

اثر فرم آزاد و نانو کپسوله گویاکول (Guaiacol)، ترکیب موجود در اسانس *Campsis radicans* (L.) Seemann بر روی بیان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا، اشیشیا کلی و کاندیدا آلبیکنس

مریم رامتین^۱، فریبا شریف‌نیا^۲، محدثه لاری‌پور^{۳*}، میرساسان میرپور^۴ و سعید ضرابی^۵

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول، استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۵- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰

چکیده

Pseudomonas aeruginosa، *Escherichia coli* و *Candida albicans* پاتوژن‌های بیمارستانی می‌باشند که به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی روند درمان را مشکل ساخته‌اند. در این تحقیق، اثر ضد میکروبی اسانس گیاه *Campsis radicans* (L.) Seemann روی سویه‌های *P. aeruginosa* مقاوم به ایمپنیم حاوی ژن *Imipenemase (IMP)*، *E. coli* مقاوم به سفکسیم حاوی ژن *ESBLgene Type (TEM)* و *C. albicans* مقاوم به فلوکونازول حاوی ژن *ETS-related (ERG)* بررسی شد. براساس نتایج، کلیه سویه‌ها به اسانس حساس بوده و قطر هاله عدم رشد از ۱۰ تا ۲۰ mm متغیر بود که بیشترین حساسیت در *C. albicans* دیده شد. بعد از شناسایی ۳۲ ترکیب در اسانس با استفاده از GC/MS، ترکیب گویاکول به‌عنوان ماده مؤثر آن انتخاب و به روش امولسیون دوفازی نانو کپسوله گردید. میانگین MIC در فرم آزاد گویاکول $537/5-268/7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ و در انکپسوله شده $268/75-67/18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ بود که نشان‌دهنده اثرگذاری بیشتر فرم انکپسوله نسبت به فرم آزاد آن است. بررسی رهایش هر دو فرم طی ۷۲ ساعت نشان داد که رهاسازی فرم انکپسوله به‌صورت هدفمندتر و طی زمان بیشتر یعنی کاهش سمیت آن می‌باشد. سپس اثربخشی دو فرم گویاکول بر ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی گردید و مشخص شد که این کاهش در سودوموناس و کاندیدا بهتر از اشیشیا کلی بوده است. به‌طور کل هر دو فرم آزاد و انکپسوله در مقایسه با ژن شاهد 16s rRNA به‌طور معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن شدند که این کاهش در فرم انکپسوله محسوس‌تر از فرم آزاد بود. همچنین بررسی اثر سینرژیسم دو فرم گویاکول نشان داد که استفاده ترکیبی هر ماده با نانو کپسول خود اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به استفاده هر یک به تنهایی دارد. نتایج این تحقیق اثر ضد میکروبی اسانس گیاه *C. radicans* را تأیید کرد و نیز نشان داد که دو فرم گویاکول دارای ترکیب‌هایی جهت مهار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده، در نتیجه می‌توانند به‌عنوان یک مکمل درمانی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های مقاومت، سویه‌های پاتوژن، رهایش، انکپسوله.

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از معضلات اصلی در سراسر دنیاست (Bijari et al., 2015). شایع‌ترین سویه‌های پاتوژن دخیل در عفونت‌های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. ناکارآمدی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های متداول عامل پیدایش ژن‌های مقاومت و در نتیجه افزایش سویه‌های مقاوم شده، در نتیجه استفاده از ترکیب‌های مؤثره استخراج شده از گیاهان و کاهش عوارض جانبی آنها توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. استفاده از گیاهان دارویی از قدیمی‌ترین دستاوردهای انسان در درمان بیشتر بیماری‌هاست. گیاهان دارویی یکی از منابع مهم عوامل ضد میکروبی در بیشتر مناطق دنیا هستند (Jafari sales et al., 2019). اسانس‌های گیاهی به مقدار عمده شامل ترکیب‌های لیپوفیل، مولکول‌های غیرقطبی و کوچک می‌باشند که در بخش‌های مختلف گیاهان از جمله غده‌ها، ریشه‌ها و ... وجود داشته و مخلوط پیچیده‌ای از مواد فرار طبیعی‌اند که با روش‌های مختلفی از جمله فشار، تقطیر و ... بدست می‌آیند و کاربردهای بسیاری حتی در لوازم آرایشی و بهداشتی دارند (Salehi et al., 2016; Sarkic & Stappen, 2018).

با وجود مزایای بسیار استفاده از اسانس‌های گیاهی با چالش‌های جدی از جمله اثرگذاری نامطلوب بر ارگان‌های غیر هدف و اکسیده شدن برخی از مواد مؤثره روبروست (Yakhchi et al., 2020). برای رفع این مشکل، در این میان استفاده از علوم نانو توانسته بسیاری از مشکلات را کاهش یا برطرف کند (Shamsi et al., 2021). بدین معنی که با بارگذاری اسانس در نانوکپسول یعنی کپسوله کردن آن موجب ارتقای اثرگذاری و حفاظت اسانس به دلیل حساس بودن آن گردیده و همچنین در مطالعات مختلف دیده شده که نانوکپسول‌های حاوی اسانس با برخورداری از ویژگی‌های مناسب فیزیکی و شیمیایی، افزایش پایداری دارو و کنترل خوب رهایش (Release) می‌توانند موجب اثرگذاری بیشتر و هدفمند و عوارض جانبی کمتر شوند (Yakhchi et al., 2018).

2020.

گیاه *Campsis radicans* گونه‌ای از خانواده Bignoniaceae است و یکی از زیباترین گیاهان گلدار در جهان می‌باشد که به‌طور گسترده در ایالات متحده آمریکا، کانادا، چین و جنوب آسیا یافت می‌شود و در ایران کاملاً شهری شده است (Wen & Sobiya et al., 2019; Jansen, 1995). براساس مطالعات قبلی این گیاه حاوی ترکیب‌های فنلی است و فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی آن به اثبات رسیده است (Islam et al., 2019). همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی سایر گونه‌های خانواده Bignoniaceae مانند *Tabebuia rosea* و *Tabebuia argentea* مشخص شده است (Panda et al., 2019).

با توجه به اینکه سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی و کاندیدا آلبیکنس جزء فلور نرمال بدن هستند و از آنجا که فرصت‌طلب بوده و با ضعیف شدن سیستم ایمنی بیماری‌زا می‌شوند، از جمله معضلات شایع بیمارستانی بوده که به دلیل بروز مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در آنها روند درمان را مشکل کرده‌اند و نیز گیاه *C. radicans* که تاکنون در ایران روی آن مطالعه‌ای انجام نشده است. نتایج این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر در جهت درمان سویه‌های مقاوم باشد.

مواد و روش‌ها

برای تهیه نانوکپسول ترکیب‌های سیبویکل کلرید (Sc)، دی‌اتیل امین (DETA)، اسپن ۸۰، توئین ۸۰، ژلاتین و اتانول از شرکت مرک آلمان خریداری شد و ترکیب‌های اسانس گیاه از جمله گویاکول با تکنیک GC/MS شناسایی گردید.

تهیه نمونه

در این تحقیق از سویه‌های مقاوم شایع و فرصت‌طلب بیمارستانی استفاده شد، چون به دلیل مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌ها روند درمان را مشکل کرده و به دلیل فرصت‌طلب بودن خود بیماری‌های مختلفی ایجاد نموده‌اند. سویه‌های جدا شده از بیماران بیمارستان هفت تیر تهران تهیه

استاندارد Clinical and laboratory standards institute (CLSI) میزان حساسیت سویه‌ها بررسی گردید (Ramtin *et al.*, 2014؛ Ghaznavi-Rad *et al.*, 2010). در سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کلی از دیسک‌های جنتامایسین و ایمی‌پنم و در کاندیدا آلبیکنس از دیسک نیستاتین به‌عنوان کنترل استفاده شد. تمام پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و هاله عدم رشد بررسی گردید.

شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط روش PCR از میان گونه‌های سودوموناس مقاوم به کوتریموکسازول، سویه‌هایی که ژن bla IMP1 داشته، در اشریشیا کلی مقاوم به سفکسیم سویه‌هایی با ژن bla TEM و در کاندیدا/ی مقاوم به فلوکونازول ژن Erg11 مدنظر بودند. واکنش PCR برای بررسی ژن‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به‌عنوان الگو، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر جلو بر و ۰/۵ میکروپرایمر برگشتی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس سیناژن و آب مقطر دوبار تقطیر بوده است.

علت انتخاب این ژن‌ها، این بود که با توجه به مطالعات قبلی و بررسی نتایج محققان ژنهای ذکر شده جزء شایعترین ژنهای دخیل در بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک مدنظر می‌باشد. ژن‌های مقاوم و پرایمرهای مورد استفاده برای هر سویه و طول قطعه تکثیر برای هر ژن در جدول ۱ ذکر شده است (Xu *et al.*, 2015؛ Hashemi *et al.*, 2017؛ Ghorbani *et al.*, 2015). نتایج سویه‌های جدا شده در جدول ۲ قابل ملاحظه است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی سویه‌های مقاوم با ژن مقاوم توسط روش PCR

Table 1. Primers used to identify resistant strains with resistant genes by PCR

Strains	Gene	Primer	Medicine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	blaIMP-1 120bp	F: GAGTGGCTTAATTCTCRATC	Cotrimoxazole
		R: AACTAYCCAATAYRTAAC	
<i>Escherichia coli</i>	bla TEM 296bp	F: TCCGCTCATGAGACAATAACC	Cefixime
		R: ATAATACCGCACCATAGCAG	
<i>Candida albicans</i>	erg11 134bp	F: TTTGGTGGTGGTAGACATA	Fluconazole
		R: GAACTATAATCAGGGTCAGG	

و از سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا AT27853، اشریشیا کلی PT25922 و کاندیدا آلبیکنس AT10231 نیز استفاده شد. سپس آزمایش‌های تأییدی تشخیص سویه‌ها انجام گردید. برای انجام آزمایش تشخیصی سودوموناس از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز و ژلاتیناز و Oxidative Fermentative (OF) و کشت در محیط (SIM) SH2 Indol Motility Triple و Triple Sugar Iron agar (TSI) استفاده گردید (Mihani & Khosravi, 2007). برای تشخیص و شناسایی اشریشیا کلی بعد از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی کشت از محیط‌های مختلف از جمله TSI، SIM و Eosin (EMB) Methylene Blue و مک‌کانکی و سیمون سترات آگار استفاده شد (Mahmoodi *et al.*, 2018). برای بررسی مخمر کاندیدا از محیط کروم آگار استفاده گردید (Langeveld *et al.*, 2014).

