Iranian Journal Of Biological Science. 2024; 19(4):1-12

Original Article
Iranian Journal of Biological Sciences
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Synergistic Effects of *Eryngium Planum* Leaf Extract-Functionalized Silver Oxide Nanoparticles and Meropenem on Downregulation of Efflux Pump related Genes and Upregulation of Porin Gene in Clinical Isolates of *E. coli*

Zahra Rahimipour[1], Ali Pabousi Sadatmahale[1], Mohammad Nikpassand[2]
Mahdi Shahriarinour[3] ,Najmeh Ranji [4*]

[1]MSc, Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2]professor, Department of Chemistry, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran
[3]Assistant professor, Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran
[4]Associate professor, Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

Article Info

Article History:

Recived 2025.08.04
Revised 2025.08.16
Accepted 2025.08.18

KeyWords:

Silver oxide nanoparticles
Eryngium planum
Escherichia coli
Efflux pump
Porin

*Corresponding author:
E-mail address:

na.ranji@iau.ac.ir

Abstract

Introduction: *Eryngium planum* is a medicinal plant known for its antibacterial, anticancer, and anti-inflammatory properties. This study aimed to evaluate the antibacterial effects of silver oxide nanoparticles functionalized with *Eryngium planum* leaf extract against hospital-acquired and standard isolates of *Escherichia coli.*

Materials and Methods: In this study, clinical isolates of E. coli were collected from 17 Shahrivar Children's Hospital in Rasht city (Iran). After the identification of isolates, their antibiotic susceptibility profiles were determined. Silver oxide nanoparticles were functionalized with *Eryngium planum* leaf extract and physiochemically evaluated using FT-IR and FE-SEM. The antibacterial activity of the nanoparticles in combination with meropenem was assessed using the checkerboard method and Q-RT-PCR.

Results: Physicochemical analyses confirmed the successful synthesis of *Eryngium planum* leaf extract-functionalized silver oxide nanoparticles with particle sizes ranging from 75 to 95 nm. A synergistic antibacterial effect between the functionalized nanoparticles and meropenem was observed in several clinical and standard isolate. Furthermore, the treatments significantly ($P<0.05$ *or* $P<0.01$) led to a downregulation of efflux pump genes *acrA* and *acrB* and an upregulation of the porin gene *ompC* in treated bacterial cells *Eryngium planum* leaf extract-functionalized silver oxide nanoparticles and meropenem.

Conclusion:The findings suggest that *E. planum*-functionalized silver oxide nanoparticles led to enhancing the antibacterial efficacy of meropenem against resistant isolates. It seems that *E. planum* with downregulation of efflux pump genes, upregulation of the porin and increasing intracellular accumulation of meropenem, leading to reduced bacterial growth.

Cite this article:Z Rahimipour, A Pabousi-Sadatmahale, M Nikpassand, M Shahriarinour, N Ranji, Synergistic Effects of Eryngium Planum Leaf Extract-Functionalized Silver Oxide Nanoparticles and Meropenem on Downregulation of Efflux Pump related Genes and Upregulation of Porin Gene in Clinical Isolates of *E. coli*. Iranian Journal of Biological Sciences. 2024; 19 (4): 1-12

doi .....

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/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iaubaramin.ac.ir

اثر هم افزایی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم در کاهش بیان ژن های مؤثر در پمپ افلاکس و افزایش بیان پورین در جدایه های بالینی *E. coli*

زهرا رحیمی پور[۱]، علی پابوسی سادات محله[۱]، محمد نیک پسند[۲]، مهدی شهریاری نور[۳]، نجمه رنجی[۴*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[۲] استاد، گروه شیمی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[۴] دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۴/۰۵/۱۳
بازنگری ۱۴۰۴/۰۵/۲۵
پذیرش ۱۴۰۴/۰۵/۲۷

کلمات کلیدی
نانوذرات اکسید نقره
چوچاق
شریشاکلی
پمپ افلاکس
پورین

*** مسئول مکاتبات:**
na.ranji@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: چوچاق یک گیاه دارویی است که با خواص ضد باکتریایی، ضد سرطانی و ضد التهابی شناخته شده است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق بر علیه جدایه های بیمارستانی و استاندارد اشریشیا کلی بود

مواد و روش: در این مطالعه جدایه های بالینی اشریشیا کلی از بیمارستان کودکان ۱۷ شهریور در شهر رشت (ایران)، جمع آوری شد. بعد از تعیین هویت جدایه ها، پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی آنها تعیین شد. نانوذرات اکسید نقره با عصاره برگ چوچاق، عامل دار شد و با استفاده از FT-IR و FE-SEM، مورد ارزیابی فیزیکوشیمیایی قرار گرفت. اثرات ضد باکتریایی این نانوذرات در ترکیب با مروپنم به روش چکر بورد و Q-RT-PCR بررسی شد

یافته ها: آنالیزهای فیزیکوشیمیایی سنتز موفق نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق را با اندازه ذرات ۷۵ تا ۹۵ نانومتر تأیید کرد. اثر هم افزایی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق و مروپنم در چندین جدایه بالینی و سویه استاندارد مشاهده شد. همچنین تیمارها بطور معنی داری ($P<0.05$ یا $P<0.001$) باعث کاهش بیان ژن‌های پمپ افلاکس acrA و acrB و افزایش بیان پورین ompC در باکتریهای تحت تیمار با نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق و مروپنم شد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه پیشنهاد می کند که نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق، باعث افزایش اثربخشی مروپنم در جدایه های مقاوم شد. بدین ترتیب به نظر می رسد که چوچاق، با کاهش بیان ژن های پمپ افلاکس، افزایش بیان پورین و محبوس کردن مقدار بیشتری مروپنم در این جدایه ها، باعث کاهش رشد آنها شد.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : ز رحیمی پور، ع پابوسی سادات محله، م نیک پسند، م شهریاری نور، ن رنجی. اثر هم افزایی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم در کاهش بیان ژن های مؤثر در پمپ افلاکس و افزایش بیان پورین در جدایه های بالینی *E. coli*. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۳؛۱۹ (۴):۱-۱۲
doi .....

