مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، آبان ۱۳۹۵، دوره ۷۴، شماره ۸، صفحه‌های ۵۸٤ تا ۵۹۰

مقاله اصیل

بررسی اثر عصاره آبی و الکلی سیر بر میزان بیان ژن‌های الاستاز و اگزوتوکسین A در *سودوموناس آئروژینوزا* سویه استاندارد PAO1

بتول کاویانی[1]، محمد یوسف علیخانی[1*]، محمدرضا عربستانی[1]
شیرین مرادخانی[2]
محمد طاهری[3]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
۲- گروه فارماگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: همدان، بلوار شهید فهمیده، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی
تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۷۵۵
E-mail: alikhani@umsha.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰٤/۲۱ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۸/۳۰

زمینه و هدف: امروزه باکتری‌های مقاوم به دارو مشکلات عمده‌ای را در زمینه طراحی و ساخت داروهای شیمیایی ایجاد کرده‌اند. از انواع باکتری‌های مقاوم به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌توان *سودوموناس آئروژینوزا* را نام برد که تاکنون مشکلات فراوانی را در زمینه درمان با انواع آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد کرده است، همچنین می‌توان آن را یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به حساب آورد. گیاهان دارویی هزاران سال است که به منظور پیشگیری و یا درمان بیماری‌های عفونی مورد توجه بوده‌اند. امروزه نیز داروسازان علاقه زیادی دارند که با استفاده از گیاهان دارویی ترکیبات ضدمیکروبی جدید تهیه کنند. از این‌رو هدف از این مطالعه میزان بیان ژن‌های کد کننده الاستاز و اگزوتوکسین A در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* سویه PAO1 در حضور گیاه دارویی سیر بود.

روش بررسی: مطالعه پیش رو که از انواع مطالعات تجربی بود، در سال ۹۵-۱۳۹٤ در دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام گرفت. در ابتدا کمترین غلظتی از عصاره که مهار کننده رشد باکتری و همچنین باعث مرگ باکتری می‌شود، تعیین و سپس در غلظت‌های پایین‌تر از کمترین غلظت کشندگی میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه با روش Real-Time PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، عصاره آبی سیر تاثیر بهتری بر کاهش میزان بیان ژن‌های الاستاز و اگزوتوکسین A داشته به طوری که در غلظت‌های ۸ و ٦٤ mg/ml، بیان هر دو ژن بیماری‌زا کاهش یافت. همچنین میزان بیان ژن الاستاز بیشتر تحت تاثیر گیاه سیر قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بیان‌کننده این بود که عصاره‌های آبی و الکلی سیر دارای ترکیبات مناسبی برای مهار تولید فاکتورهای بیماری‌زا در *سودوموناس آئروژینوزا* بودند.

کلمات کلیدی: سیر، الاستاز، اگزوتوکسین A، *سودوموناس آئروژینوزا*.

مقدمه

امروزه باکتری‌های مقاوم به دارو مشکلات عمده‌ای را در زمینه طراحی و ساخت داروهای شیمیایی ایجاد کرده‌اند. این باکتری‌ها به سرعت به انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند، در نتیجه روند درمان عفونت‌های حاصله از این باکتری‌ها با مشکل مواجه شده است.[1و2] از انواع باکتری‌های مقاوم به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌توان باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را نام برد که تاکنون مشکلات فراوانی را در درمان با انواع آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد کرده است. این باکتری یک باکتری میله‌ای، گرم منفی و هوازی است و در همه محیط‌ها از جمله محیط‌های بیمارستانی یافت می‌شوند، همچنین به دلیل قدرت سازگارپذیری بالا توانایی رشد بر روی اکثر سطوح مانند مواد غذایی،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-20]

