



Original Article

## Evaluation of the Antimicrobial Activity of Thyme Extract and its Effect on the Expression of MexXY-OprM efflux Pump against Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*

Shokufeh Hamidnia<sup>1</sup>, Atousa Vaziri<sup>2\*</sup>, Fouzieh Moghadami<sup>3</sup>, Maryam Sadrnia<sup>2\*</sup>

1. Master of Science, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

\* **Corresponding author:** Maryam Sadrnia & Atousa Vaziri, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. Email: msadrnia@pnu.ac.ir & a\_vaziri@pnu.ac

DOI: [10.22034/cmja.15.4.333](https://doi.org/10.22034/cmja.15.4.333)

### How to Cite this Article:

Hamidnia Sh, Vaziri A, Moghadami F, Sadrnia M. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Thyme Extract and its Effect on the Expression of MexXY-OprM efflux Pump against Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* *Complement MedJ.* 2025;15(4): 333-344. DOI: 10.22034/cmja.15.4.333

Received: 23 February 2026

Accepted: 25 April 2026

### Keywords:

Efflux pump  
MexXY-OprM  
qRT PCR  
Thyme extract

© 2025 Arak University of Medical Sciences

### Abstract

**Introduction:** The emergence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* requires alternative therapeutic approaches. This study aimed to investigate the effect of Thyme extract on the expression of the MexXY-OprM efflux pump of this bacterium.

**Methods:** Different concentrations of thyme extract ethanolic solvent were prepared, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum Bactericidal concentration were investigated on clinical strains of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* by microdilution method. Expression of *mexX* gene was evaluated by comparison with standard strain. The purity and concentration of extracted RNA were determined, and cDNA was synthesized with the relevant kit. qRT PCR process was performed with specific primers. Isolates exposed to the extract were grown at a concentration lower than the MIC, and gene expression was examined in presence and absence of the extract.

**Results:** The MIC values were obtained at 250 and 125 for 7 and 3 isolates, respectively. The MBC results were 125 and 25/31mg/ml. The changes in the *mexX* gene expression in bacteria were evaluated based on their relative comparison with the standard *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and together. Of 10 isolates, 6 samples showed a significant decrease in their *mexX* gene expression ( $P < 0.05$ ). Sample S2 showed an increase in expression. A significant decrease ( $P < 0.05$ ) was indicated in the *mexX* expression in 6 isolates with multiple resistance, suggesting that thyme extract reduce the activity of efflux pump. Furthermore, 3 samples had a decrease; however, the level of the *mexX* expression reduction was not significant.

**Conclusion:** These findings suggest the use of Thyme extract as an adjunctive therapy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, especially targeting efflux pumps. Further research is needed to optimize its formulation.

## INTRODUCTION

Given the limited availability of effective antibiotics, especially in resource-constrained healthcare systems, such as Iran, the need for alternative antimicrobial strategies is urgent. The investigation of the natural plant compounds, such as common thyme has great potential in this field. Thyme has been traditionally used in the Iranian medicine for centuries, and its known antimicrobial properties make it a promising candidate for combating resistant bacterial infections. Furthermore, relying on locally available plants, such as thyme can reduce the need for expensive imported antibiotics and make treatment more accessible. The present study was defined due to the priority of studies in the field of increasing antibiotic resistance.

## METHODS

This applied study utilized an experimental laboratory method. In this study, thyme plant was first prepared, and thyme extract was extracted by maceration and ethanol solvent method. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from medical centers with multidrug resistance were re-cultured in the laboratory. Different concentrations of thyme extract were prepared, and the minimum inhibitory concentration and minimum lethal concentration of thyme extract on the isolates were examined using the microdilution method. To examine gene expression, the samples were cultured in liquid culture and then extracted using an *RNA* extraction kit. After examining the purity and concentration of the extracted *RNA*, cDNA was synthesized with its own synthesis kit. Then, at this stage, the Real-Time PCR process was performed with its special master and the specific *mexX* primer with the relevant program in the Real-Time PCR device. The results were examined using PRISM software. In the next stage, the bacteria exposed to the extract were grown at a concentration below the minimum inhibitory concentration (MIC), and *RNA* was extracted again and gene expression was examined this time in the presence of the extract. Finally, the expression level in the presence and absence of the extract was compared.