بررسی میزان مقاومت سویه‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک برای بررسی مقاومت در سویه‌های ذکر شده از آنتی‌بیوتیک‌هایی استفاده شد که بیشترین موارد استفاده را داشته و سویه‌ها نیز به دلیل مصرف زیاد به آنها مقاوم شده و در روند درمان اختلال ایجاد کرده بودند که این آنتی‌بیوتیک‌ها عبارتند از: کوتریموکسازول در سودوموناس آئروژینوزا، سفکسیم در اشریشیا کلی و فلوکونازول در کاندیدا آلبیکنس. بدین منظور برای بررسی هاله عدم رشد و تعیین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک، ابتدا کلیه سویه‌ها روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس با استفاده از روش انتشار از دیسک (Kirby bauer) و جدول

فارلند برابر (CFU/ml) $10^6 \times 1/5$ از آن تهیه شد (Larypoor & Frsad, 2011).

بررسی خواص ضد میکروبی اسانس به روش دیسک دیفیوژن

برای انجام این کار از روش دیسک دیفیوژن یا انتشار دیسک در آگار استفاده شد. بدین ترتیب که محلول حاوی مخلوط اسانس گیاه و DMSO را روی دیسک بلانک ریخته و روی پلیت حاوی سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک قرار داده شد. سپس به‌عنوان کنترل به‌طور مجزا روی پلیت‌های حاوی میکروارگانیسم مقاوم یک دیسک بلانک که فقط با DMSO آغشته شده قرار داده شد. بعد از گذاشتن پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد بررسی گردید.

تهیه گویاکول (Guaiacol) و بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration)

گویاکول مورد استفاده در این تحقیق از کمپانی مرک آلمان با کد ۸۱۸۳۳۹ خریداری شد. گویاکول یا ۲-متوکسی فنول مایعی روغنی با فرمول $C_7H_8O_2$ است که حلالش آب مقطر است. برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی گویاکول از روش میکروپلیت ۹۶ خانه استفاده شد. سریال رقت استفاده شده $2150 \mu\text{g/ml}$ -۸/۳۹ بود.

تولید نانوکپسول گویاکول

نانوکپسول‌ها به روش امولسیون دیفیوژن دو فازی w/o (فاز آبی - فاز آلی) سنتز شد (Esmaeili & Niknam, 2014). آنگاه برای تهیه فاز آبی ژلاتین به آب مقطر استریل افزوده شد، سپس توئین ۸۰ و اسپن ۸۰ به‌عنوان پایدارکننده

مطابق جدول بالا در سودوموناس آئروژینوزا ژن مورد بررسی *bla IMP-1* با پرایمر فوق بود (Hashemi et al., 2017). در مورد اشریشیا کلی ژن مورد بحث *bla TEM* با پرایمر ذکر شده بود (Ghorbani et al., 2015) و در مورد کاندیدا ژن مورد بررسی *Erg11* با پرایمر یادشده بود (Xu et al., 2015).

تهیه گیاه *Campsis radicans* و اسانس آن

این گیاه بومی استان گیلان بوده و در فصل بهار و ابتدای فصل تابستان از باغ‌های شهر لاهیجان تهیه گردید. از پوست تنه، به‌روش تقطیر با آب (دستگاه کلونجر) اسانس‌گیری شد. برای جداسازی و شناسایی ترکیب‌های موجود در اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی GC/MS مدل Agilent 6890 که نوع ستونش DB-5 و طول ستونش ۳۰ متر و قطر داخلی آن ۰/۲۵ میلی‌متر بود استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون استاندارد از میکروب‌ها

برای بررسی تأثیر مواد ضد میکروبی از سوسپانسیون باکتریها با تراکم مناسب از استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریم استفاده شد. برای تهیه این استاندارد، میزان ۵٪ میلی‌لیتر از کلرید باریم ۱٪ با ۹/۹۵ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک ۱٪ مخلوط شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری از کلنی تازه کشت شده هر باکتری (۱۶ تا ۲۴ ساعت) برداشت شده و در مقداری سرم فیزیولوژی استریل حل شد و بعد چگالی صحیح کدورت استاندارد (تعیین غلظت میکروبی) با استفاده از اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵nm بین ۰/۸ تا ۰/۱٪ مشخص شد که این مقدار در دو باکتری اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا برابر (CFU/ml) $10^6 \times 1/5$ بود (Jafari sales et al., 2019). در مخمر کاندیدا آلبیکنس نیز دو کلنی برای فعال‌سازی روی محیط SDA حاوی کلرامفنیکل کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سوسپانسیون سلولی ۰/۵ مک

از نانوذره آزاد می‌شود (Moghtaderi *et al.*, 2021). بعد از ساخت نانوکپسول، پایداری دارو در مقابل افزایش دما و گذر زمان بررسی شد. بدین منظور ۵ میلی‌لیتر از محلول در ۴ درجه سانتی‌گراد و ۵ میلی‌لیتر در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته و در روز ۱۴، ۳۰ و ۶۰، یک میلی‌لیتر از آن برداشته و اندازه نانوذره و EE آن بررسی گردید. رهاسازی فرم آزاد و نانوکپسوله گویاکول برای مقایسه اثربخشی و پایداری گویاکول انکپسوله شده مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی

(MBC) گویاکول انکپسوله

برای مقایسه اثربخشی فرم آزاد و نانوکپسوله گویاکول از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. از نانوکپسول سریال رقت تهیه و MIC و MBC آن روی سویه‌ها بررسی گردید.

بررسی بیان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی قبل و بعد از

تیمار دو فرم آزاد و نانوکپسوله گویاکول

بیان نسبی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیک بعد از استفاده از فرم آزاد و نانوکپسوله گویاکول برای مقایسه در جدایه‌های مورد نظر به وسیله روش Real Time PCR بررسی شد. برای استخراج RNA، کلیه سویه‌ها در مجاورت غلظت subMIC ماده مؤثره اسانس و نیز نانوکپسوله آن قرار گرفتند. استخراج RNA و بعد سنتز cDNA از آن در همه سویه‌ها توسط کیت کیاژن انجام شد. برای بررسی بیان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از مسترمیکس حاوی سایبرگرین استفاده شد که در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA و ۱۰ پیکومول پرایمر جلوبر و برگشتی، ۱۰ میکرولیتر میکس حاوی سایبرگرین بود. برنامه دمایی، ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۴۰ چرخه بود. در پایان بیان ژن‌ها توسط روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد.

به آنها اضافه شد. برای تهیه فاز آلی (روغنی) ۵ میکرولیتر اتانول (به دلیل خاصیت ضد میکروبی اتانول، ابتدا غلظت‌های مختلف اتانول ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر علیه سویه‌ها استفاده گردید و مشخص شد که کلیه سویه‌ها در غلظت ۵ میکرولیتر زنده مانده و رشد می‌کنند) به ۳ میلی‌لیتر از غلظت‌های MBC از گویاکول افزوده شد و بعد به صورت قطره قطره به فاز آبی روی همزن اضافه گردید و تا مرحله زله‌ای شدن محلول یعنی کپسوله شدن در نانوذره پلیمری پیش رفت. سپس نانوکپسول‌های حاوی گویاکول به مدت

۲۴ ساعت در دمای محیط به حالت آرامش قرار گرفت. برای جدا کردن نانوذرات متصل به هم ابتدا از ساتتریفوژ دور بالا ۱۱۰۰۰ rpm و بعد اولتراسونیک استفاده شد (Esmaeili *et al.*, 2013). در نهایت نانوکپسول‌های تهیه شده به کمک تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM بررسی گردید (Salehi *et al.*, 2021؛ Ghaderi *et al.*, 2021؛ Yakhchi *et al.*, 2020؛ al., 2016؛ Mahmoudi *et al.*, 2018).

با توجه به اینکه در فرایند نانوکپسوله شدن لودینگ ۱۰۰٪ وجود ندارد، یعنی ۱۰۰٪ گویاکول وارد نانوکپسول نمی‌شود، کارایی یا سوپرناتانت یا EE% (Entrapment Efficiency) طبق فرمول زیر، اندازه گیری شد که نشان می‌دهد چند درصد از گویاکول وارد نانوکپسول شده است (Akbarzadeh *et al.*, 2021).

$$\text{Encapsulation Efficiency (\%)} = [(A - B)/A] \times 100$$

A: نسبت اولیه داروی لود شده در فرمولاسیون

B: مقدار داروی آزاد منتقل شده از طریق غشاء

رهاسازی یا release عبارت است از: تعیین درصد دارویی که به روش دیالیز در بافر PBS وارد نانوکپسول شده (که در اینجا ۸۶٪ بوده) و در طی زمان ۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت

سینرژیسم اسانس‌ها

روش‌های مختلف برای بررسی سینرژیسم (برهم‌کنش یا هم‌افزایی) ترکیب‌های آنتی‌بیوتیک مشابه، گاهی امکان دارد به نتایج مختلفی بینجامد. روش غالب برای بررسی سینرژیسم Checker board است (Islam et al., 2019). فعالیت ضد میکروبی مخلوط ماده مؤثره با نانوکپسوله‌اش به‌صورت ترکیب با یکدیگر ارزیابی شد و نتایج توسط

اندیکس FICI (رقت مهاری کسری) محاسبه گردید و در جدول زیر بیان شده است (Khodavandi et al., 2018).