وسایلی مانند کاتتر، لوله‌های تراکئوستومی، محیط‌هایی با کمترین میزان موادمغذی مانند آب مقطر و حتی محلول‌های دزانفکتانت را دارد.[۱و۳] پس با توجه به موارد گفته شده می‌توان گفت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از دلایل اصلی عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه در افراد دچار نقص سیستم ایمنی و سوختگی‌های شدید، به حساب آمده و قدرت این را دارد که در تمامی بافت‌های بدن ایجاد عفونت نماید، به نوعی این باکتری مسئول عفونت‌های درمان‌ناپذیر است.[۴] بنابراین در سال‌های اخیر، استفاده از روش‌های دیگر درمانی از جمله گیاهان دارویی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی جدید به جای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است.[۵] سیر از جمله این گیاهانی به حساب می‌آید که حدود ۳۰۰۰ سال است در انواع درمان‌های پزشکی به شکل سنتی استفاده می‌گردد و خاصیت آنتی‌بیوتیکی، ضدقارچی و ضدباکتریایی خود را به اثبات رسانده است.[۶] الاستاز یکی از فاکتورهای بیماری‌زای باکتری به شمار می‌رود که با از بین بردن اتصالات محکم اپی‌تلیوم بافت، باعث افزایش نفوذپذیری آن، فراخوانی بیشتر نوتروفیل‌ها، سایتوکین‌ها و کموکاین‌ها (IL-8 و IL-6) در محل، به راه‌اندازی واکنش‌های التهابی و در نهایت ایجاد عفونت می‌گردد.[۷] همچنین، الاستاز می‌تواند باعث افزایش نفوذپذیری در فیبروبلاست بافت پارانشیم ریه گردد، چنین پاسخ‌هایی در بافت‌هایی مانند ریه می‌تواند باعث جراحت‌های حاد در این بافت شود.[۸و۹]

اگزوتوکسین A نیز یکی از مهمترین توکسین‌های باکتری است و توسط اکثر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تولید می‌شود و نقش اصلی را در بیماری‌زایی آن ایفا می‌کند. این ترکیب از طریق سیستم ترشحی تیپ II به فضای خارج سلولی ترشح می‌گردد و تولید فاکتور طویل‌سازی پروتیین (EF-2) را مهار می‌کند در نتیجه پروتیین‌سازی سلول متوقف شده و منجر به مرگ سلولی می‌گردد.[۱۰]

هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان بیان ژن‌های کد کننده فاکتورهای ویرولانس الاستاز و اگزوتوکسین A در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* سویه PAO1 در حضور گیاه سیر بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات پایه‌ای (Experimental) بود که به منظور بررسی اثر خاصیت آنتی‌باکتریال گیاه سیر بر میزان بیان فاکتورهای ویرولانس باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در سال ۹۵-۱۳۹۴ در دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام گرفت. در این مطالعه از سویه استاندارد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ATCC (27853) استفاده شد که از بانک میکروبی واقع در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه گردید. باکتری بر روی محیط‌های کشت Muller Hinton Agar (MHA) & Muller Hinton Broth (MHB) (Merck, Darmstadt, Germany) کشت داده شد و در دمای ۳۷ °C به مدت یک شبانه روز انکوبه گردید و جهت ارزیابی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

گیاه تازه سیر از بازار محلی واقع در مرکز شهر همدان خریداری شد. عصاره‌های آبی و الکلی سیر در آزمایشگاه داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه گردیدند. عصاره‌گیری به طور خلاصه به این صورت انجام شد که، در ابتدا ۱۲۵ g از سیر تازه له شده با ۲ lit حلال (آب مقطر استریل برای عصاره آبی و متانول ۷۰ درجه برای عصاره الکلی) به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن برای جداسازی ناخالصی‌های حاصل از گیاه له شده محلول به‌دست آمده با استفاده از فیلترهای Whatman filter paper, pore size 0.1 µm (Whatman plc, Maidstone, UK) فیلتر شد و به منظور خالص‌سازی عصاره، حلال اضافی آن با کمک دستگاه Rotary Evaporator, Laborota 4003 (Heidolph GmbH, Schwabach, Germany) گرفته شد. لازم به یادآوری است، برای حل شدن عصاره آبی از آب و برای حل کردن عصاره الکلی، از ۴۰٪ Dimethyl sulfoxide (DMSO) به‌عنوان حلال استفاده گردید.

