسه با گروه تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی (1/2 MIC در حالت ترکیبی)، کاهش معنی دار ($P < 0,05$) نشان داد (نمودار ۴)

مهار بیان ژن های مؤثر در تشکیل بیوفیلم

جهت بررسی بیان ژن های مؤثر در مهار تشکیل بیوفیلم از روش Real time PCR کمی (Q-RT-PCR)، بهره برده شد. آنالیز نتایج Q-RT-PCR نشان داد که بیان ژن های *pelA*، *pslA*، *algD* در سویه استاندارد و جدایه شماره 14 در گروه تحت تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل



مؤداره. میزان تغییر بیان کمی ژن های مؤثر در تشکیل بیوفیلم (*pslA*، *algD* و *pelA*) در سویه استاندارد و جدایه شماره ۱۴ در گروه تحت تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده حاوی اناریجه و سیپروفلوکساسین (گروه تست) در مقایسه با گروه تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی (گروه کنترل). هر آزمون حداقل دو بار تکرار شد. نتایج بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. اختلاف معنی دار بین گروه های تست و کنترل، بصورت $P < 0,05$ * نشان داده شده است.

بحث

آرژوینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین، شدند. در مطالعه سلیمی و همکاران نانوکامپوزیت های $ZnO/GO/Fe_3O_4$ و $ZnO/GO/Fe_3O_4$ با اندازه تقریبی ۴۲ تا ۵۳ نانومتر، خواص ضد سرطانی نشان دادند (۲۱). در مطالعه پورعسگر و همکاران نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با ترکیب فعال زردچوبه (کورکومین) با میانگین اندازه ۴۰ تا ۸۰ نانومتر سنتز و دارای خواص مغناطیسی و ضد باکتریایی و ضد سرطانی تشخیص داده شد (۲۰). در مطالعه Xia و همکاران سنتز نانوذرات با میانگین اندازه ۴۰ تا ۸۰ نانومتر توان جذب درون سلولی و زیست تخریب پذیری مناسبی داشت (۲۲). در مطالعه حاضر نیز نانوکامپوزیت های مغناطیسی عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه اندازه ۲۸ تا ۸۲ نانومتر با خواص مغناطیسی داشتند که برای جذب توسط سلولها مناسب بوده و به این خاطر توانست در ترکیب با سیپروفلوکساسین خواص ضد باکتریایی در غلظت های کم دارو را نشان دهد.

ایمانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ با مطالعه بر روی ۶۹ جدایه های سودوموناس آرژوینوزا بدست آمده از چندین آزمایشگاه و بیمارستان در رشت و لاهیجان از نمونه های سوختگی، ادراری، ترشحات تنفسی، نکروز بافتی، خون، گوش نشان دادند که ۳۳/۳۳٪ این جدایه ها به روش انتشار از دیسک و ۶۸/۳۷٪ جدایه ها به روش برات دایلویشن (تعیین MIC) به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه ها به روش برات دایلویشن بین ۳۲ تا ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد (۲۳). در مطالعه مشیریان فرهی و همکاران در سال ۲۰۱۸ از میان ۵۷ جدایه سودوموناس آرژوینوز

در مطالعات مشخص شده که گیاه برگ اناریجه (*Froriepia subpinnata*)، یک گیاه بومی ایران، ترکمنستان، افغانستان، قفقاز و عراق (۸)، دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی (۱۸)، و ضد سرطانی (۱۹) است. نانوذرات مگنتیک می توانند به کمک میدان مغناطیسی سمت بافت هدف، هدایت شده و باعث اثربخشی بیشتر و سریعتر درمان شوند. همچنین به دلیل کوچک بودن اندازه، سطح فعال وسیع جهت اتصال با ترکیبات دارویی، زیست تخریب پذیری، سمیت کم، و پایداری بالا در مایعات بدن این نانوذرات، گزینه مناسبی برای استفاده در دارورسانی ها هستند (۱۵). از سوی دیگر، Fe_3O_4 دارای ارجحیت به دیگر مواد مغناطیسی، به خاطر داشتن Fe^{+2} (یک دهنده الکترون) است. در نتیجه این نانوذرات (Fe_3O_4)، سایت های اتصال شیمیایی به داروها، لیگندهای هدف، ژنها، و دیگر ترکیبات دارویی را جهت دارورسانی هدفمند، اعطا می کند (۲۰). به این خاطر، به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی همچون میرسنون، لیمونن، ترپینولن و ... (۱۰) در عصاره این گیاه، و حلالیت کم این ترکیبات دارویی در آب و به تبع در مایعات بدن، در این مطالعه سعی شد از نانوکامپوزیت های مگنتیک جهت افزایش رهایش عصاره برگ اناریجه استفاده شود تا ترکیبات موجود در این گیاه، در ابعاد نانوذرات به درون سلولهای پاتوژن وارد و اثربخشی عصاره گیاهی را افزایش دهند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه در ترکیب با سیپروفلوکساسین قادر به مهار رشد و مهار تشکیل بیوفیلم در جدایه های سودوموناس