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ شاپا الکترونیکی: ۴۵۹ - X ۲۷۱۷
نویسندگان: حق مؤلف©

مقدمه

اشریشیا کلی (*E. coli*) به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی، یکی از علل اصلی بیماری های عفونی در سیستم گوارشی، ادراری، جریان خون و سیستم اعصاب مرکزی است (۱). استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها در درمان، منجر به انتشار باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها در بین عفونتها شده است (۲). در گزارشات مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی منتشر شده توسط سازمان سلامت جهانی (WHO)، اشریشیا کلی به عنوان یکی از بزرگترین نگرانی‌های مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی جامعه معرفی شده است (۳)

از جمله عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت دارویی در اشریشیا کلی، می توان به ۱) افزایش فعالیت آنزیمهای مؤثر در مهار آنتی بیوتیک ها، ۲) ایجاد جهش در اهداف پروتئینی آنتی بیوتیکها، ۳) بیان بیش از حد پمپ های افلاکس در سطح سلول و ٤) کاهش حضور پورین ها در سطح سلول، جهت محدود کردن ورود دارو اشاره کرد (٤). افزایش تعداد پمپ‌های افلاکس در سطح سلول باکتریایی، یکی از مکانیسم‌های مؤثر در ایجاد مقاومت دارویی محسوب می شود که مانع فعال آنتی بیوتیک ها در سلول می شود. AcrAB-TolC به عنوان پمپ افلاکس اصلی در اشریشیا کلی شناخته شده است(٥). کمپلکس AcrAB-TolC شامل AcrA یک پروتئین همجوشی، AcrB یک پروتئین ناقل غشای سیتوپلاسمی و TolC یک کانال غشایی خارجی است. بیان بیش از حد این پمپ افلاکس اغلب با مقاومت های دارویی چندگانه در اشریشیا کلی مشاهده می شود (٦)

مکانیسم دیگر در ایجاد مقاومت دارویی، کاهش حضور پورین ها در سطح سلول است. پورین های غشای خارجی (OMP) از پروتئین های تشکیل دهنده منافذ سطح سلولی تشکیل شده اند که انتقال غیرفعال ترکیبات آبدوست را تسهیل می کنند. در این میان، دو پورین OmpC و OmpF در حمل و نقل آنتی بیوتیک ها به درون سلول مؤثر هستند (۷). جهش در ژن های ompC (۸) و ompF (۹) در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در برخی از پاتوژن های گرم منفی همچون اشریشیا کلی نقش مهمی دارد (۱۰)

برای مبارزه با معضل جهان شمول مقاومت آنتی بیوتیکی در عفونت های بیمارستانی، ارائه راهکارهای درمانی نوین، ضروری است (۱۱). گیاه چوچاق با نام علمی*Eryngium planum*از خانواده چتریان دارای ترکیباتی همچون ساپونین های تری ترپنوئید، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولی و کومارین ها است. همچنین این گیاه دارای فعالیت‌های ضد دیابتی، ضد باکتریایی، ضد سرفه، ادرارآور و ضد التهابی است (۱۲)

با توجه به نامحلول بودن ترکیبات فعال در گیاهان دارویی در آب (۱۳-۱۵) لازم است برای افزایش اثربخشی آنها از روشهای بر پایه نانوذرات بهره برد. از نانوذرات مختلفی از جمله نانوذرات بر پایه فلزاتی چون آهن و نقره، دندریمرها، نانوذرات پلیمری و نانو امولسیون ها جهت افزایش کارآیی خواص ترکیبات گیاهی درمانی در تحقیقات استفاده می شود (١٤).در این مطالعه برای اولین بار تأثیر نانوذرات نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق بر بیان ژن های acrB، acrA و ompC در جدایه های بالینی اشریشیا کلی مقاوم به مروپنم بررسی شد

مواد و روش ها

سنتز نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق

برای سنتز نانوذرات عامل دار شده با پودر خشک برگ گیاه چوچاق، حدوده ٥ گرم پودر خشک چوچاق، در ٤٠٠ میلی لیتر اتانول حل شد، به مدت ١٥ دقیقه تحت تابش امواج فراصوت قرار گرفت. سپس، حدود ٠/٥ گرم نانوذرات اکسید نقره (مرک، آلمان) در ٢٥ میلی لیتر کلروفرم پراکنده شده، کم کم به محلول عصاره گیاه اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ٢٠ دقیقه تحت تابش امواج فراصوت قرار گرفت. آنگاه، pH مخلوط واکنش به کمک(١ / M) NaOH به pH خنثی رسانده شد و به مدت ١٨-١٢ ساعت در دمای اتاق همزده شد. در نهایت، نانوذره نهایی با ٥٠- ٣٠ میلی لیتر آب دیونیزه شسته شد و در دمای ٦٠-٥٠ درجه سانتیگراد خشک شد (١٦)

آزمون FTIR

طیف سنجی زیر قرمز (Fourier-transform infrared spectroscopy) نانوذرات اکسید نقره، عصاره برگ چوچاق و نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق با دستگاه طیف سنج FTIR Shimadzu-S۸۴۰۰ (Shimadzu Europe) مورد بررسی قرار گرفت (۱۷)

میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM)

مورفولوژی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با برگ گیاه چوچاق با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی TESCAN (FE-SEM MIRA۳) مجهز به آنالیز پرتو ایکس پراکنده انرژی(EDX)) مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، FE-SEM برای بررسی اندازه ذرات مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور نمونه بصورت یک قطره ۱mg/ml از نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با برگ گیاه چوچاق در سطح اسلاید کربنی با یک لایه طلا به ضخامت ۱۰۰ Å پوشانده شد و تصاویر با ولتاژ فزاینده ۲۶ کیلو وات بدست آمد (۱۴)

جدا سازی و شناسایی باکتریها

در بازه زمانی بهمن تا اسفند سال ۱۴۰۳ حدود ۴۰ جدایه از بیمارستان کودکان ۱۷ شهریور شهر رشت جمع آوری گردید. جهت تشخیص هویت، کشت بر روی محیط های مک کانکی آگار و EMB و تست های بیوشیمیایی نظیر SIM ، TSI ، اوره و MR/VP بر روی نمونه ها انجام شد (۱۸).