به منظور بررسی خواص آنتی‌باکتریال عصاره آبی و الکلی سیر بر پایه روش میکرودایلوشن عمل شد. در این روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) عصاره تعیین شد. این مرحله بر اساس روش Nuriyastushi و همکاران البته با کمی تغییر انجام گرفت.[۱۱] برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی یک کلنی از کشت ۲۴ ساعته از باکتری در محیط MHA برداشته و به محیط MHB اضافه کردیم، پس از آن میزان جذب نوری سوسپانسیون تهیه شده، در طول موج ۶۲۵ nm معادل غلظت نیم مک فارلند (0.08-0.10

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-20]

(cells/ml) تنظیم گردید. سپس سوسپانسیون تهیه شده معادل غلظت نیم مک فارلند در ابتدا تا حدود ۱:۲۰ و سپس ۱:۱۰ رقیق گردید. در نهایت از سوسپانسیونی با رقت ۱:۱۰ (5×105cells/ml) به هر یک از چاهک‌های پلیت میکروتیتر به میزان µl ۱۰۰ اضافه شد. به منظور تهیه عصاره، میزان mg ۲۵۶ از پودر عصاره سیر را در ml ۱ آب مقطر استریل حل و به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی محلول حاصله از فیلترهای ۰/۲ عبور داده شد.

در نهایت، µl ۱۰۰ از محیط MHB به تمامی چاهک‌های پلیت میکروتیتر اضافه شد. µl ۱۰۰ نیز از محلول mg/ml ۲۵۶ عصاره به اولین چاهک اضافه و مخلوط گردید. µl ۱۰۰ از مخلوط چاهک اول را برداشته و به چاهک دوم اضافه شد، این عمل تا چاهک ۱۰ ادامه یافت، پس از آن µl ۱۰۰ سوسپانسیون با رقت ۱:۱۰ به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید.

چاهک‌های ۱۱ و ۱۲ نیز به‌عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. چاهک ۱۱ فقط حاوی محیط کشت و چاهک ۱۲ فقط حاوی سوسپانسیون باکتری بود. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ انکوبه گردید. روز بعد تمامی چاهک‌ها را بر روی محیط کشت MHA کشت داده و MBC و MIC را تعیین شدند. برای اطمینان بیشتر، تمامی آزمایشات سه مرتبه تکرار شدند.

استخراج RNA از غلظت‌های کمتر از MBC با استفاده از کیت مخصوص استخراج RNA، Cinnapure RNA extraction (SinaClon BioScience Co., Tehran, Iran) و سپس غلظت و میزان جذب نوری تمامی RNA های استخراج شده با کمک دستگاه Epoch™ Microplate Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)، اندازه‌گیری شد.

به منظور ساخت cDNA از RNA استخراج شده از کیت مخصوص سنتز cDNA (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea) استفاده و مطابق با آن عمل شد. برای حذف آلودگی‌های احتمالی RNA استخراج شده با DNA ژنومی، پیش از سنتز cDNA، از کیت DNaseI (Fermentase, Waltham, USA) استفاده گردید و مراحل بر اساس کاردستور شرکت سازنده صورت پذیرفت.

آزمون Real-time PCR با روش SYBR Green و بر اساس کاردستور شرکت AMPLIQON، انجام گرفت. جهت انجام آزمون qPCR از دستگاه Step-One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه به‌ترتیب زیر می‌باشند:

پرایمر مربوط به ژن الاستاز (lasB)[۱۲]: F: 5'-AATGACAAAGTGGAACTGGTGATCC-3' و R: 5'-GTAGGTGTACTTGCCGATCTTCTGG-3'.

