



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 Rahimipour¹, Ali Pabousi Sadatmahale¹, Mohammad Nikpassand²
Mahdi Shahriarinour³, Najmeh Ranji^{4*}

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

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

³Assistant professor, Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

⁴Associate professor, Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

Article Info

Abstract

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@iauv.ac.ir

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 <https://doi.org/10.71631/ZISTI.2024.1214024>

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/>



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

چکیده

اطلاعات مقاله

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

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۵/۱۳

بازنگری ۱۴۰۴/۰۵/۲۵

پذیرش ۱۴۰۴/۰۵/۲۷

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

کلمات کلیدی

نانوذرات اکسید نقره

چوچاق

شریشاکلی

پمپ افلاکس

پورین

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 ژن های پمپ افلاکس *acrB* و *acrA* و افزایش بیان پورین *ompC* در باکتریهای تحت تیمار با نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق و مروپنم شد.

* مسئول مکاتبات:

na.ranji@iaub.ac.ir

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 آدرس دهی 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. ۱۹:۱۴۰۳ ۱۲-۱: (۴)

doi: https://doi.org/10.71631/ZISTI.2024.1214024

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

شاپا چاپی: ۴۲۲۶-۱۷۳۵

شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷ - ۴۵۹ X

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 آنتی بیوتیکی منتشر شده توسط سازمان سلامت جهانی (WHO)، اشریشیا کلی به عنوان یکی از بزرگترین نگرانی های مرتبط با عفونت های 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 (۴) کاهش حضور پورین ها در سطح سلول، جهت محدود کردن ورود دارو اشاره کرد (۴). افزایش تعداد پمپ های افلاکس در سطح سلول باکتریایی، یکی از مکانیسم های 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 (۵). 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 (۶) 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 فعالیت های 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 کارایی خواص ترکیبات گیاهی درمانی در تحقیقات استفاده می شود (۱۴). 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 مروپم 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، حدود ۵ گرم پودر خشک چوچاق، در ۴۰۰ میلی لیتر اتانول حل شد، به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش امواج فراصوت قرار گرفت. سپس، حدود ۰/۵ گرم نانوذرات اکسید نقره (مرک، آلمان) در ۲۵ میلی لیتر کلروفرم پراکنده شده، کم کم به محلول عصاره

گیاه اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه تحت تابش امواج فراصوت قرار گرفت. آنگاه، pH مخلوط واکنش به کمک (۱ / M) NaOH به pH خنثی رسانده شد و به مدت ۱۸-۱۲ ساعت در دمای اتاق همزده شد. در نهایت، نانوذره نهایی با ۳۰-۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه شسته شد و در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتیگراد خشک شد (۱۶)

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 ۸۴۰۰S-Shimadzu FTIR (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 رویشی نشر میدانی (TESCAN (FE-SEM MIRA^۳) 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 ۱ mg/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 آنتی بیوتیکی جدایه های تهیه شده از بیمارستان کودکان، به کمک آزمون آنتی بیوگرام و طبق استاندارد CLSI ۲۰۲۳، با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی مروپنم (۱۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg) و سفتازیدیم (۳۰ μg) (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 چوچاق

جهت تعیین MIC از روش براث میکرودیالوژن 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 1×10^1 CFU/mL) به رقت های متوالی مروپنم (در محدوده غلظت ۱-۱۰۲۴ μg/ml) 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 ۱-۱۰۲۴ μg/ml 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 سوسپانسیون باکتریایی (5×10^6 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 *ompC* و *acrA*، *acrB* 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 (ترموفیشر، امریکا) خوانده شد. سپس سنتز cDNA 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 تجهیزآزما، تهران) شامل پرایمرهای رفت (۱ میکرولیتر)

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.