تعیین پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه های تهیه شده از بیمارستان کودکان، به کمک آزمون آنتی بیوگرام و طبق استاندارد CLSI ۲۰۲۳، با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی مروپنم (۱۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg) و سفتازیدیم (۳۰µg) (شرکت پادتن طب، کرج) انجام شد. قطر هاله عدم رشد هر دیسک پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت نگهداری نمونه ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد (MIC) مروپنم و نانوذرات عامل دار شده با چو چا ق

جهت تعیین MIC از روش براث میکرودایلوشن استفاده شد. به این منظور سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت نیم مک فارلند از هر جدایه (معادل 1×10^6 CFU/mL) به رقت های متوالی مروپنم (در محدوده غلظت ۱µg/ml-۱۰۲۴) در میکروپلیت استریل قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد (۱۹). سپس اولین چاهک شفاف با کمترین غلظت دارو به عنوان MIC در نظر گرفته شد. سپس به همین روش با غلظت های ۱µg/ml-۱۰۲۴ نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با برگ گیاه چوچاق، تعیین MIC صورت گرفت

بررسی اثر هم افزایی بین نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و آنتی بیوتیک مروپنم

جهت بررسی اثر هم افزایی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و آنتی بیوتیک از روش چکر بورد بهره برده شد. به این منظور رقت های مختلف نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم به صورت ترکیبی در چاهک های مختلف میکروپلیت ۹۶ خانه به همراه سوسوپانسیون باکتریایی (5×10^5 CFU/mL) کشت داده شد (۲۰) و تمامی تیمارها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد.

بررسی بیان ژنها به روش q-RT-PCR

جهت بررسی بیان ژنهای *acrB*، *acrA* و *ompC* به روش کمی (Real-Time PCR (q-RT-PCR، ابتدا از ۱) سوسپانسیون باکتریایی با غلظت sub-MIC ترکیبی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم (گروه تست) و ۲) سوسپانسیون باکتریایی با غلظت sub-MIC مروپنم (گروه شاهد) به کمک کیت RNX-PLUS (سیناکلون، تهران)، استخراج RNA ی تام سلولی صورت گرفت. لذا جهت اطمینان از عدم وجود ناخالصی هایی از جمله DNA و پروتئینها، میزان جذب RNA ی تخلیص شده در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به کمک نانودراپ ۱۰۰۰ (ترمو فیشر، امریکا) خوانده شد. سپس سنتزcDNA به کمک کیت cDNA synthesis kit)یکتا تجهیزآزما، تهران) انجام شد. در ادامه، واکنش q-RT-PCR به کمک کیت ۲x SYBER Green qPCR Mix (یکتا تجهیز آزما، تهران) شامل پرایمرهای رفت (۱ میکرولیتر) و

در دستگاه Real Time PCR مدل ABI StepOne (امریکا)، با برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه ۵ ثانیه، ۶۰ درجه ۱۰ ثانیه، و ۷۲ درجه ۱۰ ثانیه، و برنامه دمایی آنالیز منحنی ذوب شامل۶۰ درجه ۵ ثانیه و ۹۵ درجه ۱۰ ثانیه انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش ساخته شده توسط شرکت زیست فناوری پیشگام (تهران) در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای (۲۱) مورد استفاده در مطالعه حاضر

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول (bp)
***acrA*-F**	5'-CTCTCAGGCAGCTTAGCCCT-3'	۱۰۷
***acrA* -R**	5'-TGCAGAGGTTCAGTTTTGACTG-3'	
***acrB*-F**	5'-GGTCGATTCCGTTCTCCGTTA-3'	۱۰۵
***acrB*-R**	5'-CTACCTGGAAGTAAACGTCATTGGT-3'	
***ompC*-F**	5'-ATTCTGGCAGTACGTCGGTC-3'	۱۲۵
***ompC*-R**	5'-AAACAACTCCTGGACCCGTG-3'	
***rpsL*-F**	5'-GCAAAAACGTGGCGTATGTACTC-3'	۱۰۲
***rpsL*-R**	5'-TCGAAACCGTTAGTCAGACGAA-3'	

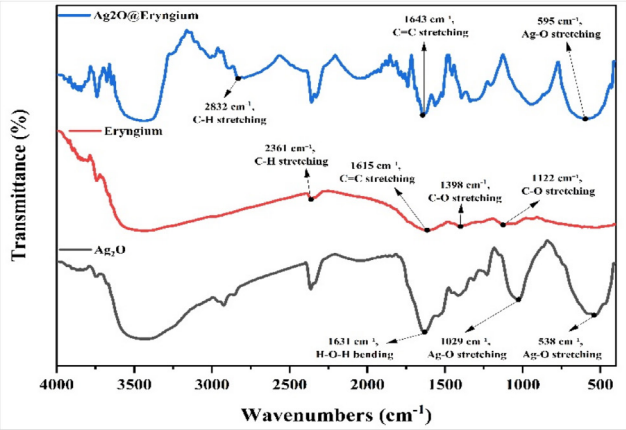
تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی بیان ژن ها از آزمون تست بهره برده شد. هر تست حداقل دوبار تکرار شد. نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار ذکر شد. سطح معناداري $P<۰,۰۵$ در نظر گرفته شد