پرایمر مربوط به ژن اگزوتوکسین A (toxA): F: 5'-GGTAGTTGGTCGCTGAAC-3' و R: 5′-CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA-3'.

پرایمر مربوط به ژن رفرانس (rpoD)[۱۳]: F: 5′-GGGCGAAGAAGGAAATGGTC-3′ و R: 5′-CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA-3′ می‌باشد. پرایمر مربوط به ژن toxA با استفاده از نرم افزار AlleleID® software, Version 7.0 (PREMIER Biosoft, Palo Alto, CA, USA) در این مطالعه طراحی شد.

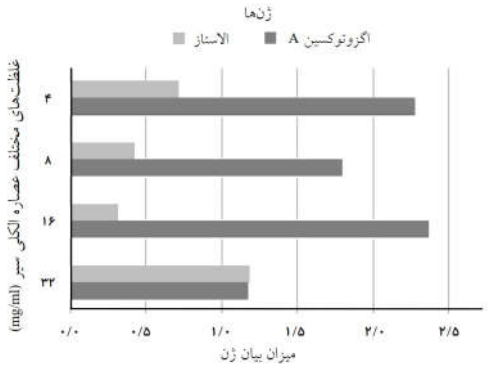
برنامه دمایی برای انجام آزمون qPCR در ادامه آورده شده است: دمای دناتوراسیون اولیه: ۹۵ $^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه، دمای دناتوراسیون ثانویه: ۹۵ $^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای اتصال ۶۲ $^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه. این آزمون در ۴۵ چرخه تکرار شد. در نهایت درستی محصولات تکثیر شده طی واکنش qPCR با استفاده از تعیین توالی (Bioneer, Daejon, Korea) و منحنی‌های ذوب تایید شدند. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد.

آنالیز داده‌ها با کمک REST 2008, Version 2.0.13 (Technical University of Munich, Germany) انجام گرفت. اساس مدل ریاضی این نرم‌افزار بر بازده PCR و میانگین انحراف سیکل آستانه (CT) بین گروه‌های نمونه و گروه کنترل استوار بوده است و به کمک آزمون تصادفی‌سازی میزان بیان بین نمونه‌ها و گروه کنترل تعیین گردید.[۱۴]

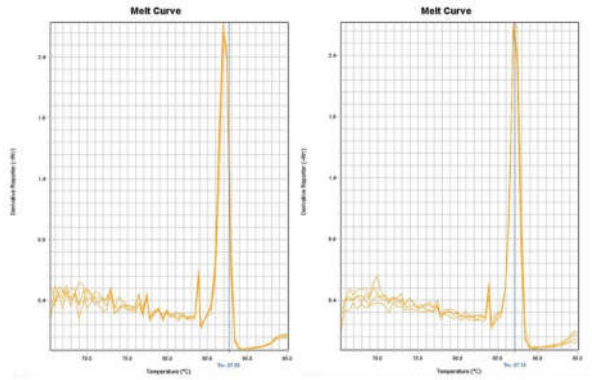
یافته‌ها

میزان حساسیت باکتری *P. aeruginosa* PAO1 نسبت به عصاره‌های آبی و الکلی سیر به صورت کمی و با کمک روش MIC و MBC تعیین شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده کمترین غلظتی از عصاره آبی و الکلی سیر که باعث مهار رشد باکتری شد، به ترتیب غلظتی برابر با ۳۲ و mg/ml ۶۴ و کمترین غلظتی که باعث مرگ

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-20]

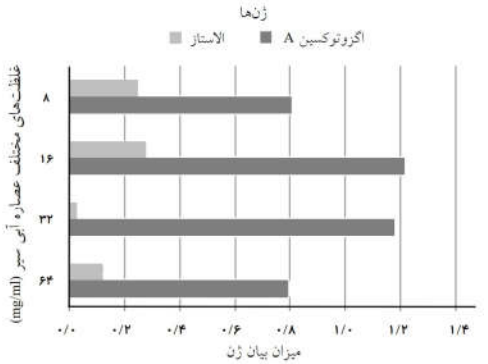


نمودار ۱: میزان بیان ژن اگزوتوکسین A و ژن الاستاز در حضور غلظت‌های مختلف عصاره الکلی سیر