جدا شده از بیمارستان‌های تهران، 41/37٪ جدایه‌ها به‌روش انتشار از دیسک، مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. همچنین از 30 جدایه مورد ارزیابی با MIC، 22 جدایه دارای MIC بیشتر از 4 µg/ml بودند (۲۴). در مطالعه رجب پور و همکاران، در سال 2013 از 100 جدایه بیمارستانی سودوموناس آئروژینوزا، حدود 90 درصد موارد، مقاوم به سیپروفلوکساسین به روش MIC گزارش شد (۲۵). در مطالعه حاضر از بین 26 جدایه بدست آمده از بیمارستان‌های تهران، 17 جدایه (65/4٪) به‌روش انتشار از دیسک مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شد. درحالی که همه جدایه‌ها به روش براث میکرودايلوشن، دارای MIC در محدوده 128 تا 1024 میکروگرم در میلی لیتر و مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شدند. نرخ مقاومت به روش انتشار از دیسک و MIC در این مطالعه مشابه با مطالعات پیشین بود. مشابه با مطالعه ایمانی و همکاران، تفاوت میزان مقاومت در دو روش تعیین حساسیت به دارو، به دلیل دقت بالاتر روش MIC نسبت به روش انتشار از دیسک می باشد. لذا انتظار می رود در مراکز درمانی کشور با وجود چنین گزارشاتی، تعیین MIC جایگزین روش کربی بائر (انتشار از دیسک) جهت تجویز مناسبترین آنتی بیوتیک ها شود

در مطالعه برجی و همکاران در سال 2025 اثر هم افزایی بین نانوذرات مگنتیک عامل دار شده با سیلیبینین و سیپروفلوکساسین در جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد (۱۵). اسماعیلی و همکاران در سال 2019 اثر هم افزایی بین نانوکامپوزیت های اکسید نقره و جنتامایسین را علیه جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند (۲۶). فاطمی و همکاران در سال 2020 اثر هم افزایی بین عصاره متانولی گیاه گندواش با ایمی پنم و آمیکاسین در جدایه های بالینی اسینتو باکتر با مقاومت چنددارویی را گزارش دادند (۲۷). در این مطالعه نیز اثر هم افزایی بین نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده حاوی اناریجه و سیپروفلوکساسین در سویه استاندارد و جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین تأیید شد. بنابراین انتظار می رود بتوان از این گروه از ترکیبات گیاهی در عفونتهای مقاوم به دارو همراه با آنتی بیوتیکها در آینده، به عنوان مکمل های دارویی استفاده کرد.

در مطالعه پسندیده کرد محله و همکاران مشخص شد که نانوکامپوزیت های مگنتیک با پوشش سیلیکا عامل دار شده با سیلیبینین و سیپروفلوکساسین، خاصیت مهار