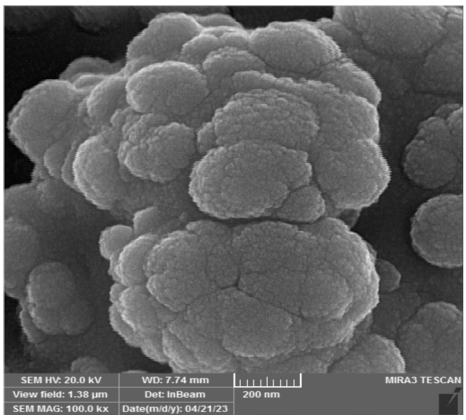
یافته ها

آنالیز فیزیکوشیمی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق

طیف FT-IR ی اکسید نقره (Ag_2O)، عصاره برگ چوچاق و نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق با استفاده از طیف‌سنج Shimadzu (Shimadzu Europe-FTIR ۸۴۰۰S) برای شناسایی گروه های عاملی متصل به نانوذرات سنتز شده انجام شد طیف بین ۴۰۰ و ۴۰۰۰ سانتی متر به دست آمد طول موج در محدوده ۱-cm ۳۳۰۰-۳۶۰۰ مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H گروه های فنلی ترکیبات موجود در عصاره برگ چوچاق و نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق است. یک نوار در ۱۶۱۵ سانتی متر قابل مشاهده است که به ارتعاشات کششی C=C گروه آروماتیک و وینیل اختصاص دارد. همچنین، یک نوار با مرکزیت حدود ۵۵۰ سانتی متر با ارتعاشات Ag-O-Ag در هسته نانو-Ag_2O همراه است، که وجود Ag_2O در نانوذرات Ag_2O@*Eryngium planum* را تایید کرد (شکل ۱) ابعاد نانوذرات در محدوده ۷۵ تا ۹۵ نانومتر مطابق با تصویر FE-SEM در شکل ۲ تعیین شد. نمایش فوق، یکنواختی اجزای ذره و آرایش متقارن نانوذرات را نشان می دهد



شکل ۱. نتایج اندازه گیری FT-IR مربوط به اکسید نقره (Ag_2O) (طیف مشکی)، عصاره برگ چوچاق (Eryngium، طیف قرمز) و نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق (طیف آبی)



شکل ۲. تصویر FE-SEM مربوط به نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق

تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک

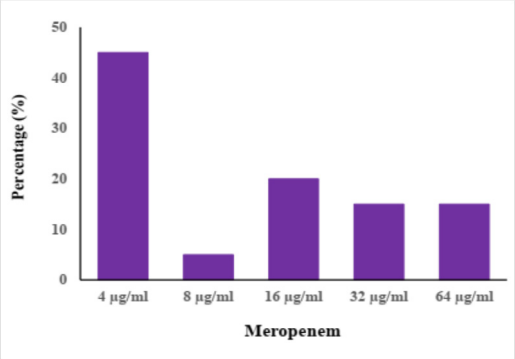
در این مطالعه، تعداد ٤٠ نمونه در دو ماهه بهمن-اسفند ١٤٠٣ از عفونت های ادراری کودکان در بیمارستان ١٧ شهریور شهر رشت جمع آوری گردید. در این مطالعه مشخص شد در ۲۰ جدایه اشریشیا کلی، به روش انتشار از دیسک طبق جدول CLSI ۲۰۲۳، مقاومت به سفتازیدیم ۳۵٪، مروپنم ۰٪ و سیپروفلوکساسین حدود ۲۰٪ گزارش شد و بیشترین حساسیت به مروپنم مشاهده شد (جدول ۲)

جدول ۲ .الگوي حساسيت جدايه هاي اشريشيا كولي از نمونه هاي عفونت ادراري به روش انتشار از ديسک

آنتی بیوتیک	سفتازیدیم	مروپنم	سیپروفلوکساسین
حساس(susceptible)	٪۵۵	٪۱۰۰	٪۴۵
نیمه حساس(Intermediate)	٪۱۰	٪۰	٪۳۵
مقاوم(resistance)	٪۳۵	٪۰	٪۲۰

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)

در ایـــن مطالعـــه بـــه روش بـــراث میکرودایلوشـــن، تعیین حداقـــل غلظـــت مهارکنندگی رشـــد (MIC) تحـــت تیمار با مروپنـــم در ۲۰ جدایـــه *E.Coli* مورد بررســـی قـــرار گرفت. نتایـــج طبق نمـــودار نشـــان داد، در این آزمـــون همه جدایه هـــا مقاوم بـــه مروپنم گزارش شـــد. بیشتریـــن درصد جدایه هـــا، دارای MIC ٤ µg/mL= بودنـــد (نمودار۱). در حالیکه MIC ی نانوذرات اکســـید نقـــره عامل دار شـــده با عصاره برگ چوچـــاق در همه جدایه ها، بیـــشتر از ۱۰۲٤ µg/mL بو د .