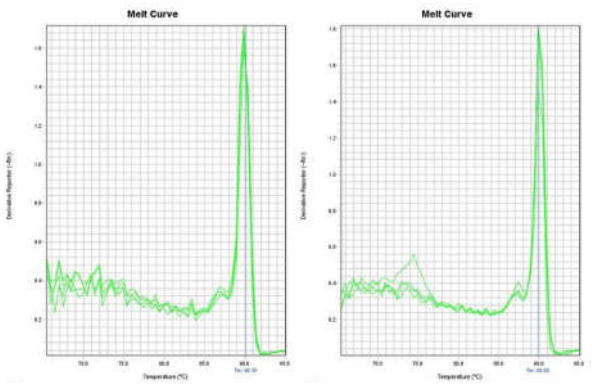


الف ب

نمودار ۳: منحنی ذوب ژن اگزوتوکسین A، الف: عصاره آبی- ب: عصاره الکلی



نمودار ۲: میزان بیان ژن اگزوتوکسین A و ژن الاستاز در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آبی سیر



الف ب

نمودار ٤: منحنی ذوب ژن الاستاز، الف: عصاره آبی- ب: عصاره الکلی

باکتری به وسیله عصاره آبی و الکلی سیر گردید، به ترتیب غلظتی برابر با ٦٤ و ١٢٨ mg/ml بوده است.

میزان بیان ژن اگزوتوکسین A در غلظت‌های مختلف عصاره الکلی سیر، در مقایسه با نمونه کنترل (سویه مجاور نشده با عصاره)، در تمامی غلظت‌ها به غیر از غلظت ٦٤ mg/ml، معنادار بوده و در این غلظت‌ها میزان بیان ژن افزایش یافته است، ولی در غلظت ۳۲ mg/ml عصاره الکلی سیر میزان بیان نمونه‌ها در مقایسه با نمونه کنترل تفاوت چندانی نداشته و به عبارتی معنادار نبوده است. میزان بیان ژن اگزوتوکسین A در غلظت‌های ۸ و ١٦ mg/ml عصاره آبی سیر، در مقایسه با نمونه کنترل، تفاوت معناداری نداشت ولی در غلظت‌های ۳۲ و ٦٤ mg/ml نتایج معنادار و به‌ترتیب به‌صورت افزایش و کاهش بیان ژن مشاهده شد (نمودار ۱ و ۳).

میزان بیان ژن الاستاز در غلظت ۳۲ mg/ml عصاره الکلی سیر، در مقایسه با نمونه کنترل، معنادار و به‌صورت کاهش بیان ژن مشاهده

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-20]

شد، در حالی که در سایر غلظت‌ها نتایج نمونه‌ها، در مقایسه با نمونه کنترل، تفاوت چندانی نداشته و معنادار نبوده است. میزان بیان ژن الاستاز در غلظت‌های ۸، ۳۲ و ٦٤ mg/ml عصاره آبی سیر، در مقایسه با نمونه کنترل، معنادار و به‌صورت کاهش بیان ژن ولی در غلظت ١٦ mg/ml، میزان بیان ژن تفاوتی با نمونه کنترل نداشت و به عبارتی نتیجه معناداری به‌دست نیامد (نمودار ۲ و ٤).