FICI=Fractional inhibitory concentration Index

$$FICI = \frac{MIC A \& B}{MIC A} + \frac{MIC B \& A}{MIC B}$$

جدول ۲- تفسیر سینرژیسم برحسب رقت مهاری کسری (FICI)

Table 2. Interpretation of synergism in terms of fractional inhibitory concentration index (FICI)

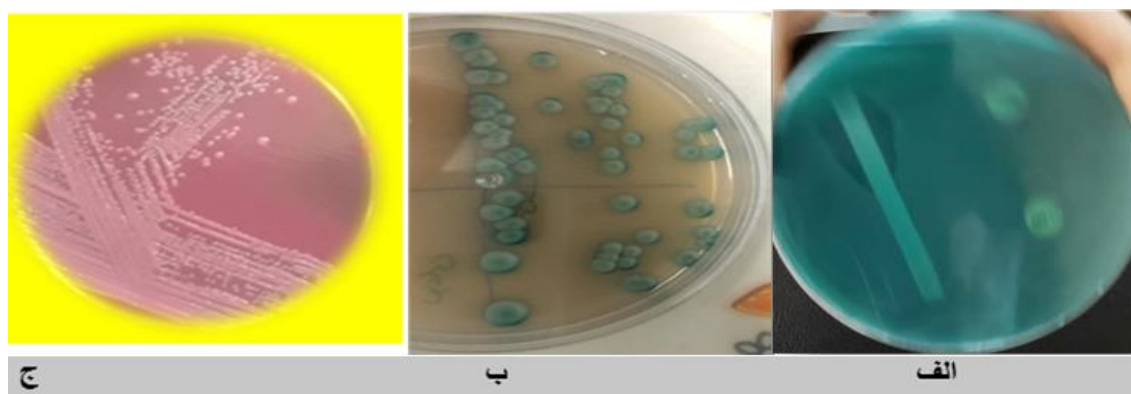
Type of effect	FICI
Synergistic	≤0.5
Indifferent	0.5-4
Antagonistic	≥4

نتایج

تأیید سویه‌های تهیه شده

همان گونه که در شکل ۱- الف مشاهده می‌شود سودوموناس همولیز در آگارخوندار نشان داد و کلنی موکوئیدی تشکیل داد و نیز پیگمان‌های زرد-سبز یا سبز-آبی آنها در محیط مولر هینتون آگار بررسی شد و

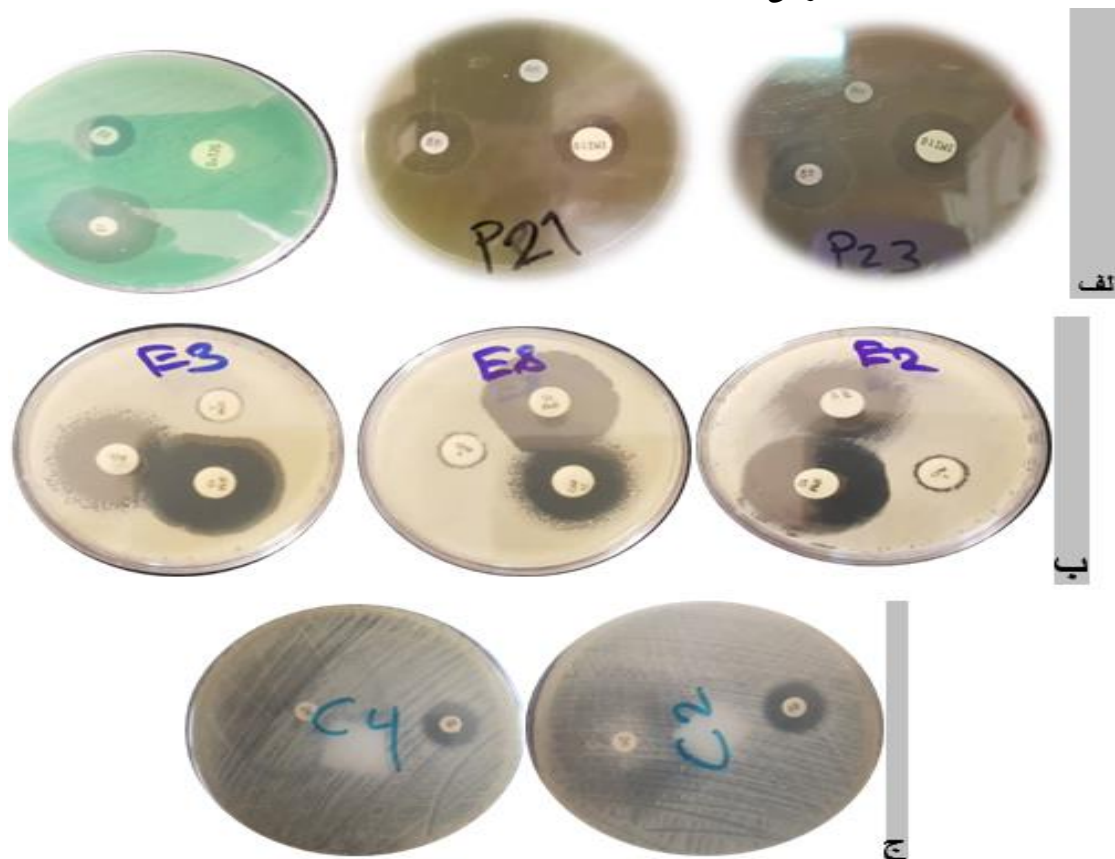
سودوموناس تأیید گردید. در شکل ۱- ب بر روی محیط کشت اختصاصی کروم آگار کاندیدا کلنی کاندیدا آلبیکنس به رنگ سبز روشن دیده می‌شود. در شکل ۱- ج، کلنی‌های اشیریشیا کلی در محیط کشت مک‌کانکی به رنگ صورتی تأیید شد.



شکل ۱- نتایج برخی از تست‌های تأییدی سویه‌ها: (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Candida albicans* (c) و *Escherichia coli*
Figure 1. Results of some confirmatory tests of strains: a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Candida albicans*, and c) *Escherichia coli*

در بین سویه‌ها، کاندیدا/ مقاوم به فلوکونازول، سودوموناس مقاوم به کوتریموکسازول و اشیریشیا کلی مقاوم به سفکسیم بود.

میزان مقاومت سویه‌های جدا شده به آنتی‌بیوتیک بعد از انجام آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام، سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شناسایی شدند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود سوش‌ها نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت و نسبت به برخی مقاومت دارند.



شکل ۲- مشاهده تست آنتی‌بیوگرام: (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Escherichia coli* و (c) *Candida albicans*

Figure 2. Observation of antibiogram test: a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Escherichia coli*, and c) *Candida albicans*

E2, E3, and E8: isolated isolates of *E. coli*; C2 and C4: isolated isolates of *C. albicans*.

آنتی‌بیوتیک سفکسیم مشاهده می‌شود که دیسک جنتامایسین و ایمپنم به‌عنوان کنترل استفاده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود اشیریشیا کلی به سفکسیم مقاوم بوده و رشد کرده است ولی نسبت به دو دیسک کنترل حساس بوده و هاله عدم رشد ایجاد نموده است.

در شکل ۲- ج هاله عدم رشد کاندیدا/ در برابر آنتی‌بیوتیک فلوکونازول مشاهده می‌شود که دیسک نیستاتین

در شکل ۲- الف هاله عدم رشد سودوموناس در برابر آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول مشاهده می‌شود که دیسک جنتامایسین و ایمپنم به‌عنوان کنترل استفاده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود سودوموناس به کوتریموکسازول مقاوم بوده و رشد کرده است ولی نسبت به دو دیسک کنترل حساس بوده و هاله عدم رشد ایجاد نموده است.

در شکل ۲- ب هاله عدم رشد اشیریشیا کلی در برابر

انجام روش Polymerase Chain Reaction (PCR) مشخص شد که فقط سه سویه دارای ژن *blaIMP-1* است. از بین ۳۰/شیریشیا کلی جدا شده، هفت سویه آن مقاوم به سفکسیم بوده که PCR مشخص کرد که فقط سه سویه دارای ژن *blaTEM* می باشد. از ۲۵ کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران فقط شش سویه مقاوم به فلوکونازول بودند که PCR مشخص کرد که فقط دو سویه آن دارای ژن *Erg11* بود که برای انجام مطالعات مولکولی انتخاب شدند.

به عنوان کنترل استفاده شده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود کاندیدا/ به فلوکونازول مقاوم بوده و رشد کرده است ولی نسبت به دیسک کنترل حساس بوده و هاله عدم رشد ایجاد نموده است.

ژن های مقاومت دارویی در سویه های مقاوم انتخاب شده طبق جدول ۳، از ۳۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده تعداد ۵ سویه به کوتریموکسازول مقاوم بودند که بعد از

جدول ۳- نتایج مربوط به جداسازی سویه ها و وجود ژن مقاومت به آنتی بیوتیک

Table 3. Results related to strains isolation and presence of antibiotic resistance gene

Strains	Number of isolates obtained	Number of drug resistant strains	Number of resistant strains with desired gene
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	5	3
<i>Escherichia coli</i>	30	7	3
<i>Candida albicans</i>	25	6	2

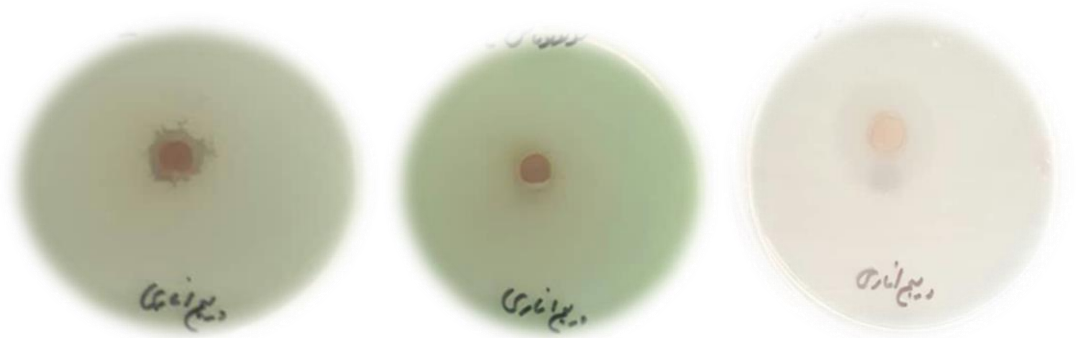
خواص ضد میکروبی اسانس

برای بررسی اثر ضد میکروبی اسانس از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. نتایج اثر اسانس بر سویه های مقاوم دارای ژن مورد نظر (سه سویه سودوموناس آئروژینوزا، سه سویه شیریشیا کلی و دو سویه کاندیدا آلبیکنس) در جدول ۴ و شکل ۳ قابل ملاحظه است.