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 شامل ۶۰

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

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول (bp)
<i>acrA-F</i>	5'-CTCTCAGGCAGCTTAGCCCT-3'	۱۰۷
<i>acrA-R</i>	5'-TGCAGAGGTTTCAGTTTGACTG-3'	
<i>acrB-F</i>	5'-GGTCGATTCCGTCTCCGTTA-3'	۱۰۵
<i>acrB-R</i>	5'-CTACCTGGAAGTAAACGTCATTGGT-3'	
<i>ompC-F</i>	5'-ATTCTGGCAGTACGTCGGTC-3'	۱۲۵
<i>ompC-R</i>	5'-AAACAACCTCGGACCCGTG-3'	
<i>rpsL-F</i>	5'-GCAAAAACGTGGCGTATGTACTC-3'	۱۰۲
<i>rpsL-R</i>	5'-TCGAAACCGTTAGTCAGACGAA-3'	

تجزیه و تحلیل آماری

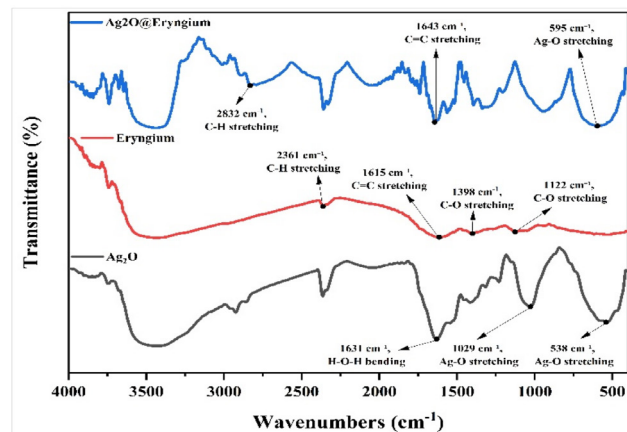
میانگین $\pm$ انحراف معیار ذکر شد. سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد

جهت بررسی بیان ژن ها از آزمون تست بهره برده شد. هر تست حداقل دوبار تکرار شد. نتایج به صورت

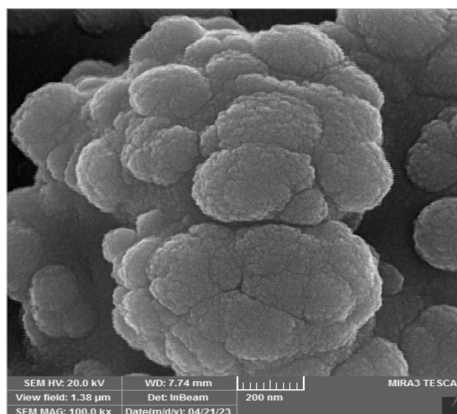
یافته ها

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 همراه است، که وجود Ag₂O در نانوذرآت *Ag₂O@Eryngium planum* را تایید کرد (شکل ۱) ابعاد نانوذرآت در محدوده ۷۵ تا ۹۵ نانومتر مطابق با تصویر FE-SEM در شکل ۲ تعیین شد. نمایش فوق، یکنواختی اجزای ذره و آرایش متقارن نانوذرآت را نشان می دهد

آنالیز فیزیکوشیمی نانوذرآت اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق
طیف FT-IR ی اکسید نقره (Ag₂O)، عصاره برگ چوچاق و نانوذرآت اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق با استفاده از طیف سنج Shimadzu (Shimadzu Europe-FTIR) (۸۴۰۰S) برای شناسایی گروه های عاملی متصل به نانوذرآت سنتز شده انجام شد طیف بین ۴۰۰ و ۴۰۰۰ سانتی متر به دست آمد طول موج در محدوده ۱-۳۳۰۰-۳۶۰۰ مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H گروه های فنلی ترکیبات موجود در عصاره برگ چوچاق و نانوذرآت اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق است. یک نوار در ۱۶۱۵ سانتی متر قابل مشاهده است که به ارتعاشات کششی



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 ۴۰ نمونه در دو ماهه بهمن-اسفند ۱۴۰۳ از عفونت های ادراری کودکان در بیمارستان ۱۷ شهریور شهر رشت جمع آوری گردید. در این مطالعه

مشخص شد در ۲۰ جدایه اشیریشیا کلی، به روش انتشار از دیسک طبق جدول CLSI ۲۰۲۳، مقاومت به سفنازیدیم ۳۵٪، مروپنم ۰٪ و سیپروفلوکساسین حدود ۲۰٪ گزارش شد و بیشترین حساسیت به مروپنم مشاهده شد (جدول ۲)