بحث

با توجه به گسترش روز افزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماری‌زا به نظر می‌رسد امیدبخش‌ترین راهکار برای درمان عفونت‌های حاصله از این باکتری‌ها روی آوردن به مواد طبیعی از جمله گیاهان است. تاکنون مطالعات بسیاری در این زمینه و بر روی باکتری‌هایی مانند: *E.coli*، *P. aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *Helicobacter pylori* و بسیاری دیگر صورت گرفته و این موضوع به اثبات رسیده است که گیاهان دارویی از جمله دارچین، چای سبز، میخک، مرزه خوزستانی و بسیاری دیگر با ایجاد تغییرات در دیواره سلولی باکتری‌ها باعث مهار رشد آن‌ها می‌شوند.[۱۵-۲٤]

طی دو دهه گذشته مطالعات بسیاری بر روی این ماده به‌صورت In-vitro انجام شده است و همگی بیان‌کننده این مطلب هستند که آلیسین گزینه مناسبی برای درمان‌های ضدمیکروبی می‌باشد و می‌تواند بر طیف وسیعی از باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی و قارچ‌ها اثرگذار باشد،[۲۵و۲٦] ولی با این وجود هنوز مطالعات به‌صورت In-vivo و گسترده در بالین انجام نشده است.[۲۷] مطالعاتی توسط Bjarnshlot و همکارانش بر روی عصاره سیر و تاثیر آن بر روی حیوانات آزمایشگاهی آلوده به عفونت‌های ریوی سودوموناسی انجام گرفت، نتایج حاصل از این مطالعه به این صورت بود که موش‌هایی که به مدت هفت روز با عصاره سیر در تماس بودند کمتر به عفونت دچار شدند، یعنی سیر به‌نوعی خاصیت پیشگیری کننده داشته است، همچنین موش‌های آلوده به عفونت‌های ریوی در اثر درمان با این گیاه به سرعت بهبود یافتند.[٤و۲۸] مطالعه انجام گرفته توسط Zhai و همکارانش، تاثیر سینرژیسم آلیسین و آنتی‌بیوتیک نووبیوسین در مهار تشکیل بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* را گزارش کردند. آنتی‌بیوتیک نووبیوسین به تنهایی تاثیر کمی در از بین بردن باکتری‌های موجود در محیط بیوفیلمی دارد از این رو مصرف آن همراه با آلیسین می‌تواند در از بین بردن هرچه بیشتر این جامعه میکروبی تاثیر به‌سزایی داشته باشد.[۲۹] در مطالعه‌ای که توسط Harjai و همکارانش صورت گرفت مشخص شد، ماده موثر گیاه سیر (آلیسین) می‌تواند با کاهش قدرت کسب آهن، کاهش تولید همولیزین توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و حساس شدن آن به همولیزین سلول میزبان باعث کاهش و همچنین مهار عفونت شود.[۲۵] در مطالعه انجام گرفته توسط Cai و همکارانش گزارش شد، آلیسین به تنهایی اثر کمی بر علیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* دارد (MCI ۹۰>۵۱۲ µg/ml) ولی ترکیب این ماده با آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل بتالاکتام‌ها می‌تواند باعث تاثیر بیشتر بر مهار سنتز دیواره سلولی باکتری شود، در حالی که این باکتری به بتالاکتام‌ها به تنهایی مقاوم می‌باشد.[۲٦]

در مطالعه صورت گرفته توسط Lihua و همکارانش، مشخص شد، ترکیب آلیسین می‌تواند در غلظت ۱۲۸ µg/ml باعث کاهش بیان ژن کد کننده فاکتورهای بیماری‌زای الاستاز و اگزوتوکسین A در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* گردد، همچنین، از تولید ترکیباتی مانند پیووردین که در جذب آهن توسط باکتری و رامنولیپید که در گسترش بیوفیلم نقش دارد، جلوگیری می‌کند در نتیجه آلیسین با مهار تولید بیوفیلم که نقش موثری در بیماری‌زایی این باکتری دارد، می‌تواند گزینه مناسبی در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری باشد.[۳۰] نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نیز مطابق با مطالعات ذکر شده، عصاره آبی و الکلی سیر بدون اینکه بر روی رشد باکتری اثرگذار باشد قادر هستند بیان فاکتورهای ویرولانس باکتری را کاهش داده و از قدرت بیماری‌زایی آن بکاهد. این موضوع نشان‌گر این است که در آینده احتمال مقاومت باکتری نسبت به این ترکیب پایین خواهد بود.