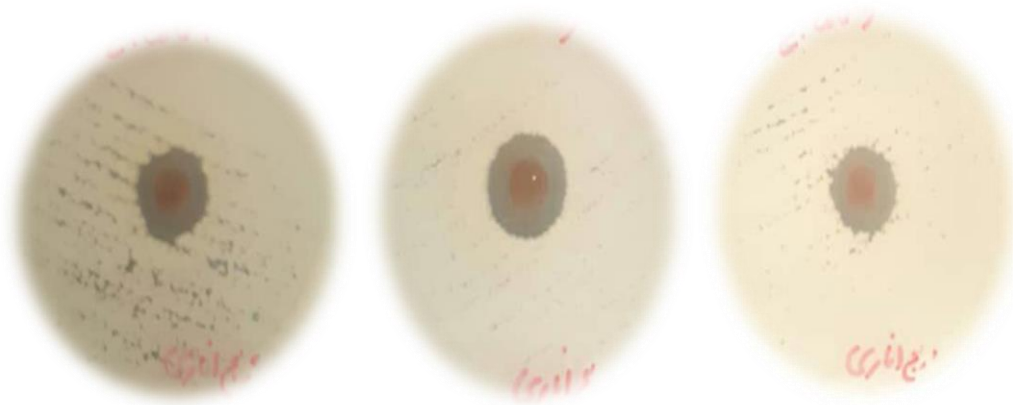
در شکل ۳-الف اثر ضد میکروبی اسانس *C. radicans* بر هر سه سویه سودوموناس مقاوم قابل مشاهده است. قطر هاله عدم رشد در جدول ۴ نشان داده شده است. در شکل ۳-ب اثر ضد میکروبی اسانس *C. radicans* بر هر سه سویه شیریشیا کلی مقاوم قابل مشاهده است. قطر هاله عدم رشد نیز در جدول ۴ ذکر شده است. در شکل ۳-ج اثر ضد میکروبی اسانس *C. radicans* بر هر دو سویه کاندیدا/ مقاوم قابل مشاهده است. قطر هاله عدم رشد نیز در جدول ۳ آورده شده است.

شناسایی ترکیب های اسانس

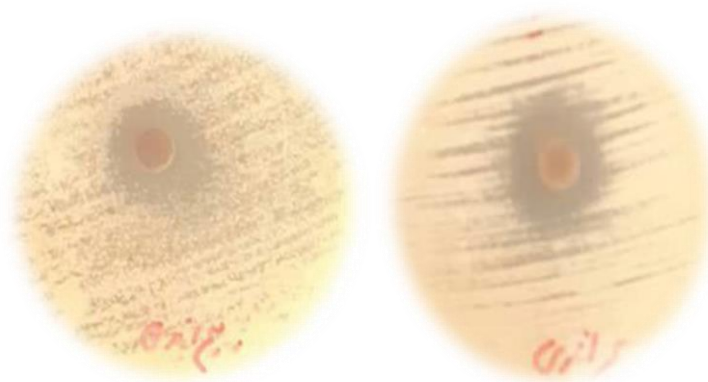
۳۱ ترکیب در اسانس گیاه *Campsis radicans* شناسایی شد که برابر با ۹۴/۷٪ از کل حجم اسانس بود. بیشترین مقدار (۸/۴٪) متعلق به ۱-نونادسن با فرمول شیمیایی $C_{19}H_{38}$ بود و کمترین مقدار (۱/۴٪) متعلق به هگزادکان با فرمول $C_{16}H_{34}$ بود. برخی از ترکیب های مهم دیگر عبارت بودند از: فنول هایی مانند گواپاکول یا ۲-متوکسی فنل ($C_7H_8O_2$) به مقدار ۲/۴٪، ۴-متیل فنول یا پارا-کرزول (C_7H_8O) به مقدار ۳/۷٪، ۳-اتیل فنول ($C_8H_{10}O$) به مقدار ۴/۸٪، دوکوزانوئیک اسید ($C_{22}H_{44}O_2$) به میزان ۱/۶٪، استیگماستا-۳،۵-دی ان ($C_{29}H_{48}$) به مقدار ۳/۸٪، آمبرتولید (Oxacycloheptadec-8-en-2-one) با فرمول $C_{16}H_{28}O_2$ به میزان ۵/۴٪ و ایزواوژنول ($C_{10}H_{22}O_8$) به میزان ۵/۴٪.



a



b



c

شکل ۳- اثر ضد میکروبی اسانس گیاه *Campsis radicans* روی سویه ها: (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Escherichia coli* و

Candida albicans (c)

Figure 3. Antimicrobial effect of *Campsis radicans* essential oil: a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Escherichia coli*, and c) *Candida albicans*

جدول ۴- قطر هاله عدم رشد اسانس *Campsis radicans* بر سویه‌ها

Table 4. Diameter of essential oil growth inhibition zone on strains

Resistant strains	Diameter of essential oil growth inhibition zone (mm)
E2	12
E3	14
E8	14
P12	10
P21	15
P23	20
C2	17
C4	16

E2, E3, and E8: isolated isolates of *E. coli*; P12, P21, and P23: isolated isolates of *P. aeruginosa*; C2 and C4: isolated isolates of *C. albicans*.

حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی رشد گویاکول نتایج MIC و MBC در سویه‌های تحت تیمار در جدول ۵ بیان شده است. همان گونه که در جدول قابل مشاهده است بیشترین عدد MIC و MBC در آن ۲۶۸/۷۵ و کمترین عدد در هر دو ۵۳۷/۵ می‌باشد.

همان گونه که در جدول ۴ قابل مشاهده است میانگین قطر هاله عدم رشد که نشان‌دهنده اثرگذاری اسانس گیاه بر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است، در *اشریشیا کلی* ۱۲-۱۴ میلی‌متر، در *سودوموناس آئروژینوزا* ۲۰-۱۰ میلی‌متر و در *کاندیدا آلبیکنس* ۱۷-۱۶ میلی‌متر می‌باشد.

جدول ۵- حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی فرم آزاد گویاکول بر سویه‌ها

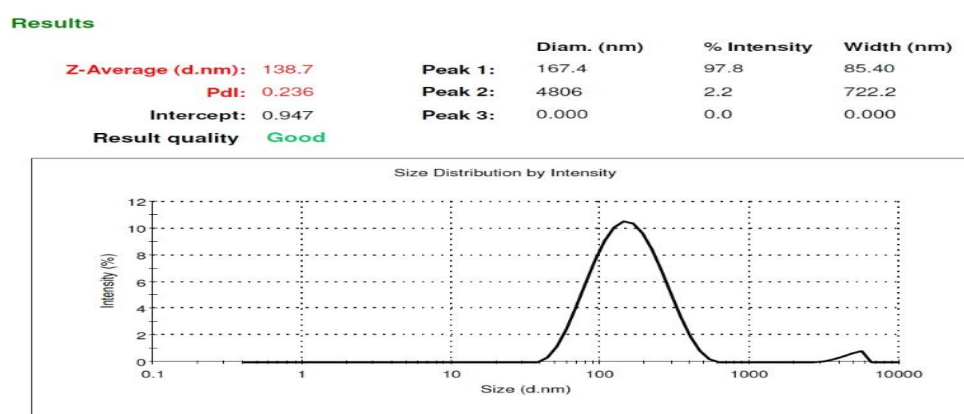
Table 5. Minimum inhibitory and lethal concentrations of free form of guaiacol on strains

Resistant strains	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
E2	537.5	537.5
E3	268.7	268.7
E8	537.5	537.5
P12	537.5	537.5
P21	537.5	537.5
P23	268.7	268.7
C2	537.5	537.5
C4	268.7	268.7

E2, E3, and E8: isolated isolates of *E. coli*; P12, P21, and P23: isolated isolates of *P. aeruginosa*; C2 and C4: isolated isolates of *C. albicans*.

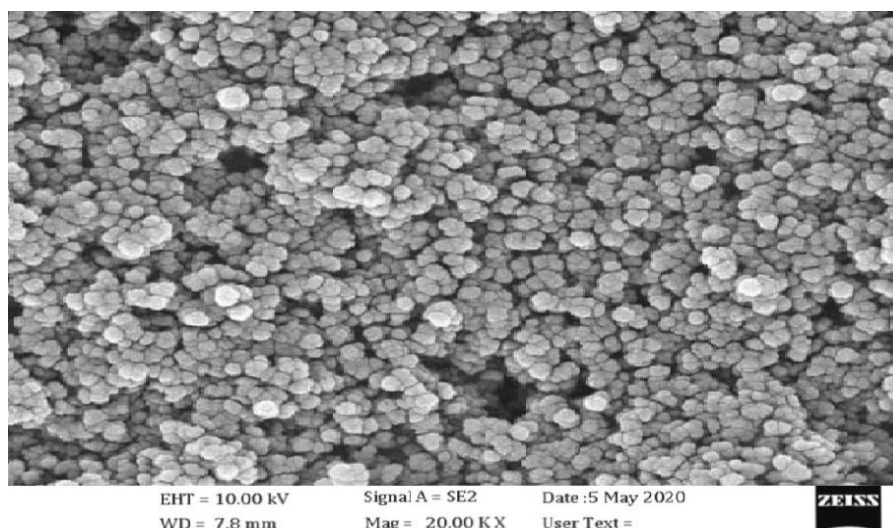
همچنین برای تأیید تشکیل نانوکپسول و تأیید مورفولوژی نانو کپسول با میکروسکوپ الکترونی تصویر تهیه شد. در شکل ۵ عکس نانوذرات گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی به شکل کروی قابل مشاهده است.