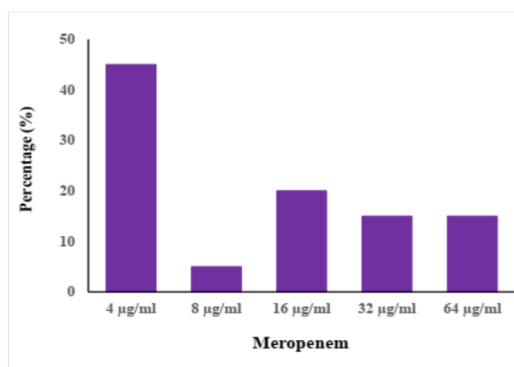
جدول ۲. الگوی حساسیت جدایه های اشیریشیا کولی از نمونه های عفونت ادراری به روش انتشار از دیسک

آنتی بیوتیک	سفنازیدیم	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 این مطالعه به روش برآث میکرودیالوژن، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) تحت تیمار با مروپنم در ۲۰ جدایه *E. Coli* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طبق نمودار نشان داد، در این آزمون همه جدایه

ها مقاوم به مروپنم گزارش شد. بیشترین درصد جدایه ها، دارای MIC ۴ µg/mL بودند (نمودار ۱). در حالیکه MIC ی نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق در همه جدایه ها، بیشتر از ۱۰۲۴ µg/mL بود.



نمودار ۱. توزیع میزان MIC (بصورت درصد) در ۲۰ جدایه *E. Coli* مقاوم به مروپنم

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

جهت بررسی اثر هم افزایی بین نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم در سه جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا و سویه استاندارد ATCC۸۷۳۹ از آزمون رقیق سازی چکر برد بهره برده شد. مطابق فرمول ذیل (۱۴)، میزان ایندکس

FIC محاسبه و مشخص شد که در سویه استاندارد ATCC۸۷۳۹ و جدایه بیمارستانی شماره ۴ اثر هم افزایی و در جدایه های بیمارستانی شماره ۱ و ۲، اثر هم افزایی جزئی مشاهده شد (جدول ۳ و شکل ۳)

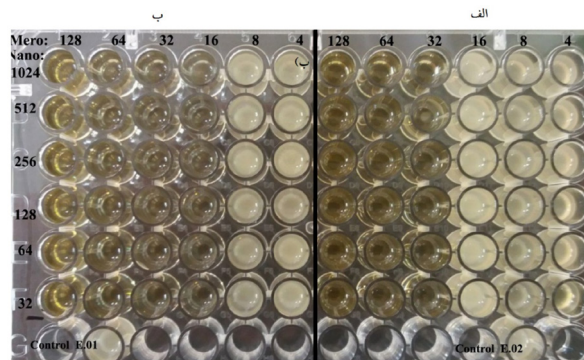
$$FICI = \frac{MIC_{(drug\ A\ mixture)}}{MIC_{(drug\ A\ used\ alone)}} + \frac{MIC_{(drug\ B\ mixture)}}{MIC_{(drug\ B\ used\ alone)}}$$

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

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

اثر هم افزایی $FICI < ۰/۵$ ، اثر هم افزایی جزئی $FICI < ۰/۷۵$ ، اثر افزایشی $FICI < ۰/۷۶$ ***

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.

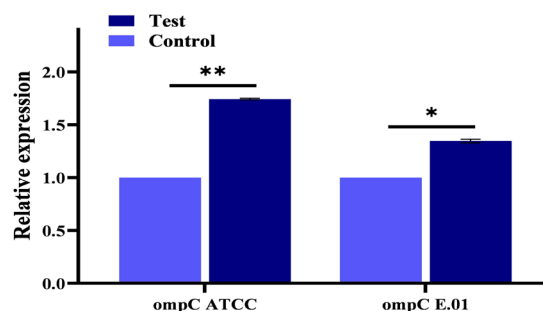
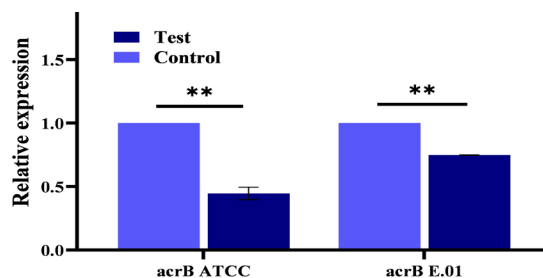
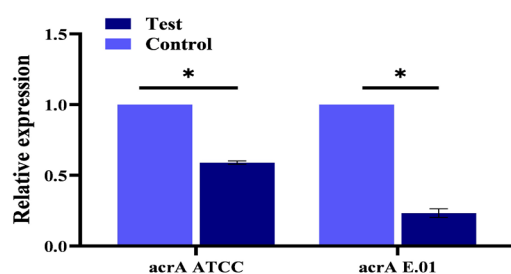