نمودار۱ . توزیع میزان MIC (بصورت درصد) در ۲۰ جدایه *E. Coli* مقاوم به مروپنم

اثـــر هم افزایی نانوذرات اکســـید نقـــره عامل دار شـــده با عصاره برگ چوچـــاق و مروپنم

جهـــت بررســـی اثـــر هم افزایـــی بیـــن نانوذرات اکســـید نقره عامـــل دار شـــده با عصاره بـــرگ چوچـــاق و مروپنم در ســـه جدایه بالینـــی ســـودوموناس آئروژینوزا و ســـویه اســـتاندارد ATCC۸۷۳۹ از آزمـــون رقیق ســـازی چکر بورد بهره برده شـــد. مطابق فرمـــول ذیل (١٤)، میـــزان ایندکس FIC محاســـبه و مشـــخص شـــد که در ســـویه اســـتاندارد ATCC۸۷۳۹ و جدایـــه بیمارســـتانی شماره ٤ اثر هم افزایی و در جدایـــه های بیمارســـتانی شماره ۱ و۲، اثـــر هم افزایی جزئی مشـــاهده شـــد (جدول ۳ و شـــکل ۳)

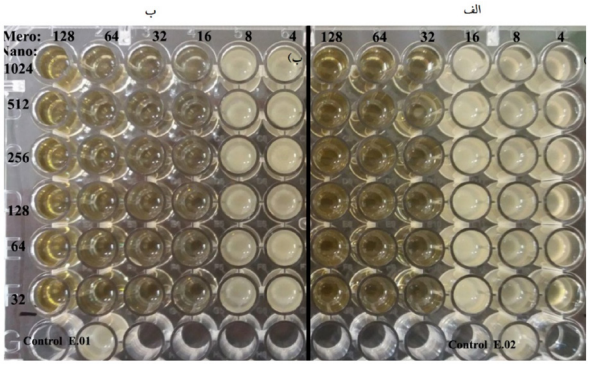
$$FICI = \frac{MIC_{(drug\ A\ mixture)}}{MIC_{(drug\ A\ used\ alone)}} + \frac{MIC_{(drug\ B\ mixture)}}{MIC_{(drug\ B\ used\ alone)}}$$

جدول ۳. اثر هم افزایی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم

	MIC (µg/mL) به تنهایی		MIC (µg/mL) ترکیبی		
شماره باکتری	مروپنم	نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق	مروپنم	نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق	FICI
ATCC 8739	۱۶	>۱۰۲۴	۴	۳۲	# >۰/۲۸۱
E.1	۶۴	>۱۰۲۴	۳۲	۳۲	>۰/۵۳۱
E.2	۳۲	>۱۰۲۴	۱۶	۳۲	>۰/۵۳۱
E.4	۶۴	>۱۰۲۴	۱۶	۳۲	>۰/۲۸۱

اثر هم افزایی ۰/۵ >FICI* ، اثر هم افزایی جزئی ۰/۷۵ >FICI** ، اثر افزایشی ۰/۷۶ ≤FICI< ۱ ***

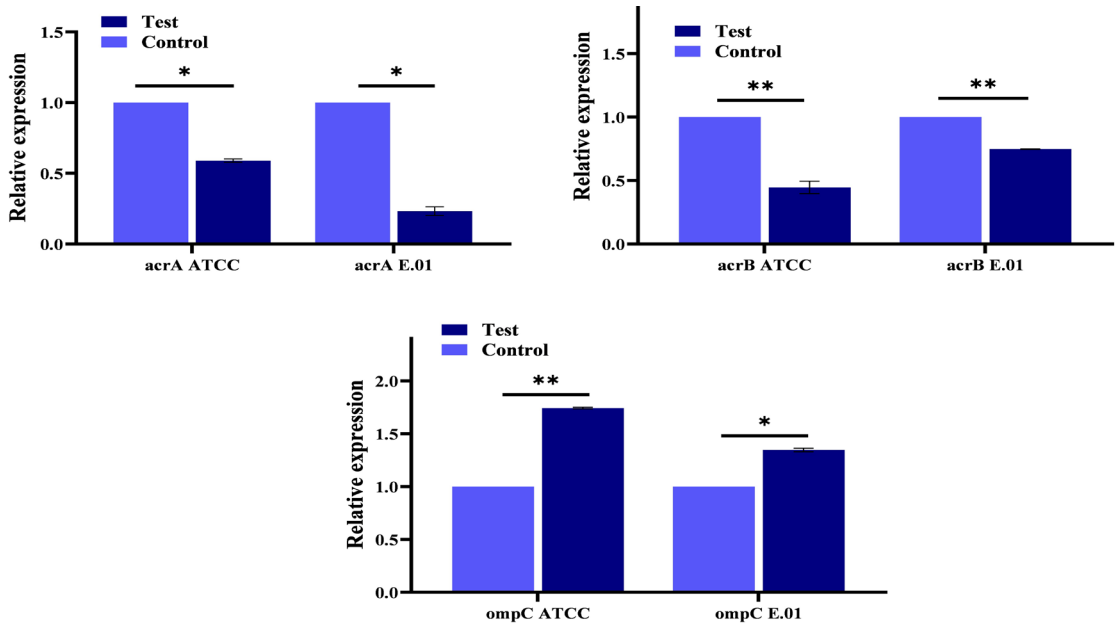
با توجه به اینکه MIC نانوذرات عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق، بیشتر از ۱۰۲۴ µg/mL تعیین شد، لذا میزان FICI نیز به تبع بصورت > ذکر شد.



شکل ۳. بررسی میزان MIC ترکیبی با غلظت های مختلف مروپنم (µg/mL ٤ تا µg/mL ۱۲۸)و نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق (µg/mL ۳۲ تا µg/mL ۱۰۲٤)در جدایه های بالینی الف) شماره دو و ب) شماره یک بعد از ۲٤ ساعت.