اندازه و تصویر میکروسکوپی نانوکپسول گویاکول طبق شکل ۴ میانگین اندازه نانوذرات (Z-Average) که توسط پراکندگی نوری دینامیک (DLS) بدست آمده حدود ۱۳۸/۷ نانومتر و Pdi یا میزان شاخص پراکندگی ذرات ۰/۲۳۶ است.



شکل ۴- اندازه نانوکپسول گویاکول

Figure 4. Nanocapsule size of guaiacol



شکل ۵- تصویر تهیه شده از نانوکپسول گویاکول توسط میکروسکوپ الکترونی SEM

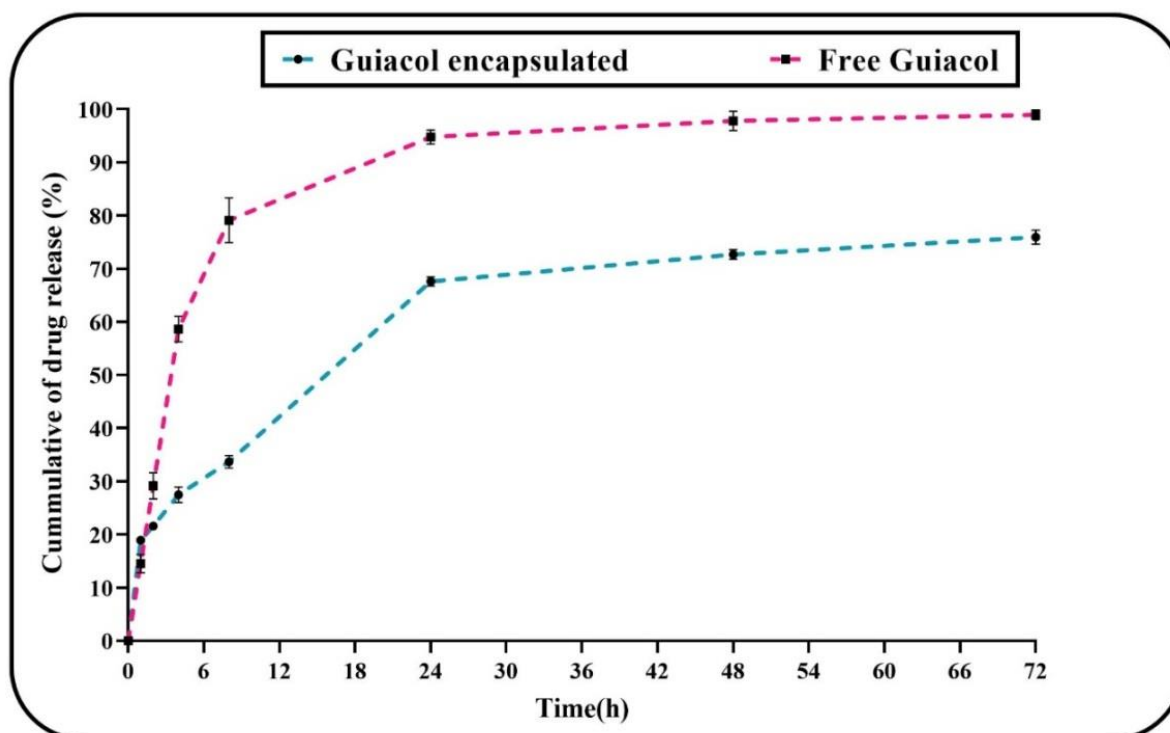
Figure 5. Image of guaiacol nanocapsule prepared by SEM electron microscope

به صورت دوفازی شامل یک دوره رهایش سریع اولیه با شیب تند در عرض ۸ ساعت (سازوکار انتشار) و به دنبال آن یک انتشار آهسته و خطی در عرض ۷۲ ساعت (سازوکار فرسایش) می باشد (Akbarzadeh *et al.*, 2021). به طور تقریبی طی ۸ ساعت اول ۸۰٪ گویاکول فرم آزاد و ۳۴٪ فرم انکپسوله رها شده، طی ۲۴ ساعت ۹۵٪ فرم آزاد و ۶۷٪ فرم انکپسوله و طی ۷۲ ساعت ۹۹٪ فرم آزاد و ۷۵٪ فرم انکپسوله آزاد شده است.

با تولید نانوکپسول بعد از سانتریفوژ آن با بررسی طول موج محلول رویی مشخص گردید که همانطور که در متن اشاره گردید لودینگ ۱۰۰٪ نبوده و فقط ۸۶٪ گویاکول وارد نانوکپسول شده است، یعنی EE برابر است با ۸۶٪.

رهاسازی گویاکول آزاد و نانوکپسوله

طبق شکل ۶ الگوی رهاسازی گویاکول با گذر زمان،



شکل ۶- مقایسه رهاسازی گویاکول آزاد و انکپسوله شده

Figure 6. Release comparison of free and encapsulated guaiacol

۲۶۸/۷۵ بوده است. اثرگذاری فرم انکپسوله در کلیه سویه‌ها اعم از مخمر و باکتری تقریباً به یک نسبت برآورد شده است. همان گونه که قابل مشاهده است گویاکول انکپسوله شده روی کلیه سویه‌ها اعم از باکتری و قارچ مؤثر بوده و در این میان حساسیت کاندیدا از همه بیشتر و اشیریشیا کلی از همه کمتر بوده است.

نتایج **Real Time PCR** برای بیان ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی قبل و بعد از تیمار اثربخشی دو فرم آزاد و انکپسوله گویاکول بر بیان ژن‌های مقاومت دارویی در مقایسه با شاهد در شکل‌های ۸، ۹ و ۱۰ قابل مشاهده است. بعد از ۲۴ ساعت در نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل $\Delta\Delta CT$ در کلیه سویه‌ها اعم از مخمر و باکتری بیان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بعد از تیمار شدن با هر دو فرم آزاد و گویاکول انکپسوله گویاکول

پایداری نانوکپسول گویاکول با گذر زمان و افزایش دما در نمودارهای زیر تغییرات اندازه pdi و EE نانوکپسول در ۴ درجه سانتی‌گراد (دمای ذخیره در یخچال) و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) در طی ۶۰ روز نشان داده شده است.

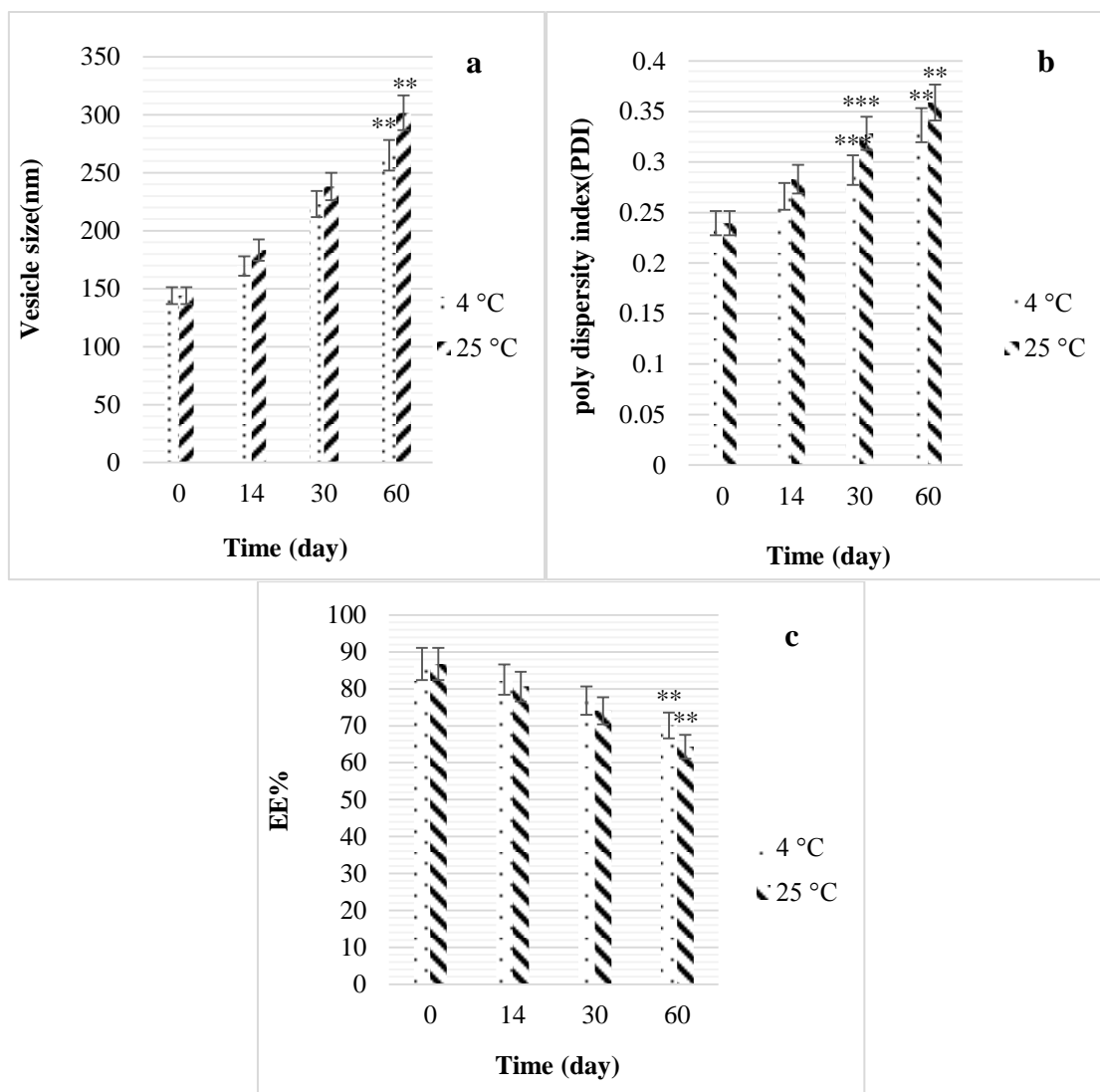
حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی رشد گویاکول نانوکپسول شده

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) فرم انکپسوله گویاکول در جدول ۶ قابل مشاهده است.