تشکیل بیوفیلیم در سویه استاندارد ATCC 9027 و جدایه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با سیپروفلوکساسین به تنهایی داشتند (۱۷). در مطالعه پور عسگر و همکاران مشخص شد که تیمار با نانوذرات مگنتیک عامل دار شده با کورکومین و سیپروفلوکساسین، خاصیت مهار تشکیل بیوفیلیم در سویه استاندارد و جدایه های بالینی اسینتو باکتر بومانی از طریق کاهش بیان ژن Bap در مقایسه با تیمار با سیپروفلوکساسین داشتند (۱۶). در مطالعه داریوشی و همکاران در سال 2020 مشخص شد که نانوذرات کورکومین باعث کاهش ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلیم (lasI, pilA, algX) در جدایه های سودوموناس آئروژینوزا شدند (۲۸). در مطالعه Stenvang و همکاران در سال 2016 مشخص شد که gallate-3-Epigallocatechin اثر مهاری تشکیل بیوفیلیم در عفونت های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا دارد (۲۹). کیم و همکاران نشان دادند که ترکیب فعال زنجبیل (جینجرول) باعث کاهش تشکیل بیوفیلیم و کاهش بیان ژنهای مؤثر در کوروم سنسینگ در جدایه های سودوموناس آئروژینوزا می شود (۳۰). در مطالعه حاضر نتایج آزمون تشکیل بیوفیلیم در سویه استاندارد ATCC 9027 و پنج جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا، کاهش تشکیل بیوفیلیم را در گروه تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین در مقایسه با تیمار با سیپروفلوکساسین نشان داد. بنابراین به نظر می رسد نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه، مهار تشکیل بیوفیلیم را در ترکیب با سیپروفلوکساسین افزایش می دهد. همچنین در مطالعه حاضر بیان هر سه ژن مؤثر در تشکیل بیوفیلیم (pelA, spsA, algD) تحت تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده حاوی اناریجه و سیپروفلوکساسین کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد. بر طبق این نتایج انتظار می رود نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده حاوی اناریجه از طریق مهار بیان ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلیم در سلولهای مقاوم به دارو باعث افزایش مهار رشد باکتریها و افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین باشد

نتیجه گیری

با اناریجه و سیپروفلوکساسین در مقایسه با تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی، کاهش معنی دار نشان داد. بنابراین به نظر می رسد نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با اناریجه و سیپروفلوکساسین از طریق کاهش بیان ژن های مؤثر در تشکیل بیوفیلم باعث کاهش رشد سلولهای باکتریایی شدند.

در مطالعه حاضر اثر هم افزایی نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین در جدایه های مقاوم به دارو تأیید شد. همچنین تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده با اناریجه و سیپروفلوکساسین باعث مهار تشکیل بیوفیلم در جدایه های بالینی و سویه استاندارد شد. بیان ژن های مؤثر در تشکیل بیوفیلم *pelA* و *pslA* ، *algD* بعد از تیمار با نانوکامپوزیت های مگنتیک عامل دار شده

References

1. Westbrook-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrenner P, et al. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Dec;43(12):2975-83. DOI: 10.1128/AAC.43.12.2975
2. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Aug;77(15):5238-46. DOI: 10.1128/AEM.00637-11
3. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Sep;8(9):623-33. DOI: 10.1038/nrmicro2415
4. Alva PP, Sundar S, D'Souza C, Premanath R. Increased expression of genes involved in biofilm formation in a multidrug-resistant environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *J Datta Meghe Inst Med Sci Univ*. 2021;16(2):357-62.
5. Kaboli Chalmardi M, Gholami M, Hajilou N, Kakavan M, Haghshenas M, Goli HR. Investigating the Frequency of *AlgD* Gene in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Collected from Teaching-Therapeutic Hospitals of Mazandaran-2022. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2024;34(232):218-27.
6. Pakizehkar S, Ranji N, Sohi AN, Sadeghizadeh M. Polymersome-assisted delivery of curcumin: A suitable approach to decrease cancer stemness markers and regulate miRNAs expression in HT29 colorectal cancer cells. *Polym Adv Technol*. 2020 Jan;31(1):160-77. DOI: 10.1002/pat.4754
7. Pakizehkar S, Ranji N, Naderi Sohi A, Sadeghizadeh M. Curcumin loaded PEG400-OA nanoparticles: A suitable system to increase apoptosis, decrease migration, and deregulate miR-125b/miR182 in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Polym Adv Technol*. 2020 Aug;31(8):1793-804. DOI: 10.1002/pat.4917
8. Aladejana EB, Adelabu OA, Aladejana AE, Ndlovu SI. Antimicrobial properties of alternative medicines used in the management of infections in diabetic patients: A comprehensive review. *Pharmacol Res Mod Chin Med*. 2024 Sep;11:100432. DOI: 10.1016/j.prmcm.2024.100432
9. Asafo-Agyei T, Appau Y, Barimah KB, Asase A. Medicinal plants used for management of diabetes and hypertension in Ghana. *Heliyon*. 2023 Dec;9(12):e22977. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e22977
10. Mirzania F, Sarrafi Y, Moridi Farimani M. Comparative Evaluation of Chemical Compositions and Biological Activities of Wild and Cultivated *Froriepia subpinnata* L. Essential Oils. *J Agric Sci Technol*. 2019;21(2):331-40.
11. Bandian L, Moghaddam M, bahraini m. Investigate the antimicrobial activity and synergistic effects of *Zataria multiflora*, *Salvia verticillata* and *Froriepia subpinnata* ethanolic extracts on bacterial vegetables decay. *J Food Microbiol*. 2021;1(8):45-57.
12. Adel M, Safari R, Nematollahi A, Ghiasi M, Nafian Dehkordi I. Evaluation of antifungal activity of essential oils of *Eryngium campestre*, *Cuminum cyminum*, *Pimpinella affinis* and *Allium sativum* on *Fusarium solani* isolated from ornamental aquarium fish. *J Appl Ichthyol Res*. 2015;2(4):23-32.
13. Esmailpour K, Shourian M. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Pimpinella affinis* Leaf and Stem Extracts and Evaluation of Their Cytotoxic Effects Against Human Breast Cancer Cells Under In-vitro Condition. *Cell Tissue J*. 2023;14(3):217-40.