در مجموع، بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که گیاه سیر دارای ترکیبات مناسبی برای مهار تولید فاکتورهای بیماری‌زا در *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد.

سپاسگزاری: این تحقیق قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با شماره ۹۳۰٤۱۷۱۹٦۰ بوده و با پشتیبانی گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی و معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام پذیرفت.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-20]

References

1. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, et al. Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 2002;148(Pt 1):87-102.
2. Safari M, Mozaffari Nejad AS, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in Acinetobacter baumannii strains isolated from patients of intensive care units (ICU). *Saudi J Biol Sci* 2015;22(4):424-9.
3. Njoroge J, Sperandio V. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO Mol Med* 2009;1(4):201-10.
4. Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;362(1483):1213-22.
5. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* 2006;152(Pt 4):895-904.
6. Omar SH, Al-Wabel NA. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharm J* 2010;18(1):51-8.
7. Guzzo J, Pages JM, Duong F, Lazdunski A, Murgier M. Pseudomonas aeruginosa alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* 1991;173(17):5290-7.
8. Azghani AO, Neal K, Idell S, Amaro R, Baker JW, Omri A, et al. Mechanism of fibroblast inflammatory responses to Pseudomonas aeruginosa elastase. *Microbiology* 2014;160(Pt 3):547-55.
9. Kon Y, Tsukada H, Hasegawa T, Igarashi K, Wada K, Suzuki E, et al. The role of Pseudomonas aeruginosa elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;25(3):313-21.
10. Pavlovskis OR, Iglewski BH, Pollack M. Mechanism of action of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A in experimental mouse infections: adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect Immun* 1978;19(1):29-33.
11. Nuryastuti T, van der Mei HC, Busscher HJ, Iravati S, Aman AT, Krom BP. Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(21):6850-5.
12. Vandeputte OM, Kiendrebeogo M, Rajaonson S, Diallo B, Mol A, El Jaziri M, et al. Identification of catechin as one of the flavonoids from Combretum albiflorum bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(1):243-53.
13. Schwartz T, Walter S, Marten SM, Kirschhöfer F, Nusser M, Obst U. Use of quantitative real-time RT-PCR to analyse the expression of some quorum-sensing regulated genes in Pseudomonas aeruginosa. *Anal Bioanal Chem* 2007;387(2):513-21.
14. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(9):e36.
15. Kim YG, Lee JH, Kim S Il, Baek KH, Lee J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int J Food Microbiol* 2015;195:30-9.
16. Aparna Y, Narayanan L, Sarada J. Quorum quenching ability of dietary spice Cinnamomum verum on pathogenic bacteria. *Int J Pharm Sci Res* 2014;5(12):5216.
17. Vasantha Packiavathy IAS, Agilandeswari P, Musthafa KS, Karutha Pandian S, Veera Ravi A. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of Cuminum cyminum and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Res Int* 2012;45(1):85-92.
18. Muhammad JS, Zaidi SF, Shaharyar S, Refaat A, Usmanghani K, Saiki I, et al. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde in Helicobacter pylori induced gastric inflammation. *Biol Pharm Bull* 2015;38(1):109-15.
19. Kalia M, Yadav VK, Singh PK, Sharma D, Pandey H, Narvi SS, et al. Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. *PLoS One* 2015;10(8):1-18.
20. Liu X, Li J, Wang Y, Li T, Zhao J, Zhang C. Green tea polyphenols function as prooxidants to inhibit Pseudomonas aeruginosa and induce the expression of oxidative stress-related genes. *Folia Microbiol* 2013;58(3):211-7.
21. Husain FM, Ahmad I, Asif M, Tahseen Q. Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of Pseudomonas aeruginosa and Aeromonas hydrophila. *J Biosci* 2013;38(5):835-44.
22. Bahador A, Saghii H, Ataee R, Esmaeili D. The study of inhibition effects Satureja khuzestaniea essence against gene expression bap acinetobacter baumannii with real time PCR technique. *Iran J Med* 2015;9(1):42–9.
23. Silva NCC, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2010;16(3):402-13.
24. Zhang Y, Liu X, Wang Y, Jiang P, Quek S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Food Control* 2015;59:282-9.
25. Harjai K, Kumar R, Singh S. Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;58(2):161-8.
26. Cai Y, Wang R, Pei F, Liang B-B. Antibacterial activity of allicin alone and in combination with beta-lactams against Staphylococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa. *J Antibiot* 2007;60(5):335-8.
27. Marchese A, Barbieri R, Sanches-Silva A, Daglia M, Nabavi SF, Jafari NJ, et al. Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. *Trends Food Sci Technol* 2016;52:49-56.
28. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infections. *Microbiology* 2005;151(12):3873-80.
29. Zhai H, Pan J, Pang E, Bai B. Lavage with allicin in combination with vancomycin inhibits biofilm formation by Staphylococcus epidermidis in a rabbit model of prosthetic joint infection. *PLoS One* 2014;9(7).
30. Lihua L, Jianhui W, Jialin Y, Yayin L, Guanxin L. Effects of allicin on the formation of Pseudomonas aeruginosa biofilm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors. *Polish J Microbiol* 2013;62(3):243-51.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-20]