محدوده مقدار MIC و MBC، ۲۶۸/۷۵-۶۷/۱۸ $\mu g/ml$ است. بیشترین MIC و MBC ۶۷/۱۸ و کمترین در هر دو

آن بوده ولی تأثیری بر بیان ژن‌های Housekeeping که منظور ژن 16srRNA در باکتری‌ها و ژن 18srRNA در مخمر یوکاریوتی بوده نداشته است.

نسبت به شاهد به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است که این کاهش در فرم انکپسوله نسبت به فرم آزاد بیشتر بوده که علت آن به دلیل افزایش قدرت، نفوذپذیری و اثربخشی



شکل ۷- میزان پایداری نانوکپسول گویاکول: (a) سایز نانوکپسول، (b) پراکندگی نانوکپسول و (c) مقدار ماده محصور شده در

نانوکپسول (EE)

$P < 0.01$ **, $P < 0.001$ ***

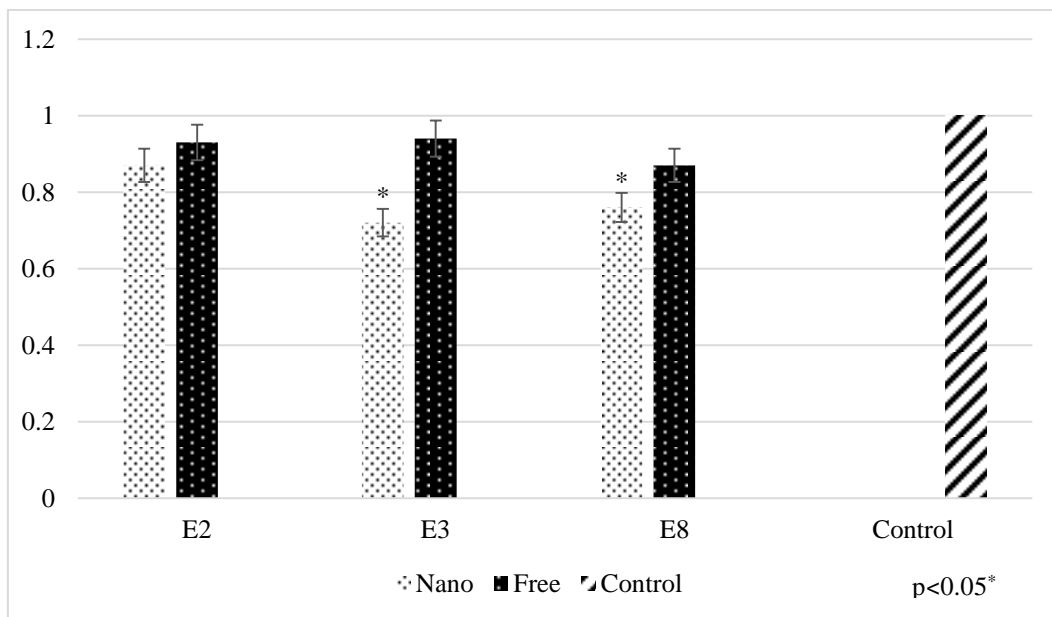
Figure 7. Guaiacol nanocapsule stability: a) Nanocapsule size, b) Nanocapsule dispersion, and c) Amount of nanocapsule encapsulated (EE)

جدول ۶- حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نانوکپسول گویاکول بر سویه‌ها

Table 6. Minimum inhibitory and lethal concentrations of guaiacol nanocapsule on strains

Strains	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
E2	134.37	134.37
E3	134.37	134.37
E8	268.75	268.75
P12	134.37	134.37
P21	67.18	67.18
P23	67.18	67.18
C2	134.37	134.37
C4	67.18	67.18

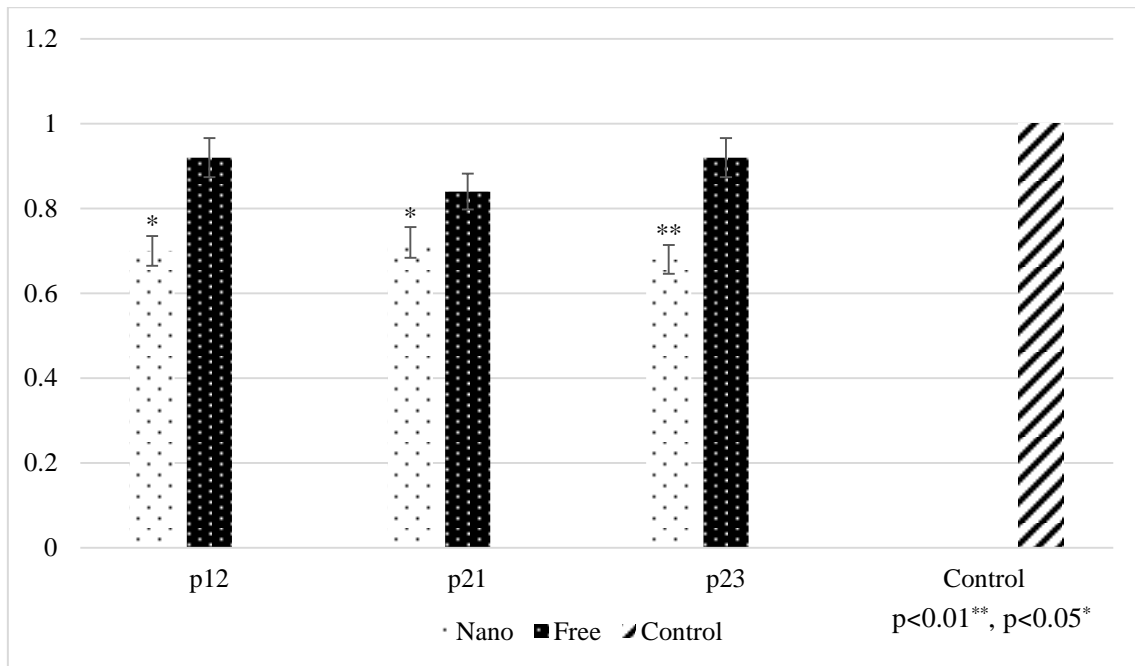
E2, E3, and E8: isolated isolates of *E. coli*; P12, P21, and P23: isolated isolates of *P. aeruginosa*; C2 and C4: isolated isolates of *C. albicans*.



شکل ۸- مقایسه تغییر بیان ژن TEM در *Escherichia coli* تحت تأثیر گویاکول آزاد و نانوکپسوله

Figure 8. Comparison of TEM gene expression changes in *Escherichia coli* affected by free and nanocapsulated guaiacol

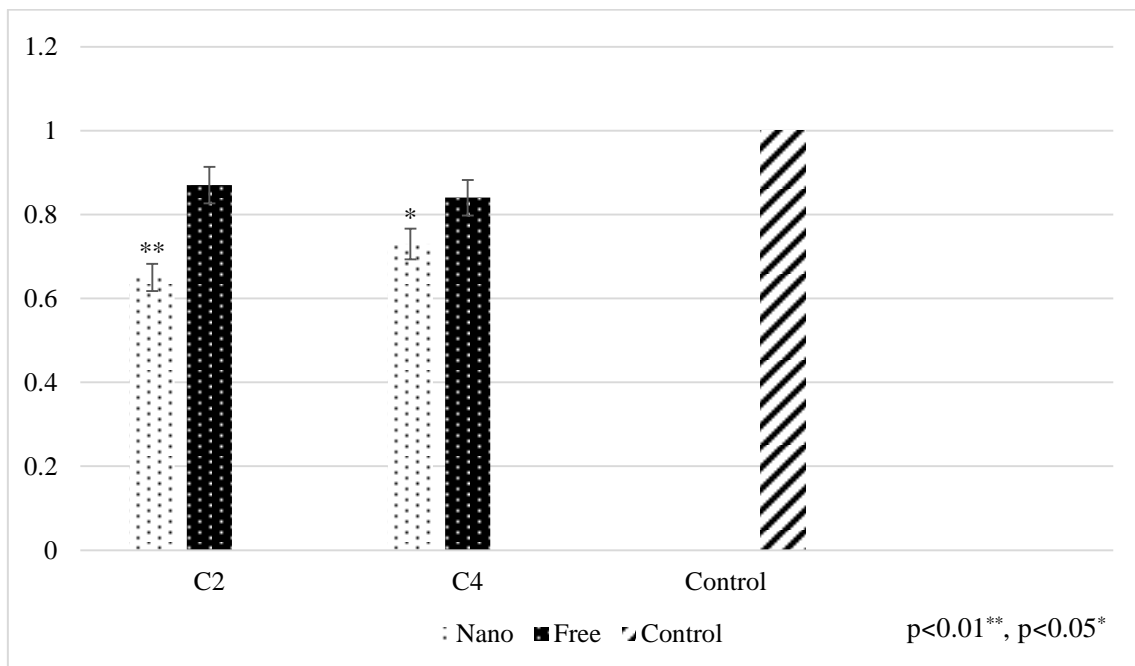
E2, E3, and E8: isolated isolates of *E. coli*.



شکل ۹- مقایسه تغییر بیان ژن IMP در *Pseudomonas aeruginosa* تحت تأثیر گواياکول آزاد و نانوکپسوله

Figure 9. Comparison of IMP gene expression changes in *Pseudomonas aeruginosa* affected by free and nanoencapsulated guaiacol

P12, P21, and P23: isolated isolates of *P. aeruginosa*.



شکل ۱۰- مقایسه تغییر بیان ژن ERG در *Candida albicans* تحت تأثیر گواياکول آزاد و نانوکپسوله

Figure 9. Comparison of ERG gene expression changes in *Candida albicans* affected by free and nanocapsulated guaiacol

C2 and C4: isolated isolates of *C. albicans*.

هم‌افزایی

محاسبه FICI نشان داد که استفاده ترکیبی هر ماده با نانوکپسول خود علیه پاتوژن‌ها اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به کاربرد هر یک از آنها به تنهایی دارد. همچنین در ترکیب ذکر شده اثر آنتاگونیسم بی‌اثر نبود (جدول ۷).