## RESULTS

The strains studied had multiple resistance, which is why the isolates prepared in the laboratory were examined and confirmed. For this purpose, an antibiogram test was performed. The antibiotic disks of cefepime, aztreonam, norfloxacin, levofloxacin,

ceftriaxone, and amikacin were used. Only one of the antibiotics, aztreonam, showed a growth inhibition zone, indicating its sensitivity. The others did not show a zone due to resistance.

Since the aim of the study was to determine the effect of the extract on strains with multiple resistance, these isolates were selected. However, the sensitive strain was also selected to determine the effect of the extract on clinical isolates. The results of the experiment showed that antibiotic-sensitive strains (i.e., non-multiple-resistant) did not differ significantly in terms of resistance to thyme, compared to multi-resistant strains. All isolates were resistant to concentrations of 50% and 25%; however, out of 20 samples, 2 samples showed a 100% growth inhibition zone around the disk (they were sensitive). The sensitive isolate showed growth inhibition zones around both 50% and 100% of the disks; however, no growth inhibition zone was observed around the 25% disk. The isolates were sensitive to ampicillin as a control.

Changes in the expression of the *mexX* gene in bacteria were evaluated based on their relative comparison with the standard strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and together. Out of 10 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria with a multi-resistant phenotype, 6 samples showed a significant decrease in their *mexX* gene expression ( $P < 0.05$ ). Three samples showed a decrease; however, the level of the *mexX* expression was not significant. Sample S2 showed an increase in the expression, although it was not significant.

## DISCUSSION

This study aimed to investigate the effect of thyme extract on the expression of the *mexX* gene, part of the *mexXY* efflux pump system, in *Pseudomonas aeruginosa*. Since the clinical isolates studied were multidrug resistant, the possibility of the pump being active and expressed in them was considered very high. In the first stage, the submitted isolates were cultured on a specific culture medium of cetrinide agar for purification. The growth of bacteria that turned the medium green and had fluorescent pigments was considered as the confirmation of the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, the antibiotic resistance of these isolates was also evaluated. The MIC of thyme extract was determined for each isolate, and the bacteria were cultured in the presence of this extract. After *RNA* extraction, Real-Time PCR was performed to examine the expression of the *mexX* gene under two different conditions: once in isolates grown without the extract and again in isolates grown in the presence of the extract.

Comparison of the results showed that in some isolates, the expression of the *mexX* gene was significantly reduced in the presence of thyme extract.

#### CONCLUSION

This study showed that thyme extract has concentration-dependent antimicrobial activities against *Pseudomonas aeruginosa* with multidrug resistance to antibiotics. The significant reduction in the expression of the *mexX* gene in 6 out of 10 isolates indicates its potential as a therapeutic agent. However, the change in the regulation of efflux pump and the need for higher requirements of thyme extract require further research to optimize its formulation and use in current combination therapies. Future studies should focus on elucidating the exact mechanisms of action of thyme extract, from its effect on efflux pumps and other cellular targets, to resistance strategies to combat antibiotic resistance.

Overall, the study conducted showed that thyme extract has good potential as an antimicrobial agent against *Pseudomonas aeruginosa*. The fact that thyme extract can

reduce *mexX* expression in most isolates is very promising, as it suggests that thyme extract may re-sensitize resistant bacteria to antibiotics. However, the differences in the response of different isolates to gene expression and the need for high concentrations of thyme extract make its use as a stand-alone treatment problematic. It can be said that thyme extract is a promising candidate for further research. Its ability to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* and reduce the expression of efflux pumps in many strains makes it a valuable tool in the fight against antibiotic resistance. With further studies, it may be possible to fully characterize its properties and provide new and effective treatments for infections caused by this pathogen.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Payame-Noor University and colleagues involved in the implementation of the project.

#### Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this manuscript.



## ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره آویشن و تأثیر آن بر بیان پمپ افلاکس MexXY-OprM در جدایه‌های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا

شکوفه حمیدنیا<sup>۱</sup>، آتوسا وزیری<sup>۲\*</sup>، فوزیه مقدم<sup>۳</sup>، مریم صدرنیا<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: مریم صدرنیا و آتوسا وزیری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. ایمیل: [msadrnia@pnu.ac.ir](mailto:msadrnia@pnu.ac.ir) & [a\\_vaziri@pnu.ac](mailto:a_vaziri@pnu.ac)

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۵

واژگان کلیدی:

آویشن

سودوموناس آئروژینوزا

پمپ افلاکس

حداقل غلظت مهارکنندگی

بیان ژن

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه

علوم پزشکی اراک محفوظ است.

**مقدمه:** با توجه به افزایش نگران‌کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا و نقش حیاتی پمپ‌های افلاکس در این مقاومت، جست‌وجوی عوامل ضد میکروبی جدید و مهارکننده این پمپ‌ها ضروری است. این مطالعه با هدف تعیین تأثیر عصاره آویشن بر بیان پمپ خروجی MexXY-OprM این باکتری انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** فعالیت ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی آویشن روی سویه‌های استاندارد و بالینی *P. aeruginosa* با مقاومت دارویی چندگانه با روش رقت‌سازی براث میکروداپلوشن برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کش (MBC) ارزیابی شد. اثر باکتری کشی با نسبت MBC/MIC تعیین شد. تغییرات بیان ژن *mexX* در باکتری‌ها براساس مقایسه نسبی آنها با سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا و با هم با استفاده از روش Real-time RT-PCR سنجیده شد. سپس باکتری را در معرض عصاره با غلظت کمتر از MIC رشد دادیم و مجدد بیان ژن، این بار در حضور عصاره، را بررسی و میزان بیان ژن در حضور و عدم حضور عصاره را مقایسه کردیم. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری مناسب تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** نتایج MIC برای اکثر سویه‌ها در محدوده ۱۲۵ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج MBC در حدود ۱۲۵ تعیین شد. تغییرات بیان ژن *mexX* در باکتری‌ها براساس مقایسه نسبی آنها با سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PAO1 اثبات شد. اغلب نمونه‌ها به‌طور معناداری کاهش در بیان ژن *mexX* را نشان دادند ( $P < 0.05$ ). سه نمونه کاهش در بیان *mexX* داشتند ولی معنادار نبود.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان می‌دهد عصاره آویشن نه تنها دارای اثر باکتری کشی مستقیم بر سودوموناس آئروژینوزا است، بلکه قادر به تعدیل منفی بیان برخی از ژن‌های کلیدی پمپ افلاکس، به‌ویژه *mexX* است. تفاوت و تنوع در نتایج به‌دست‌آمده میان جدایه‌ها پیچیدگی مکانیسم‌های مقاومت را برجسته می‌کند. به تحقیقات بیشتری برای بهینه‌سازی فرمولاسیون آن نیاز است.

می‌دهند (۸). مطالعات متعدد *in vitro* تأثیر ضدباکتریایی، ضدقارچی و حتی ضدویروسی عصاره‌ها و اسانس‌های مختلف آویشن را تأیید کرده‌اند (۹). مکانیسم عمل ضد میکروبی این ترکیبات فنلی اغلب به اختلال در ساختار و عملکرد غشای سیتوپلاسمی نسبت داده می‌شود. تیمول و کارواکرول، به‌عنوان ترکیبات آب‌گریز، می‌توانند در لایه لیپیدی غشا نفوذ کنند، سیالیت و نفوذپذیری آن را افزایش دهند و منجر به نشت یون‌ها و اجزای سلولی، کاهش پتانسیل غشا و در نهایت مرگ سلول شوند (۱۰). باین‌حال، فرض بر این است که این ترکیبات ممکن است دارای اهداف سلولی چندگانه باشند و فعالیت آنها تنها به غشا محدود نمی‌شود. یکی از جنبه‌های کمتر مطالعه‌شده، تعامل احتمالی این متابولیت‌های گیاهی با سیستم‌های پمپ افلاکس باکتریایی است. آیا این ترکیبات صرفاً سوبسترای پمپ‌ها هستند و با سرعت از سلول خارج می‌شوند؟ یا برعکس، می‌توانند بیان ژن‌های این پمپ‌ها را تنظیم کنند و یا حتی به‌عنوان مهارکننده پمپ عمل کنند؟ برخی مطالعات روی ترکیبات گیاهی دیگر، مانند اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG) چای سبز، نشان داده‌اند که آنها می‌توانند بیان پمپ‌های افلاکس مانند MexAB-OprM در *P. aeruginosa* را مهار کنند (۱۱). اما اطلاعات مشروح و مستقیم در مورد تأثیر عصاره آویشن یا ترکیبات عمده آن روی بیان سیستم‌های پمپ افلاکس در *P. aeruginosa* بسیار محدود و پراکنده است.