شکل ۳. بررسی میزان MIC ترکیبی با غلظت های مختلف مروپنم ($\mu\text{g/mL}$ تا $128 \mu\text{g/mL}$) و نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق ($32 \mu\text{g/mL}$ تا $1024 \mu\text{g/mL}$) در جدایه های بالینی (الف) شماره دو و (ب) شماره یک بعد از ۲۴ ساعت.

مروپنم ($1/2 \text{MIC}$) در مقایسه با جدایه های تحت تیمار با مروپنم ($1/2 \text{MIC}$) مشاهده شد (نمودار ۲). همچنین افزایش معنی دار بیان ژن *ompC* به عنوان یک پورین در جدایه بالینی شماره ۱ ($P < 0.05$) و سویه استاندارد ($P < 0.01$) تحت تیمار با ترکیب دو دارو در مقایسه با گروه کنترل (گروه تحت تیمار با مروپنم به تنهایی) مشاهده شد (نمودار ۲).

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* ($P < 0.05$) و *acrB* ($P < 0.01$) در جدایه بالینی شماره ۱ و سویه استاندارد (ATCC ۸۷۳۹) تحت تیمار با نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با چوچاق و



نمودار ۲. 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 ($1/2 \text{MIC}$) در مقایسه با جدایه های تحت تیمار با مروپنم ($1/2 \text{MIC}$) به تنهایی (کنترل). نتایج بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. $P < 0.05$ و $P < 0.01$ می باشد.

بحث

چوچاق با نام علمی *Eryngium planum* دارای خواص ضد باکتریایی، ضد التهابی (۱۲) و ضد سرطانی است. با این حال به دلیل حلالیت کم ترکیبات اصلی چوچاق همچون ترپن ها، کومارین ها، اسدهای فنولی و فلاونوئیدها در آب، لازم است برای افزایش اثربخشی درمانی آن از راهکارهای مناسب رهایش دارویی استفاده شود. در این مطالعه تلاش شد نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق، سنتز شده و سپس خواص ضد باکتریایی آن در چندین جدایه بالینی و سویه استاندارد اشريشیا کلی مورد بررسی قرار گیرد. در این مطالعه، نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق اثرات هم افزایی با آنتی بیوتیک مروپنم در جدایه های مقاوم به مروپنم نشان دادند

در مطالعه یکتادوست و همکاران در بیمارستان رسول اکرم ورامین در بین ۵۰ نمونه ادراری از زنان و مردان با میانگین سنی $43/3 \pm 18/15$ ، بیشترین مقاومت دارویی به کوآموکسی کلاو و کوتریماکسازول در جدایه های بالینی اشريشیا کلی گزارش شد. در این جدایه ها، مقاومت به ایمی پنم، ۱۰٪ و به سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون، ۲۴٪ مشاهده شد (۲۲). در مطالعه فتاحی و همکاران در بین نمونه های عفونت ادراری در همه گروه های سنی در گلستان اهواز، مقاومت به مروپنم ۱۱٪، به سفتازیدیم ۷۵/۰۵٪ و به سیپروفلوکساسین ۶۶/۴٪ در جدایه های بالینی اشريشیا کلی گزارش شد (۲۳). در مطالعه حاضر در ۲۰ جدایه به روش دیسک آنتی بیوگرام، مقاومت به سفتازیدیم ۳۵٪، مروپنم ۰٪ و سیپروفلوکساسین حدود ۲۰٪ گزارش شد. در حالی که به روش پراث میکروداپلوشن همه جدایه ها مقاوم به مروپنم تشخیص داده شد. در تأیید این مورد، در مطالعه رجب پور و همکاران مشخص شد که از ۳۱ نمونه سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار از دیسک، ۵۸٪ جدایه ها و به روش تعیین MIC، ۹۰/۲۳٪ جدایه ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. همچنین مقاومت به ایمی پنم به روش انتشار از دیسک حدود ۹/۶٪ و به روش تعیین MIC، ۳۰/۷٪ جدایه ها گزارش شد (۲۴). همچنین کرمی و همکاران نشان دادند که روش انتشار از دیسک دارای حساسیت و اختصاصیت کمتری نسبت به MIC است. لذا با توجه به اینکه روش استاندارد طلایی، تعیین MIC است، نمی توان بر پایه