در شکل ۸ در *اشریشیا کلی* بیان ژن TEM در فرم آزاد گویاکول ۰/۸-۰/۹ و در نوع انکپسوله ۰/۷-۰/۸ در شکل ۹ در *سودوموناس آئروژینوزا* بیان ژن IMP در فرم آزاد ۰/۸-۹/۹ و در انکپسوله ۰/۶-۰/۷ و در شکل ۱۰ در مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بیان ژن ERG در گویاکول آزاد ۰/۸ و در نوع انکپسوله ۰/۶-۰/۷ شد.

جدول ۷- برهمکنش گویاکول با نانوکپسول خود (هم‌افزایی)

Table 7. Guaiacol interaction with its nanocapsule (synergy)	
Strains	Total of MIC of free and nanocapsulated guaiacol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
E2	33.59
E3	67.18
E8	67.18
P12	33.59
P21	16.79
P23	8.39
C2	33.59
C4	16.79

E2, E3, and E8: isolated isolates of *E. coli*; P12, P21, and P23: isolated isolates of *P. aeruginosa*; C2 and C4: isolated isolates of *C. albicans*.

بحث

روی سویه‌های ذکر شده، نتیجه گرفته شد که ماده مؤثره اسانس یعنی گویاکول همانند کل اسانس (total essential oil) بر کلیه سویه‌ها مؤثر بوده و در مجموع حساسیت کلیه سویه‌ها نسبت به فرم آزاد گویاکول به یک نسبت بوده است. سپس گویاکول انکپسوله شد و میزان کارایی کپسوله‌سازی ۸۶٪ و میانگین سایز ذرات نانوکپسول ۱۳۸/۷nm برآورد شد. آنگاه رهاسازی دو فرم آزاد و انکپسوله گویاکول طی ۷۲ ساعت بررسی شد و مشاهده گردید که فرم انکپسوله در مقایسه با فرم آزاد به‌صورت تدریجی و هدمندتر آزاد می‌گردد که این یعنی پایداری بیشتر فرم انکپسوله نسبت به فرم آزاد و اثربخشی بهتر آن. سپس پایداری نانوکپسول در گذر زمان و افزایش دما سنجیده شد. طبق اصل کلی هر چه اندازه و pdi کمتر و EE بیشتر باشد بهتر است (Moghtaderi *et al.*, 2021). انتظار می‌رود که با گذر زمان اندازه نانوذره و PDI یعنی پراکندگی ذرات نسبت به روز صفر به دلیل چسبندگی ذرات به هم بالا رفته باشد و EE یعنی مقدار دارویی که وارد ساختار شده، به دلیل خروج

در طب سنتی استفاده از گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم برای درمان بیماری‌های میکروبی توصیه شده است (Mirzaie *et al.*, 2017). از محدودیت‌های استفاده از اسانس‌های گیاهی فرآریت آنهاست. به همین دلیل به نظر می‌رسد می‌توان با کپسوله کردن این ترکیب‌ها نیمه عمر آنها را افزایش داد و باعث رهاسازی هدفمند، سمیت کمتر و پایداری بیشتر آنها شد (Esmaili & Niknam, 2014; Esmaili *et al.*, 2013).

در این مطالعه اثر ضد میکروبی اسانس گیاه بررسی شد، با توجه به نتایج بدست آمده از روش دیسک دیفیوژن و مشهود بودن هاله عدم رشد مشخص گردید که اسانس گیاه بر تمامی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک حاوی ژن مدنظر اعم از باکتری و مخمر تأثیرگذار بوده که البته در بین مخمر و باکتری بیشترین تأثیر را روی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* داشته است. آنگاه بعد از شناسایی ترکیب‌های اسانس و بررسی اثر ضد میکروبی آن و با مشاهده MIC و MBC

کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته که این کاهش در فرم نانو بیشتر از فرم آزاد بوده است که این کاهش بیان در سودوموناس و کاندیدا نسبت به *اشرشیا کلی* بیشتر بوده است.

Sharif و Amini (۲۰۱۹) به بررسی اثر نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم بر بیان ژن MexA در سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* مقاوم به دارو پرداخته و اثر مهاري آنها را اثبات کردند (Sharif & Amini, 2019).

Roshani و همکاران (۲۰۱۶) اثر ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی و استونی گیاهان گزنه و آویشن شیرازی را بر روی سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* حاوی ژن‌های متالوبتالاکتامازی bla VIM و bla IMP بررسی کرده و دریافتند که عصاره‌های متانولی و استونی گزنه و آویشن شیرازی روی سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* تولیدکننده IMP اثر داشتند (Roshani et al., 2016)، به نحوی که با نتایج مطالعه ما یعنی اثر اسانس بر ژن مقاومت IMP در سودوموناس همخوانی داشت.

Ahmadi Roudbaraki و همکاران (۲۰۱۷) تغییر بیان ژن mexB را در جدایه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* مقاوم به سیروفلوکساسین تحت تیمار با سیروفلوکساسین و سیروی در ترکیب با سیلیبینین انکپسوله در میسل (نانوذرات) بررسی کرده و دریافتند که سیلیبینین انکپسوله در نانوذرات میسلی می‌تواند باعث افزایش اثربخشی سیروفلوکساسین در این جدایه‌ها شود. بنابراین می‌توان گفت که نانوذرات حاوی سیلیبینین اثر سینرژیک بر آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین داشته است (Ahmadi Roudbaraki et al., 2017) که نتایج این تحقیق با نتایج سینرژیسیم این مطالعه همخوانی داشت.

Khodavandi و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر ضد قارچی فلوکونازول و تربینافین به تنهایی و ترکیب سینرژیسیم فلوکونازول/ تربینافین را در مهار تشکیل بیوفیلم کاندیدا/آلبیکانس و ارزیابی میزان بیان ژن HWPI بررسی کرده و نتایج بیانگر تأثیر هم‌افزایی در ترکیب فلوکونازول/تربینافین بر بیان ژن HWPI بود و موجب کاهش سلول‌های مخمری

تدریجی از آن کاهش یابد. بنابراین هر چه اندازه و pdi پایین‌تر و EE بالاتر باشد بهتر است (Moghtaderi et al., 2021). مطالعات رابطه مستقیمی بین اندازه نانوذره و میزان سمیت سلولی نشان داده‌است، به طوری که هر چه اندازه نانوذره کوچکتر باشد میزان نفوذ آن به داخل سلول بیشتر است و سمیت وابسته به دوز کمتر ایجاد می‌گردد. از این رو، رها شدن آهسته دارو از درون نانوساختارها خود مزیتی است، زیرا سمیت آنها را کمتر کرده و باعث می‌شود دوزهای مناسب از دارو به بافت هدف منتقل شود (Shamsi et al., 2021). البته افزایش دما باعث افزایش مقدار نشت دارو از حامل‌ها می‌گردد. در دمای بالا غشای وزیکول‌ها به دلیل فاصله گرفتن فسفولیپیدها از هم سیال‌تر شده و این سیال بودن باعث کاهش ضخامت غشاء و به دنبالش افزایش سرعت رهاسازی داروی محصور شده در آن می‌گردد (Akbarzadeh et al., 2021؛ Moghtaderi et al., 2021). بنا بر تفاسیر ذکر شده دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) بهتر از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) است. به طوری که اثر ضد میکروبی فرم انکپسوله گویاکول روی سویه‌های یادشده بررسی شد و با مقایسه MIC و MBC گویاکول آزاد و انکپسوله همان‌طور که انتظار داشتیم MIC و MBC فرم انکپسوله نسبت به فرم آزاد کمتر بوده است. علت این موضوع آن است که نانوکپسول علاوه بر افزایش نفوذپذیری، باعث حفاظت ماده مؤثره درون خود از آنزیم‌ها و ... شده، در نتیجه باعث رهایش بهتر عصاره به درون سلول باکتری و مرگ آن می‌گردد. مطالعات مختلفی که در زمینه انکپسوله کردن عصاره و اسانس‌های گیاهی انجام شده نشان داده که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد اثر ضد باکتریایی بیشتری بر علیه باکتری‌های مطالعه شده دارد و نیز با توجه به فرآیند اسانس‌ها به نظر می‌رسد می‌توان با کپسوله کردن این ترکیب‌ها نیمه عمر آنها را افزایش داد (Shamsi et al., 2021). در نهایت بیان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بعد از تیمار با دو فرم آزاد و انکپسوله گویاکول بررسی شد و در مقایسه با ژن کنترل (تیمار نشده) مشاهده گردید که در کلیه سویه‌ها بیان ژن بعد از تیمار

- resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* treated with silibinin-encapsulated in nanoparticles. Journal of Babol University of Medical Sciences, 19(11): 42-49.
- Akbarzadeh, I., Shayan, M., Bourbour, M., Moghtaderi, M., Noorbazargan, H., Eshrati Yeganeh, F., Saffar, S. and Tahriri, M., 2021. Preparation, optimization and in-vitro evaluation of curcumin-loaded niosome@calcium alginate nanocarrier as a new approach for breast cancer treatment. Biology, 10(3): 173.
 - Bijari, B., Abbasi, A., Hemati, M. and Karabi, K., 2015. Nosocomial Infections and related factors in southern Khorasan hospitals. Iranian Journal of Medical Microbiology, 8(4): 69-73.
 - Esmaeili, A. and Niknam, S., 2014. Preparation of polyamide nanocapsules of *Elaeagnus angustifolia* L. delivery with in vivo studies. Industrial Crops and Products, 55: 49-55.
 - Esmaeili, A., Rahnamoun, S. and Sharifnia, F., 2013. Effect of O/W process parameters on *Crataegus azarolus* L. nanocapsule properties. Journal of Nanobiotechnology, 11: 16.
 - Ghaderi, R.S., Kazemi, M. and Soleimanpour, S., 2021. Nanoparticles are more successful competitor than antibiotics in treating bacterial infections: a review of the literature. Iranian Journal of Medical Microbiology, 15(1): 18-45.
 - Ghaznavi-Rad, E., Shamsudin, M., Sekawi, Z. and Vanbelkum, A., 2010. Multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Medical Microbiology, 59(10): 1135-1139.
 - Ghomi, Z., Tafvizi, F., Naseh, V. and Akbarzadeh, I., 2020. Effect of *Artemisia ciniformis* extract on expression of NorA efflux pump gene in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* by Real Time PCR. Iranian Journal of Medical Microbiology, 14(1): 55-69.
 - Ghorbani, S., Kargar, M., Doosti, A., Abbasi, P. and Sarshar, M., 2015. Molecular epidemiology of *ESBLs* Gens and multidrug resistance in diarrheagenic *E coli* strains isolated from adults in Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 14(4): 1257-1262.
 - Hashemi, N., Mojiri, M., Yazdani, P., Eskandari, S.H., Mohammadian, M. and Alavi, I., 2017. Prevalence of antibiotic resistance and blaMP-1 gene among *Pseudomonas aeruginosa* strain. Microbiology Research, 8(2): 59-63.
 - Islam, M., Jannat, T., Ruhul Kuddus, M.D., Rashid, M.A. and Haque, M.R., 2019. In vitro and in vivo evaluation of pharmacological potentials of *Campsis radicans* L. Clinical Phytoscience, 5: 42.
 - Jafari sales, A., Rasibonab, F. and Sayyahi, J., 2019. The survey on antimicrobial effects of methanolic