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2016; Vol. 74, No. 8: 584-590 Original Article

The effect of garlic extract on the expression of genes elastase and exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa*

Batoul Kavyani M.Sc.[1]
Mohammad Yousef Alikhani Ph.D.[1*]
Mohammad Reza Arabestani Ph.D.[1]
Shirin Moradkhani Ph.D.[2]
Mohammad Taheri M.Sc.[3]

1- Department of Microbiology, Medical School, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
2- Department of Pharmacognosy, Pharmacy School, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
3- Department of Medical Genetics, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Shahid Fahmide Blvd., Hamadan, Iran.
Tel: +98- 81- 38380755
E-mail: alikhani@umsha.ac.ir

Abstract

Received: 11 Jul. 2016 Revised: 13 Nov. 2016 Accepted: 19 Nov. 2016 Available online: 20 Nov. 2016

Background: Multidrug-resistant bacteria make many problems in clinical therapy, design and manufacture of synthetic drugs. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important multidrug-resistance bacteria leads to variety infections in human especially in immunocompromised, patients with severe burns, and nosocomial infections. It Recent years, this organism makes a big challenge in clinical treatment of infections using a wide range of antibiotics. Medicinal herbs for thousands of years to prevent or treat infectious diseases were considered. Today, pharmacists have high interest of using medicinal herbs to prepare a new antimicrobial compounds. The goal of this study was to investigation the effect of aqueous and alcoholic extract of fresh garlic on the expression of genes encoding elastase and exotoxin A virulence factors, in *P. aeruginosa* PAO1 strain.

Methods: Present study was an experimental study and performed from 2015 to 2016 in Hamadan University of Medical Science, Iran. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of aqueous and alcoholic extract of garlic was determined. Then in order to investigation the gene expression of elastase and exotoxin A genes, quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) method was performed at sub-MBC concentrations.

Results: According to the results aqueous extracts of garlic had better impact in comparison with alcoholic alone. At concentration of 64 and 8 mg/ml of aqueous extract the expression of both elastase and exotoxin A genes were decreased. Although, the expression of elastase gene was most affected by garlic at different concentrations than exotoxin A.

Conclusion: The results suggested that the compositions of garlic extracts can inhibit the production of virulence factors in *P. aeruginosa*. So in order to treat infectious diseases in the near future, medicinal plants known as new antimicrobial drugs can be used alone or with antibiotic drugs against pathogenic bacteria.

Keywords: elastase, exotoxins, garlic, pseudomonas aeruginosa.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-20]