با توجه به جایگاه سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یک عامل عفونت‌های چالش‌برانگیز و اهمیت سیستم‌های پمپ افلاکس در مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن و از طرفی پتانسیل بالای گیاه آویشن، به‌عنوان یک منبع ضد میکروبی طبیعی، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی جامع فعالیت ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی برگ آویشن (*Thymus vulgaris*) علیه سویه‌های استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا و بررسی تأثیر زیرمهارکننده (sub-MIC) این عصاره روی الگوی بیان ژن‌های کدکننده پمپ‌های افلاکس کلیدی (MexB, MexD, MexF, MexY) طراحی شده است. این مطالعه می‌تواند به درک عمیق‌تری از مکانیسم‌های مولکولی عمل عصاره آویشن منجر شود و زمینه را برای توسعه فرمولاسیون‌های درمانی ترکیبی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های متعارف و عصاره گیاهی، به‌عنوان کمک‌کننده‌های درمانی برای غلبه بر مقاومت پمپ افلاکس، فراهم آورد.

## روش کار

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی با هدف کاربردی است. در این پژوهش ابتدا گیاه آویشن تهیه شد و با روش ماسراسیون و حلال اتانولی عصاره آن استخراج شد. سویه‌های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از مراکز درمانی با مقاومت دارویی چندگانه در آزمایشگاه کشت مجدد داده شد. غلظت‌های مختلف از عصاره آویشن تهیه شد و با روش میکروآیدلوشن حداقل غلظت مهار و حداقل غلظت کشندگی عصاره آویشن روی جدایه‌ها بررسی شدند. برای بررسی بیان ژن نمونه‌ها در کشت مایع کشت داده شدند و سپس با استفاده از کیت استخراج *RNA* استخراج انجام شد. پس از بررسی خلوص و غلظت *RNA* استخراج‌شده، cDNA با کیت سنتز مخصوص خود سنتز شد. سپس فرایند Real Time PCR با مستر مخصوص آن و پرایمر اختصاصی mexX با برنامه مربوطه در دستگاه Real Time PCR انجام و نتایج با نرم‌افزار prism بررسی شد. در مرحله بعد، باکتری در معرض عصاره با غلظت زیر MIC رشد داده شد و دوباره *RNA* استخراج و بیان ژن این دفعه در حضور عصاره بررسی شد. در نهایت میزان بیان در حضور و عدم حضور عصاره مقایسه شد.

بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (Antimicrobial Resistance) به‌عنوان یک تهدید جهانی و یکی از ده خطر اصلی سلامت بشریت از سوی سازمان جهانی بهداشت (WHO) معرفی شده‌اند (۱). افزایش نگران‌کننده سویه‌های چنددارویی مقاوم (MDR) به‌طور جدی گزینه‌های درمانی مؤثر را محدود کرده، منجر به افزایش نرخ مرگ‌ومیر، طولانی‌شدن مدت بستری و افزایش هزینه‌های درمانی شده است (۲).