تغییر بیان ژن های پمپ افلاکس و پورین به روش q-RT-PCR

جهت بررسی بیان ژن های پمپ افلاکس *acrA* و *acrB* و پورین *ompC* از روش real time-PCR کمی استفاده شد. کاهش معنی دار بیان ژن های پمپ افلاکس *acrA* (*P < ۰,۰۵) و*acrB* (**P<۰,۰۱) در جدایه بالینی شماره ۱ و سویه استاندارد (ATCC ۸۷۳۹) تحت تیمار با نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق و مروپنم (۱/۲MIC) در مقایسه با جدایه های تحت تیمار با مروپنم (۱/۲MIC) مشاهده شد (نمودار ۲). همچنین افزایش معنی دار بیان ژن *ompC* به عنوان یک پورین در جدایه بالینی شماره ۱ (*P < ۰,۰۵) و سویه استاندارد (**P<۰,۰۱) تحت تیمار با ترکیب دو دارو در مقایسه با گروه کنترل (گروه تحت تیمار با مروپنم به تنهایی) مشاهده شد (نمودار۲)



نمودار۲. بیان ژن های *acrA*، *acrB* و *ompC* در جدایه بالینی شماره ۱ و سویه استاندارد (ATCC ۸۷۳۹) تحت تیمار با نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق و مروپنم (۱ / ۲MIC) در مقایسه با جدایه های تحت تیمار با مروپنم (۱ / ۲MIC) به تنهایی (کنترل). نتایج بصورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است. *P < ۰,۰۵ و **P <۰,۰۱ می باشد.

بحث

چوچاق بـا نـام علمـی *Eryngium planum* دارای خواص ضـد باکتریایی، ضـد التهابـی (۱۲) و ضد سرطانی اسـت. بـا این حـال بـه دلیـل حلالیـت کـم ترکیبـات اصلی چوچاق همچـون ترپن هـا، کومارین ها، اسـدهای فنولی و فلاونوئیدهـا در آب، لازم اسـت برای افزایش اثربخشـی درمانی آن از راهکارهای مناسـب رهایش دارویی اسـتفاده شـود. در ایـن مطالعه تلاش شـد نانـوذرات اکسـید نقره عامل دار شـده با عصاره برگ چوچاق، سـنتز شـده و سپس خـواص ضد باکتریایـی آن در چندین جدایه بالینی و سـویه اسـتاندارد اشریشـیا کلی مورد بررسـی قرار گیـرد. در این مطالعه، نانوذرات اکسـید نقـره عامل دار شـده با عصاره بـرگ چوچاق اثرات هـم افزایی با آنتـی بیوتیک مروپنم در جدایه هـای مقاوم بـه مروپنم نشـان دادند

در مطالعـه یکتادوسـت و همکاران در بیمارسـتان رسـول اکرم ورامیـن در بین ۵۰ نمونـه ادراری از زنـان و مردان با میانگین سـنی ۱۸/۱۵±۴۳/۳، بیشتریـن مقاومت دارویی به کوآموکسـی کلاو و کوتریماکسـازول در جدایـه های بالینی اشریشـیا کلی گزارش شـد. در این جدایه ها هـا، مقاومت به ایمی پنم، ۱۰٪ و به سیپروفلوکساسـین و سفتریاکسـون، ۲٤٪ مشـاهده شـد (۲۲). در مطالعه فتاحی و همکاران در بین نمونـه های عفونـت ادراری در همه گروه های سـنی در گلسـتان اهواز، مقاومت به مروپنم ۱۱٪، به سـفتازیدیم ۷۵/۰۵٪ و بـه سیپروفلوکساسـین ٦٦/٤٪ در جدایـه های بالینی اشریشـیا کلی گـزارش شـد (۲۳). در مطالعه حاضر در ۲۰ جدایـه به روش دیسـک آنتی‌بیوگـرام، مقاومت به سـفتازیدیم ۳۵٪، مروپنم ۰٪ و سیپروفلوکساسین حدود ۲۰٪ گزارش شـد. در حالـی که بـه روش براث میکرودایلوشـن همه جدایه هـا مقاوم به مروپنم تشـخیص داده شـد. در تأیید این مـورد، در مطالعه رجب پور و همکاران مشـخص شـد که از ۳۱ نمونه سـودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار از دیسـک، ۵۸٪ جدایه ها و به روش تعییـن MIC، ۹۰/۲۳ ٪ جدایه هـا مقاوم به سپروفلوکساسـین بودنـد. همچنین مقاومـت به ایمـی پنم به روش انتشـار از دیسـک حدود ۹/٦ ٪ و بـه روش تعییـن MIC، ۳۰/۷ ٪ جدایـه ها گزارش شـد (۲٤). همچنیـن کرمی و همـکاران نشـان دادند که روش انتشـار از دیسـک دارای حساسـیت و اختصاصیـت کمتری نسـبت به MIC اسـت. لذا با توجه بـه اینکه روش اسـتاندارد طلایـی، تعیین MIC اسـت، نمی تـوان بر پایه انتشـار از دیسـک، تجویـز دارو را انجـام داد (۲۵). لذا با توجه به اینکـه روش دیسـک آنتی بیوگرام روش مناسـبی برای بررسـی فراوانـی مقاومت به آنتی بیوتیک ها نیسـت، لذا پیشـنهاد می شـود در مراکز تشـخیصی و درمانی برای اسـتفاده از آنتی بیوتیـک ها در عفونت هـا از روش براث میکرودایلوشن اسـتفاده شود