انتشار از دیسک، تجویز دارو را انجام داد (۲۵). لذا با توجه به اینکه روش دیسک آنتی بیوگرام روش مناسبی برای بررسی فراوانی مقاومت به آنتی بیوتیک ها نیست، لذا پیشنهاد می شود در مراکز تشخیصی و درمانی برای استفاده از آنتی بیوتیک ها در عفونت ها از روش پراث میکروداپلوشن استفاده شود

در مطالعه صفائی توچائی و همکاران مشخص شد که نانوکامپوزیت های Fe_2O_3 عامل دار شده با عصاره برگ اناریجه و سیپروفلوکساسین اثر هم افزایی در جدایه های بالینی و سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا داشتند (۲۶). در مطالعه لی و همکاران اثر هم افزایی نانوذرات نقره و اگزاسیلین و یا تتراسایکلین بر علیه اشريشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد (۲۷). در مطالعه پور اصغر و همکاران اثر هم افزایی نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با کورکومین با سیپروفلوکساسین بر علیه جدایه های بالینی اسینتو باکتر بومانی گزارش شد (۱۴). در مطالعه فکری کهن و همکاران اثر هم افزایی سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات لیپوزومی با سیپروفلوکساسین در جدایه های بالینی اشريشیا کلی نشان داده شد (۲۱). در مطالعه حاضر نیز اثر هم افزایی کامل و جزئی بین نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم در جدایه های بالینی و سویه استاندارد اشريشیا کلی مقاوم به مروپنم مشاهده شد، که این امر می تواند این عصاره گیاهی را یک مکمل دارویی مناسب در جدایه های مقاوم به مروپنم، همراه با مصرف این دارو معرفی کند. بطوری که انتظار می رود مصرف همزمان این ترکیب گیاهی با مروپنم، در جدایه های مقاوم به مروپنم باعث افزایش اثربخشی مروپنم و به عبارتی کاهش مقاومت دارویی به این آنتی بیوتیک شود.

در مطالعه وانگ و همکاران مشخص شد که مهار بیان ژن های پمپ خروجی به واسطه سیلیبین (از گیاه خارمریم) باعث بازگشت حساسیت به آنتی بیوتیک ها در استافیلوکوکوس اورئوس می شود (۲۸). مطالعات نشان داده که ترکیبات گیاهی همچون کورکومین، سیلیبین، لوتئولین و بربرین با مهار بیان ژن های پمپ افلاکس همچون *norA* و *qacA/B* نقش مهارکنندگی پمپ های

ompF و *ompC* همراه است (۳۱). حذف، جهش یا کاهش بیان پورین هایی از جمله *ompF* و *ompC* 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 *acrB* و *acrA* 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

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 اسپینتوباکتر بومانی مقاوم به سیپروفلوکساسین شدند (۱۴). در مطالعه صفائی توجائی و همکاران کاهش بیان ژن های پمپ افلاکس *mexA*، *mexB*، *mexX* 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 (۲۶). 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 اشیریشیا کلی، با کاهش بیان پورین های

نتیجه گیری

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.

در این مطالعه تأثیر نانوذرات اکسید نقره عامل دار شده با عصاره برگ چوچاق و مروپنم، بر چند جدایه بیمارستانی و سویه استاندارد اشیریشیا کلی بررسی شد. نتایج فیزیکیوشیمیایی 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

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, Ruckebauer 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 ME, 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, Shahriarinnour 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, 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/s41598-025-87682-2
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 Fe_3O_4 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, Bitra 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 of acquired 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