14. 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*. *J Microb World*. 2018;36(11):269-77.
15. Borji S, Shahriarinnour M, Shariati S, Ranji N, Nikpassand M. Enhanced therapeutic efficacy of silibinin loaded silica coated magnetic nanocomposites against *Pseudomonas aeruginosa* in Combination with Ciprofloxacin and HepG2 cancer cells. *Sci Rep*. 2025;15(1):21498. DOI: 10.1038/s41598-025-87012-4
16. Pourasgar S, Ranji N, Asadpour L, Shahriarinnour M, Nikpassand M. Antibacterial and Anti-cancer Properties of Curcumin-Functionalized Silica-Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles. *Arab J Sci Eng*. 2024.
17. Kordmahaleh NP, Mipour M, Ranji N, Shahriarinnour M, Nikpassand M. Anti-bacterial activity of silibinin-functionalized silica-coated Fe₃O₄ magnetic nanocomposites on *Pseudomonas aeruginosa*. *3 Biotech*. 2025;15(8):253.
18. Bahrami A, Jamzad M, Sedaghat S. Phytochemicals and Biological Activities of *Froriepia subpinnata* (Ledeb.) Baill. Extracts. *J Med plants By-products*. 2021;10(1):109-15.
19. Rostamabadi H, Samandari Bahraseman MR, Esmaeilzadeh-Salestani K. *Froriepia subpinnata* Leaf Extract-Induced Apoptosis in the MCF-7 Breast Cancer Cell Line by Increasing Intracellular Oxidative Stress. *Iran J Pharm Res*. 2023;22(1):e136643. DOI: 10.5812/ijpr-136643
20. Pourasgar S, Ranji N, Asadpour L, Shahriarinnour M, Nikpassand M. Antibacterial and Anti-cancer Properties of Curcumin-Functionalized Silica-Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles. *Arab J Sci Eng*. 2025;50(9):6231-49.
21. Salimi N, Mohammadi-Manesh E, Ahmadvand N, Danafar H, Ghiasvand S. Curcumin-Loaded by Fe₃O₄/GO and Fe₃O₄/ZnO/GO Nanocomposites for Drug Delivery Applications: Synthesis, Characterization and Anticancer Assessment. *J Inorg Organomet Polym Mater*. 2024;34(3):1256-71. DOI: 10.1007/s10904-023-02879-3
22. Xia Q, Huang J, Feng Q, Chen X, Liu X, Li X, et al. Size- and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:6957-70. DOI: 10.2147/IJN.S215005
23. 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. *J Arak Univ Med Sci*. 2018;21(2):10-20.
24. 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 Aug;10(4):242-9. PMID: 30675330; PMCID: PMC6339890.
25. 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). *Iran J Med Microbiol*. 2013;7(3):18-25.
26. Esmaili S, Hosseini Doust R. Synergistic effect of silver nanoparticles (AgNPs) and gentamicin against clinical isolates of *Pseudomona aeruginosa*. *Med Sci J Islam Azad Univ*. 2019;29(1):64-70.
27. Fatemi N, Sharifmoghadam MR, Bahreini M, Khameneh B, Shadifar H. Antibacterial and Synergistic Effects of Herbal Extracts in Combination with Amikacin and Imipenem Against Multidrug-Resistant Isolates of *Acinetobacter*. *Curr Microbiol*. 2020 Sep;77(9):1959-67. DOI: 10.1007/s00284-020-02075-3
28. Dariushy R, Ashrafi F. Effect of Curcumin Nanoparticles on Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Res Med*. 2022;46(3):95-104.
29. Stenvang M, Dueholm MS, Vad BS, Seviour T, Zeng G, Geifman-Shochat S, et al. Epigallocatechin gallate remodels overexpressed functional amyloids in *Pseudomonas aeruginosa* and increases biofilm susceptibility to antibiotic treatment. *J Biol Chem*. 2016 Dec 23;291(51):26540-53. DOI: 10.1074/jbc.M116.739375
30. Kim HS, Lee SH, Byun Y, Park HD. 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Sci Rep*. 2015 Feb 25;5:8656. DOI: 10.1038/srep08656