در مطالعـه صفائـی توچائـی و همکاران مشـخص شـد کـه نانوکامپوزیت هـای Fe_3O_4 عامل دار شـده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسـین اثر هـم افزایی در جدایه هـای بالینی و سـویه اسـتاندارد سـودوموناس آئروژینوزا داشـتند (۲٦). در مطالعـه لـی و همکاران اثر هـم افزایی نانـوذرات نقـره و اگزاسـیلین و یـا تتراسـایکلین بر علیه اشریشـیا کلی، سـودوموناس آئروژینوزا و اسـتافیلوکوکوس اورئـوس مشـاهده شـد (۲۷). در مطالعـه پـور اصغر و همکاران اثـر هم افزایی نانـوذرات مغناطیسـی عامل دار شـده با کورکومین بـا سیپروفلوکساسـین بر علیـه جدایه هـای بالینی اسـینتو بـاکتر بومانـی گزارش شـد (۱٤). در مطالعـه فکری کهن و همـکاران اثر هم افزایی سـیلیبینین انکپسـوله در نانـوذرات لیپوزومی با سیپروفلوکساسـین در جدایـه های بالینی اشریشـیا کلی نشـان داده شـد (۲۱). در مطالعـه حـاضر نیز اثر هـم افزایی کامـل و جزئی بین نانـوذرات اکسـید نقـره عامل دار شـده با عصـاره برگ چوچاق و مروپنم در جدایه های بالینی و سـویه اسـتاندارد اشریشـیا کلـی مقاوم بـه مروپنم مشـاهده شـد، که این امر مـی تواند ایـن عصاره گیاهـی را یک مکمـل دارویی مناسـب در جدایه های مقاوم به مروپنـم، همراه با مصرف ایـن دارو معرفی کند. بطـوری که انتظار مـی رود مصرف همزمـان این ترکیـب گیاهی بـا مروپنـم، در جدایه های مقـاوم به مروپنـم باعث افزایـش اثربخشـی مروپنم و به عبارتـی کاهـش مقاومـت دارویی بـه این آنتـی بیوتیک شو د .

در مطالعه وانگ و همکاران مشـخص شـد کـه مهار بیان ژن هـای پمـپ خروجی بـه واسـطه سـیلیبین (از گیاه خارمریم) باعث بازگشـت حساسـیت به آنتـی بیوتیک ها در اسـتافیلوکوکوس اورئوس می شـود (۲۸). مطالعات نشان داده کـه ترکیبـات گیاهی همچـون کورکومین، سـیلیبین، لوتئولیـن و بربریـن با مهار بیـان ژن های پمـپ افلاکس همچـون *norA* و *qacA/B* نقـش مهارکنندگـی پمپ های

افلاکس را در جدایه های مقاوم به دارو ایفا کردند (۲۸, ۲۹). در مطالعه پور اصغر و همکاران مشخص شد که نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با کورکومین در ترکیب با سیپروفلوکساسین، باعث کاهش رشد و کاهش بیان ژن های پمپ افلاکس *adeA* و *adeB* در جدایه های بالینی اسینتوباکتر بومانی مقاوم به سیپروفلوکساسین شدند(۱٤). در مطالعه صفائی توچائی و همکاران کاهش بیان ژن های پمپ افلاکس *mexX*، *mexB*، *mexA* و *oprM* در جدایه های بالینی و استاندارد سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین، تحت تیمار با نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین شد (۲٦). صالح زاده و همکاران نشان دادند که آویشن به عنوان یک مهار کننده پمپ های افلاکس، باعث کاهش بیان ژن پمپ افلاکس *norA* در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس می شود (۳۰). الزین و همکاران نشان دادند که مقاومت به آنتی بیوتیک ها در جدایه های مقاوم اشریشیا کلی، با کاهش بیان پورین های *ompC* و *ompF* همراه است (۳۱). حذف، جهش یا کاهش بیان پورین هایی از جمله *ompC* و *ompF*در جدایه های مقاوم به دارو مشاهده می شود (۳۲). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق توانایی مهارکنندگی پمپ های افلاکس را از جمله در سطح رونویسی با کاهش بیان ژن های *acrA* و *acrB* داشته و از سوی دیگر با افزایش پورین هایی همچون *ompC* باعث افزایش تجمع آنتی بیوتیک هایی همچون مروپنم در جدایه های مقاوم می شوند. از دلایل مقاومت دارویی در این جدایه ها، کاهش ورود آنتی بیوتیک و افزایش خروج آنها به محیط خارج سلولی است. به نظر می رسد که عصاره چوچاق حداقل با افزایش بیان پورین ها و کاهش بیان ژنهای مؤثر در پمپ افلاکس، باعث افزایش ورود آنتی بیوتیک و حبس آن در داخل سلول به ترتیب شده و این امر باعث افزایش اثربخشی آنتی بیوتیک در سلول های مقاوم و مهار رشد و در نهایت مرگ آنها می شود

نتیجه گیری

در این مطالعه تأثیر نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم، بر چند جدایه بیمارستانی و سویه استاندارد اشریشیا کلی بررسی شد. نتایج فیزیکوشیمیایی عامل دار شدن نانوذرات اکسید نقره با عصاره برگ چوچاق را تایید کرد اثر هم افزایی بین نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم، در جدایه های مقاوم به مروپنم مشاهده شد. همچنین مشخص شد که نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم، قادر به کاهش بیان ژنهای مؤثر در پمپ افلاکس و افزایش بیان پورین ها شد و به این ترتیب باعث افزایش مقدار مروپنم در سلول ها و افزایش اثربخشی آنها در اثر محبوس شدن مقادیر بالای آنتی بیوتیک در سلول ها شدند.

References

1. Alizade H, Teshnizi SH, Azad M, Shojae S, Gouklani H, Davoodian P, et al. An overview of diarrheagenic Escherichia coli in Iran: A systematic review and meta-analysis. J Res Med Sci. 2019;24(1):23. **doi:10.4103/jrms.JRMS_1010_18**

2. Reinthaler F, Posch J, Feierl G, Wüst G, Haas D, Ruckenbauer G, et al. Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. Water Res. 2003;37(8):1685–90. **doi:10.1016/S0043-1354(02)00569-9**

3. Alizade H. Escherichia coli in Iran: An overview of antibiotic resistance: A review article. Iran J Public Health. 2018;47(1):1–12. **doi:10.18502/ijph.v47i1.825**

4. Fernández Llamas L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. Clin Microbiol Rev. 2012;25(4):661–81. **doi:10.1128/CMR.00043-12**

5. Amaral L, Martins A, Spengler G, Molnar J. Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. Front Pharmacol. 2014;4:168. **doi:10.3389/fphar.2014.00168**

6. Jaramillo LMM. Structural and functional study of efflux pumps involved in drug resistance [PhD Thesis]. Université Claude Bernard-Lyon I; 2014.