و ممانعت از تشکیل بیوفیلم در مقایسه با تیمار تکی عوامل ضد قارچی شد (Khodavandi *et al.*, 2018). نتایج این تحقیق با نتایج اثرهای سینرژیسیم در این تحقیق و اثرهای استفاده از داروی فلوکونازول در درمان عفونت کاندیدا همخوانی دارد. تفاوت در تأثیر عصاره‌های گیاهی بر سویه‌های مختلف اعم از باکتری و قارچ به عوامل مختلفی وابسته است که از آن میان می‌توان به منطقه جغرافیایی رویش، سن گیاه، روش اسانس‌گیری، نوع حلال مورد استفاده، غلظت عصاره و نوع محیط کشت اشاره کرد. به‌طور کلی ترکیب‌های گیاهی خاصیت ضد میکروبی خود را از طریق سازوکارهایی مانند تجزیه دیواره سلولی، افزایش اسیدیته سیتوزولی، آسیب به غشای سلولی، نشت محتویات سلول به خارج، اختلال در سازوکارهای حیاتی و متابولیسم باکتری اعمال می‌کنند (Ghomi *et al.*, 2020). حساسیت باکتری‌ها به ترکیب‌های نانو و انکپسوله فقط مرتبط به ساختار دیواره سلولی نیست و نیز میزان بیان ژن‌های مقاومت دارویی که تحت تأثیر ذرات نانو انکپسوله قرار می‌گیرند در سویه‌های مختلف متفاوت است (Sabahi *et al.*, 2020).

در این تحقیق، برای اولین بار گیاه *Campsis radicans* و اثر ضد میکروبی آن مطالعه شد. نتایج حاصل می‌تواند گامی مؤثر در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی باشد. با توجه به اثرهای مهاری اسانس این گیاه، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی ترکیب‌های این گیاه انجام تا اهمیت درمانی آن مشخص‌تر شود و بتواند در آینده با مطالعات درون‌تنی و برون‌تنی به‌عنوان یک مکمل دارویی امیدبخش به مراکز دارویی پیشنهاد گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله قدردانی خود را از کمک‌های فنی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال اعلام می‌دارند.

Reference

- Ahmadi Roudbaraki, Z., Ranji, N. and Soltani Tehrani, B., 2017. Deregulation of MexB gene in ciprofloxacin

- antibacterial effect of methanol and acetone extracts of *Urtica Dioica* and *Zataria Multiflora* against metallo beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Ilam University of Medical Sciences, 24(3): 70-78.
- Sabahi, M., Hamdi, S.M. and Mirzaei, A., 2020. Antibiofilm activity of synthesized silver nanoparticles using asphodelus dendroides extract against antibiotic resistant and biofilm forming *Klebsiella pneumoniae* clinical strains: a laboratory study. The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 18(12): 1233-1252.
 - Salehi, S., Sadat Shandiz, A., Ghanbar, F., Raouf Darvish, M., Shafiee Ardestani, M., Mirzaie, A. and Jafari, M., 2016. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. International Journal of Nanomedicine, 11: 1835-1846.
 - Sarkic, A. and Stappen, I., 2018. Essential oils and their single compounds in cosmetics-a critical review. Cosmetics, 5(1): 11.
 - Shamsi, F., Bagheri, A. and Mirzaei, A., 2021. Synthesis, physico-chemical properties and antibacterial activity of alginate nanogel encapsulated *Artemisia diffusa* extract. Journal of Developmental Biology, 12(4): 37-46.
 - Sharif, R. and Amini, K., 2019. Effect of iron oxide nanoparticles and probiotic bifidobacterium bifidum on mexA gene expression in drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Research in Medicine, 43(3): 118-123.
 - Sobiyana, P., Anburaj, G. and Manikandan, R., 2019. Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of *Tabebuia rosea* and *Tabebuia argentea*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(1): 2673-2677.
 - Wen, J. and Jansen, R.K., 1995. Morphological and molecular comparisons of *Campsis grandiflora* and *C. radicans* (Bignoniaceae), an eastern Asian and eastern North American vicariad species pair. Plant Systematics and Evolution, 196(3/4): 173-183.
 - Xu, Y., Sheng, F., Zhaho, J., Chen, L. and Li, C.H., 2015. *ERG11* Mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. Archives of Microbiology, 197(9): 1087-1093.
 - Yakhchi, V., Jahanizadeh, Sh., Yazdian, F., Rashedi, H. and Haghirsadat, B.F., 2020. Synthesis and evaluation of lipid-based nanoparticle containing ginger extract against *Aspergillus* species. Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 28(6): 2766-2780.
 - extract of *Carum copticum L.* on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in laboratory conditions. Paramedical Sciences and Military Health, 13(4): 19-25.
 - Khodavandi, A., Alizadeh, F. and Marashi, N., 2018. antibiofilm activity of fluconazole/terbinafine combination in *Candida albicans* HWP1 gene expression. Journal of Arak University Medical Sciences, 20(11): 22-33.
 - Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J.A. and Burt, S.A., 2014. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. Critical Reviews in Microbiology, 40(1): 76-94.
 - Larypoor, M. and Frsad, S., 2011. Evaluation of nosocomial infections in one of hospitals of Qom. Iranian Journal of Medical Microbiology, 5(3): 7-17.
 - Mahmoodi, S., Nowroozi, J. and Laripour, M., 2018. Prevalence of tir gene in *E. coli* Strain isolated from cold foods. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases and Tropical Medicine, 23(81) 29-34.
 - Mihani, F. and Khosravi, A., 2007. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR. Iranian Journal of Medical Microbiology, 1(1): 23-31.
 - Mirzaie, A., Noorbazargan, H., Khatami, H., Sadatshandiz, A., Rahimi, A. and Bagherikashtali, A., 2017. Evaluation of chemical composition of *Helichrysum artemisioides* Extract its effect on biofilm formation and IcaD gene expression in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ilam University of Medical Sciences, 25(1): 180-194.
 - Moghtaderi, M., Mirzaie, A., Zabet, N., Moammeri, A., Mansoori-Kermani, A., Akbarzadeh, I., Eshrati Yeganeh, F., Chitgarzadeh, A., Bagheri Kashtali, A. and Ren, Q., 2021. Enhanced antibacterial activity of *Echinacea angustifolia* extract against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* through niosome encapsulation. Nanomaterials, 11(6): 1573.
 - Panda, S.P., Panigrahy, U.P., Panda, S. and Jena, B.R., 2019. Stem extract of *Tabebuia chrysantha* induces apoptosis by targeting sEGFR in Ehrlich Ascites Carcinoma. Journal of Ethnopharmacology, 235: 219-226.
 - Ramtin, M., Massiha, A., Mahid Khoshkholgh-Pahlaviani, M.M., Issazadeh Khosro, M.R., Assmar, M. and Zarrab, S., 2014. In Vitro Antimicrobial Activity of *Iris pseudacorus* and *Urtica dioica*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 16(3): 35-39.
 - Roshani, M., Heidary, M., Goudarzi, H., Hashemi, A., Eslami, G. and Yousefi, N., 2016. Investigating the

Effects of nanocapsulated and free forms of guaiacol available in *Campsis radicans* (L.) Seemann essential oil on antibiotic resistance genes expression of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*

M. Ramtin¹, F. Sharifniya², M. Larypoor^{3*}, M. Mirpour⁴ and S. Zarrabi⁵

1- Ph.D. student in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3*- Corresponding author, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

4- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

5- Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Received: October 2021

Revised: April 2022

Accepted: April 2022

Abstract

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* are nosocomial pathogens that have made treatment difficult due to the antibiotic resistance. In the present study, the antimicrobial effect of *Campsis radicans* (L.) Seemann essential oil on Imipenem-resistant *P. aeruginosa* containing *IMP* gene, Cefixime-resistant *E. coli* containing *TEM* gene, and fluconazole-resistant *C. albicans* containing *ERG* gene was investigated. According to the results, all the strains were sensitive to the essential oil and the diameter of growth inhibition zone varied from 10 to 20 mm, with the highest sensitivity being observed in *C. albicans*. After identifying 32 compounds in the essential oil by GC/MS, guaiacol as its active ingredient was selected and nanocapsulated by two-phase emulsion method. The mean MIC was 268.7-537.5 and

67.18-268.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the free and encapsulated forms of the active ingredient, respectively which indicates that the encapsulated form is more effective than the free one. Study on the release of both forms within 72 hours showed that the release of encapsulated form was more targeted over a longer period of time which indicates its less toxicity. Then, the effectiveness of both active ingredient forms was evaluated on the antibiotic resistance genes and it was found that this reduction was more in *P. aeruginosa* and *C. albicans* than *E. coli*. In general, both free and encapsulated forms significantly reduced gene expression compared to the control gene 16s rRNA, which was more noticeable in the encapsulated form than the free one. Also, study on the synergistic effect of both forms showed that the combined use of each ingredient with its nanocapsules had a greater antimicrobial effect than the single use. The results of this study proved the antimicrobial effect of *C. radicans* essential oil and also showed that both forms of the active ingredient contained compounds to inhibit antibiotic resistance genes and therefore can be used as therapeutic supplements.

Keywords: Resistance genes, pathogen strains, release, encapsulated.