photodynamic therapy. *New Journal of Chemistry*. 2016;40(10):8522-34. DOI:10.1039/c6nj01194e

69. Wang Y, Wang W, Yu L, Tu L, Feng Y, Klein T, et al. An immunomagnetic separation based fluorescence immunoassay for rapid myoglobin quantification in human blood. *Analytical Methods*. 2016;8(40):7324-30. DOI:10.1039/c6ay01982f

70. Pinheiro PC, Daniel-da-Silva AL, Tavares DS, Calatayud MP, Goya GF, Trindade T. Fluorescent magnetic bioprobes by surface modification of magnetite nanoparticles. *Materials*. 2013;6(8):3213-25. DOI:10.3390/ma6083213

71. Shi D, Sadat ME, Dunn AW, Mast DB. Photo-fluorescent and magnetic properties of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*. 2015;7(18):8209-32. DOI:10.1039/c5nr01538c

72. Wiklund M, Hertz HM. Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays. *Lab on a Chip*. 2006;6(10):1279-92. DOI:10.1039/b609223b

73. Baudry J, Rouzeau C, Goubault C, Robic C, Cohen-Tannoudji L, Koenig A, et al. Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(44):16076-8. DOI:10.1073/pnas.0602761103

74. Reverté L, Prieto-Simón B, Campàs M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads

and microfluidics systems. A review. *Analytica chimica acta*. 2016;908:8-21. DOI:10.1016/j.aca.2015.12.035

75. Wang Y, Wang W, Yu L, Wang Y, Zhang Q, Xu H, et al. A colorimetric biosensor using Fe₃O₄ nanoparticles for highly sensitive and selective detection of tetracyclines. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;236:621-6. DOI:10.1016/j.snb.2016.06.029

76. Park JY, Jeong HY, Kim MI, Park TJ. Colorimetric detection system for *Salmonella typhimurium* based on peroxidase-like activity of magnetic nanoparticles with DNA aptamers. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015. DOI:10.1155/2015/527462

77. Lu N, Zhang M, Ding L, Zheng J, Zeng C, Wen Y, et al. Yolk-shell nanostructured Fe₃O₄@C magnetic nanoparticles with enhanced peroxidase-like activity for label-free colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *Nanoscale*. 2017;9(13):4508-15. DOI:10.1039/c7nr00865h

78. Liu X, Song D, Zhang Q, Tian Y, Zhang H. An optical surface plasmon resonance biosensor for determination of tetanus toxin. *Talanta*. 2004;62(4):773-9. DOI:10.1016/j.talanta.2003.09.028

79. Golberg A, Yarmush ML, Konry T. Picoliter droplet microfluidic immunosorbent platform for point-of-care diagnostics of tetanus. *Microchimica Acta*. 2013;180(9):855-60. DOI:10.1007/s00604-