7. Choi U, Lee CR. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in Escherichia coli. Front Microbiol. 2019;10:953. **doi:10.3389/fmicb.2019.00953**

8. Lee Y-S, Jang K-A, Cha J-D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. Biomed Res Int. 2012;2012:618081. **doi:10.1155/2012/618081**

9. Alzayn M, Dulyayangkul P, Satapoomin N, Heesom KJ, Avison MB. OmpF downregulation mediated by sigma E or OmpR activation confers cefalexin resistance in Escherichia coli in the absence of acquired β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(11):e01004-21. **doi:10.1128/AAC.01004-21**

10. Choi U, Lee C-R. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in Escherichia coli. Front Microbiol. 2019;10:953. **doi:10.3389/fmicb.2019.00953**

11. Wang Z, Fan G, Hryc CF, Blaza JN, Serysheva II, Schmid MF, et al. An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. eLife. 2017;6:e24905. **doi:10.7554/eLife.24905**

12. Kikowska M, Budzianowski J, Krawczyk A, Thiem B. Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in in vitro cultures of Eryngium planum L. Acta Physiol Plant. 2012;34(6):2425–33. **doi:10.1007/s11738-012-1041-8**

13. Wani SUD, Kakkar V, Gautam SP, Hv G, Ali M, Masoodi MH, et al. Enhancing therapeutic potential of poor aqueous soluble herbal drugs through solid dispersion-An overview. Phytomed Plus. 2021;1(4):100069. **doi:10.1016/j.phyplu.2021.100069**

14. Pourasgar S, Ranji N, Asadpour L, Shahriarinour M, Nikpassand M. Antibacterial and Anti-cancer Properties of Curcumin-Functionalized Silica-Coated Fe3O4 Magnetic Nanoparticles. Arab J Sci Eng. 2024. **doi:10.1007/s13369-024-08908-8**

15. 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. J Cell Physiol. 2019;234(12):22285–98. **doi:10.1002/jcp.28796**

16. Jafarian Z, Nikpassand M, Pourahmad A, Fekri LZ. Synthesis of fused azo-linked acridine derivatives using MCM-41/Ag2S-RHA nanocomposite. Curr Org Synth. 2021;18(7):719–25. **doi:10.2174/1570179418666210319105501**

17. Borji S, Shahriarinour 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/s41598-025-87682-2**

18. Goudarzi V, Mirzaee M, Ranjbar R. O-serogrouping of Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infection by using PCR method. Iran J Med Microbiol. 2017;10(6):1–8.

19. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. Pathogens. 2021;10(2):165. **doi:10.3390/pathogens10020165**

20. Zhou C, Wang Q, Jin L, Wang R, Yin Y, Sun S, et al. In vitro synergistic activity of antimicrobial combinations against blaKPC and blaNDM-producing Enterobacterales with blaIMP or mcr genes. Front Microbiol. 2020;11:533. **doi:10.3389/fmicb.2020.00533**

21. 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. Int Microbiol. 2025;28(1):63–74. **doi:10.1007/s10123-024-00535-3**

22. Yektadoust F, Kazemi A, Yalfani R. Comparison of antibiotic susceptibility testing of Escherichia coli and Klebsiella pneumonia isolated from urinary tract infections against five antibiotics by disc diffusion and microdilution methods. Jundishapur Sci Med J. 2017;16(5):525–34.

23. Fatahi L, Soleymani Zar M. Evaluation of urine isolated bacteria and their antimicrobial resistance in hospitalized patients in Ahvaz Golestan Hospital in 2019. Jundishapur Sci Med J. 2021;20(2):128–39.

24. Rajabpour M, Arabestani MR, Yousefi Mashof R, 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.

25. Karami A, Mazloom Zadeh S, Rastin A, Karami A, Shiri P. The consistency of antibiotic resistance results in two methods of disk diffusion and MIC in isolated organisms from patients with urinary tract infections. J Med Life. 2015;8(Spec Iss 4):282–6.

26. Touchaei AS, Ramaneh K, Nikpassand M, Ranji N, Shahriarinour M. Synergistic effect of Froriepia subpinnata-functionalized Fe3O4 nanocomposite and ciprofloxacin on the expression of efflux pump genes in ciprofloxacin resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Microb World. 2024;58(17):73–83.

27. Li H, Ahmad W, Rong Y, Chen Q, Zuo M, Ouyang Q, et al. Designing an aptamer based magnetic and upconversion nanoparticles conjugated fluorescence sensor for screening Escherichia coli in food. Food Control. 2020;107:106761. **doi:10.1016/j.foodcont.2019.106761**

28. Wang D, Xie K, Zou D, Meng M, Xie M. Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Mol Med Rep. 2018;18(1):827–33. **doi:10.3892/mmr.2018.9026**

29. Zhang S, Wang J, Ahn J. Advances in the discovery of efflux pump inhibitors as novel potentiators to control antimicrobial-resistant pathogens. Antibiotics. 2023;12(9):1417. **doi:10.3390/antibiotics12091417**

30. Ali S, Hashemi DSM, Bita S, Amir J. The effect of thyme (Thymus vulgaris) extract on the expression of norA efflux pump gene in clinical strains of Staphylococcus aureus. J Genet Resour. 2018;4(1):26–36.**doi:10.22080/jgr.2018.14118.1116**

31. Alzayn M, Dulyayangkul P, Satapoomin N, Heesom KJ, Avison MB. OmpF downregulation mediated by sigma E or OmpR activation confers cefalexin resistance in Escherichia coli in the absence ofacquired β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(11):e01004-21. **doi:10.1128/AAC.01004-21**

32. Zhou G, Wang Q, Wang Y, Wen X, Peng H, Peng R, et al. Outer membrane porins contribute to antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. Microorganisms. 2023;11(7):1690. **doi:10.3390/microorganisms11071690**