در میان عوامل بیماری‌زای مقاوم، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یک پاتوژن گرم‌منفی فرصت‌طلب و ذاتاً مقاوم است که به‌عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی (مانند عفونت‌های دستگاه تنفسی، مجاری ادراری، جریان خون و زخم‌های سوختگی) و نیز عفونت‌های جامعه‌اکتساب (مانند عفونت گوش خارجی) شناخته می‌شود (۳). این باکتری به‌دلیل داشتن غشای خارجی با نفوذپذیری کم و توانایی فوق‌العاده در ایجاد و اکتساب مکانیسم‌های مقاومت، درمان را بسیار دشوار می‌کند. عفونت‌های ناشی از این پاتوژن، به‌ویژه در افراد دارای سیستم ایمنی تضعیف‌شده، بیماران مبتلا به فیبروز کیستی (Cystic Fibrosis) و افراد دارای زخم‌های مزمن، می‌تواند به یک وضعیت خطرناک و تهدیدکننده حیات تبدیل شود (۴).

یکی از پیچیده‌ترین و مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت در *P. aeruginosa* سیستم‌های پمپ افلاکس (Efflux Pumps) هستند. این پمپ‌های غشایی، که به خانواده‌های مختلفی تعلق دارند، قادرند طیف وسیعی از سوبستراها از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها (مانند فلوروکینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها، بتا-لاکتام‌ها)، مواد ضد عفونی‌کننده و حتی یون‌های فلزی را به‌طور فعال از درون سلول باکتری به بیرون پمپ کنند و غلظت مؤثر این عوامل را در سیتوپلاسم کاهش دهند (۵).

سیستم پمپ افلاکس MexAB-OprM، MexCD-OprJ، MexEF-OprN، و MexXY-OprM نقش برجسته‌ای در مقاومت چنددارویی این باکتری ایفا می‌کنند. تنظیم بیان این پمپ‌ها تحت کنترل شبکه‌های پیچیده تنظیم‌کننده‌های ژن است و افزایش بیان (overexpression) آنها یکی از علل عمده شکست درمانی محسوب می‌شود (۶). بنابراین، شناسایی ترکیباتی که بتوانند هم فعالیت ضد میکروبی مستقیم داشته باشند و هم این مکانیسم‌های مقاومت را مهار کنند، به یک استراتژی درمانی نویدبخش تبدیل شده است.

در این راستا، پژوهش‌های معطوف به منابع طبیعی، به‌ویژه گیاهان دارویی، به‌دلیل تنوع گسترده متابولیت‌های ثانویه با فعالیت زیستی، احیا شده‌اند. گیاهان دارویی قرن‌هاست که در طب سنتی برای درمان عفونت‌ها استفاده می‌شوند و می‌توانند منبعی غنی برای کشف عامل‌های ضد میکروبی جدید و یا کمک‌کننده‌های درمانی (adjuvants) باشند (۷). آویشن (*Thymus*)، متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae)، یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی با سابقه طولانی مصرف در طب سنتی اروپا، مدیترانه‌ای و ایرانی است. ترکیبات زیست‌فعال اصلی موجود در اسانس و عصاره آویشن شامل مونوترپن‌های فنلی، به‌ویژه تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) است که فعالیت ضد میکروبی قوی از خود نشان

## کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا

برای تهیه عصاره آویشن از تکنیک غوطه‌وری و حلال هیدروالکلی با اتانول استفاده شد. ۱۰۰ گرم پودر آویشن با ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و با استفاده از هم‌زن مغناطیسی به‌طور پیوسته هم زده شد. پس از فیلترکردن، عصاره حاصل با دستگاه تبخیرکننده چرخان تغلیظ شد و عصاره بدون الکلی به دست آمد. سپس عصاره به‌دست‌آمده فریز شد و با دستگاه سرما خشک‌کن پودر شد. پودر آماده برای استفاده در آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

## بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره آویشن باغی

اثرات ضد میکروبی عصاره آویشن روی باکتری‌های دارای مقاومت چندگانه بررسی شد. روش بررسی اثر ضد میکروبی کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) و انتشار از دیسک بود.

در بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره آویشن باغی سویه‌های MDR سودوموناس آئروژینوزا مراحل بالا طی شد، با این تفاوت که به‌جای دیسک‌های آماده از دیسک‌های بلانک استریل آغشته به عصاره آویشن استفاده شد؛ بدین ترتیب که دیسک‌ها به غلظت‌های ۰.۲۵، ۰.۵، و ۱۰۰ عصاره غوطه‌ور شدند و پس از ۵ دقیقه از عصاره برداشته شد و بعد از نم‌گیری مطابق روش گفته‌شده در بالا روی محیط آگاردار قرار داده شدند. از دیسک آمپی‌سیلین به‌عنوان کنترل استفاده شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی MIC عصاره آویشن علیه سودوموناس آئروژینوزا از روش استاندارد رقت‌سازی متوالی در محیط مایع (براث میکروداپلوشن) استفاده شد. ابتدا محلول استوک عصاره در حلال مناسب تهیه شد. رقت‌های متوالی دوبرابری از عصاره در محیط مولر-هینتون براث در پلیت ۹۶ چاهک تهیه شد. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت استاندارد مک‌فارلند ۵/۱۰ معادل  $1 \times 10^8$  CFU/mL و سپس در محیط براث رقیق شد تا غلظت نهایی حدود  $5 \times 10^5$  CFU/mL در هر چاهک به دست آید.

پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شدند. پس از آنکوباسیون، رشد باکتری از طریق مشاهده کدورت به‌طور چشمی و نیز اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج  $600 \times$  نانومتر ارزیابی شد. MIC به‌عنوان پایین‌ترین غلظت از عصاره تعریف شد که در آن هیچ رشد قابل مشاهده‌ای وجود نداشت و حداقل ۹۰ درصد از رشد باکتری را نسبت به چاهک کنترل رشد مهار کرد. همه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند. کنترل‌های لازم شامل کنترل رشد (باکتری بدون عصاره)، کنترل منفی (محیط کشت تنها) و کنترل مثبت (باکتری با حلال عصاره) در هر پلیت منظور شدند (۱۳).

برای تعیین MBC از چاهک‌های فاقد رشد مقدار ۵ میکرولیتر به پلیت‌های مولر هینتون آگار تلقیح شد. پلیت‌ها در شرایط هوازی در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت در آنکوباتور قرار گرفتند. رشد باکتری حتی به میزان ۵ کلنی بر سطح محیط کشت، نشان‌دهنده زنده‌بودن باکتری‌ها است و تشکیل نشدن کلنی غلظتی را نشان می‌دهد که باکتری کشته شده است. نسبت  $MBC/MIC$  محاسبه شد. اگر نسبت  $MBC/MIC \leq 4$  باشد، دارو به‌عنوان باکتری‌کش در نظر گرفته می‌شود اما اگر نسبت  $MBC/MIC > 4$  باشد، دارو به‌عنوان باکتریواستاتیک تعریف می‌شود (۱۴).

بررسی مولکولی اثر عصاره روی بیان ژن *mexX* با روش *qRT-PCR*

ارزیابی مولکولی اثر عصاره روی بیان ژن به این صورت انجام شد که ابتدا بیان ژن *mexX* که بخشی از سیستم پمپ افلاکس *mexXY* در سودوموناس آئروژینوزا است، در مقایسه با بیان آن در سویه استاندارد و

باکتری‌های مورد بررسی ۲۰ سویه باکتری سودوموناس از بانک میکروبی هستند. جهت بررسی خلوص و تأیید باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، نمونه‌ها دوباره در آزمایشگاه روی محیط نوترینت آگار خالص‌سازی شدند و کلنی‌های تک به محیط ستریماید آگار، که یک محیط اختصاصی باکتریایی است، انتقال و کشت داده شدند.

اساس تست ستریماید آگار بر پایه یک ترکیب آمونیوم چهارتایی است که یک ماده ضد عفونی‌کننده به‌شمار می‌آید و از رشد باکتری‌های گرم مثبت و بسیاری از باکتری‌های گرم منفی جلوگیری می‌کند. با این حال، سودوموناس آئروژینوزا به ستریماید مقاوم است و می‌تواند در محیط رشد کند. علاوه بر این، محیط حاوی گلیسرول است که به‌عنوان منبع کربن عمل می‌کند و همچنین حاوی کلرید منیزیم و سولفات پتاسیم که تولید رنگدانه‌های مشخصه مانند پیوسیانین (سبز آبی) و پیووردین (زرد-سبز) را افزایش می‌دهد. این رنگدانه‌ها شاخص‌های بصری حضور سودوموناس آئروژینوزا هستند که آزمایش را انتخابی و افتراقی می‌کنند. در نهایت باکتری‌ها پس از رشد در محیط آگوستی TSB در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

## تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتریایی

## انتشار از دیسک

نمونه‌های باکتریایی به‌دست‌آمده از کلینیک، نمونه‌هایی با مقاومت چندگانه (MDR) بودند. طبق تعریف MDR به‌عنوان عدم حساسیت اکتسابی به حداقل یک عامل در سه یا چند دسته ضد میکروبی اطلاق شد (۱۲). همچنین از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفیپیم ( $30 \mu\text{g}$ )، آرترونام ( $30 \mu\text{g}$ )، نورفلوکسازین ( $10 \mu\text{g}$ )، لووفلوکسازین ( $5 \mu\text{g}$ )، جنتامایسین ( $10 \mu\text{g}$ ) و آمیکاسین ( $30 \mu\text{g}$ ) استفاده شد.

با استفاده از سوآب استریل، سوسپانسیون‌های باکتریایی که در سالین نرمال با غلظت معادل نیم مک‌فارلند تهیه شده بودند، به‌صورت یکنواخت و چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به‌کمک پنس استریل و با رعایت فواصل استاندارد ( $1.5$  سانتی‌متر از لبه پلیت و  $2.4$  سانتی‌متر بین مرکز دو دیسک مجاور) بر روی سطح محیط قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط هوازی آنکوبه شدند. پس از اتمام آنکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌ها برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و با مقادیر استاندارد CLSI مقایسه شدند تا حساسیت، مقاومت، و یا حساسیت بینابینی سویه‌ها تعیین شود.

## آماده‌سازی و تهیه عصاره آویشن باغی

برای تهیه عصاره جهت به‌دست‌آوردن یک عصاره با خاصیت میکروبی بهتر، از گیاه آویشن بخش تحقیقات کشاورزی باریج اسانس با کد هر بار بوم ۱-۲۹۰ استفاده شد. برای این منظور برگ و ساقه گیاه با آب شست‌وشو داده شدند تا آلودگی‌ها و ذرات اضافی حذف شوند. در محیطی سایه و به دور از نور مستقیم خورشید گیاهان خشک شدند تا ترکیبات مفید و فعال گیاه حفظ شوند. پس از خشک‌شدن، به‌کمک یک دستگاه مخلوط‌کن برقی (ساخت شرکت پارس خزر ایران) به پودر تبدیل شدند. این پودر در ظرفی شیشه‌ای ذخیره و تا مرحله استخراج در یخچال نگهداری شد.

PCR بلافاصله می‌تواند برای تعیین مقدار اولیه DNA در یک نمونه و نیز برای تعیین کمیت تغییرات در بیان ژن در طول زمان استفاده شود. در این واکنش از ژن خانه‌دار rRNA ۱۶S به‌عنوان ژن کنترل داخلی و سوبه استاندارد سودوموناس اتروچینوزا PAO1 استفاده شد تا میزان بیان برحسب میزان بیان ژن هدف نسبت به آن سنجیده شود. ترکیبات واکنش در جدول ۱ آمده است.

ترکیبات	غلظت ترکیبات
مستر میکس	۱۰ میکرولیتر
آب مقطر	۶/۵ میکرولیتر
cDNA	۱/۵ میکرولیتر
پرایمر پیشرو	۱ میکرولیتر
پرایمر پسرو	۱ میکرولیتر

نتایج به‌دست‌آمده که به صورت سه تکرار برای هر واکنش بود با  $\Delta\Delta C_t$  Quantification Relative و براساس روش pfaffl با استفاده از میزان Ct در فرمول  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (کنترل  $\Delta C_t$  - نمونه  $\Delta C_t$ ) محاسبه شد (۲۰۰۱) pfaffl). درنهایت آنالیز با نرم‌افزار پریزم بررسی شد. ترادف پرایمرهای استفاده‌شده در جدول ۲ آمده است.

اندازه محصول واکنش	ترادف پرایمرهای استفاده‌شده (۳'-۵')	ژن هدف و ژن کنترل داخلی
۱۰۹ bp	F: TTCCTGCTGGGCTGCGAAGA R: AGCTCGCTGGTGATGCCGATAG	mexX
۱۵۰ bp	F: CAGCTCGTGTCTGAGATGT R: CGTAAGGGCCATGATGACTT	۱۶S rRNA

منحنی ذوب در qRT-PCR یک مرحله تجزیه و تحلیل پس از تکثیر است که برای ارزیابی ویژگی و هویت محصولات PCR تکثیرشده استفاده می‌شود. پس از تکمیل چرخه‌های تکثیر، دما به تدریج افزایش می‌یابد و باعث می‌شود آمپلیکون‌های DNA دورشته‌ای دنا توره یا «ذوب» شوند و به تک‌رشته‌ها تبدیل شوند. این فرایند با اندازه‌گیری فلورسانس ساطع‌شده توسط رنگ SYBR Green یا پروب متصل به DNA نظارت می‌شود. با افزایش دما، فلورسانس به‌شدت در دمای ذوب (Tm) کاهش می‌یابد که به‌دلیل طول محصول، محتوای GC و ترکیب پایه، مخصوص توالی DNA است.

منحنی ذوب به‌عنوان مشتق منفی فلورسانس (dF/dT) برحسب دما رسم می‌شود و پیک‌های مشخصی را تولید می‌کند که مربوط به آمپلیکون‌های مختلف است. یک پیک تیز منفرد معمولاً یک محصول خاص PCR را نشان می‌دهد، درحالی‌که پیک‌های متعدد یا گسترده ممکن است نشان‌دهنده تکثیر غیراختصاصی، تشکیل پرایمر-دایمر یا آلودگی باشد. این مرحله برای تأیید صحت نتایج qRT-PCR، به‌ویژه هنگام استفاده از رنگ‌های غیراختصاصی مانند SYBR Green بسیار مهم است، زیرا کمک می‌کند مطمئن شویم فلورسانس شناسایی‌شده با هدف مورد نظر مطابقت دارد. آنالیز منحنی ذوب جهت بررسی آلودگی و باندهای غیراختصاصی برای پرایمر براساس جدول ۳ انجام شد.

کنترل سودوموناس اتروچینوزای PAO1 بررسی شد. در مرحله بعد باکتری‌ها در حضور غلظت زیر MIC به‌دست‌آمده عصاره کشت داده شدند و بیان ژن در حضور آن بررسی شد. درنهایت نتایج بیان ژن mexX در حضور و عدم حضور عصاره مقایسه شد.

## بررسی بیان ژن RNA در عدم حضور عصاره آویشن باغی

### استخراج RNA

برای استخراج RNA، باکتری‌هایی که دارای مقاومت چندگانه بودند انتخاب شدند. در محیط نوترینت آگار کشت شدند و پس از رشد در این محیط، به محیط مایع برین هارت برات (BHB) تلقیح شدند. گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انجام شد. به‌دلیل اینکه بیان ژن در اواخر فاز لگاریتمی به بیشترین مقدار خود می‌رسند، در این فاز سلول‌ها برداشت شدند. برای این منظور به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. استخراج RNA از سلول‌های باکتریایی ته‌نشین‌شده براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

### سنتز cDNA

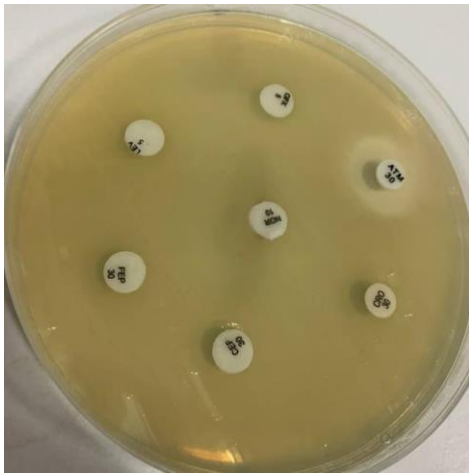
پس از استخراج RNA کیفیت آن با نانودراپ بررسی شد. چون غلظت‌ها متفاوت بود RNA adjusting انجام شد، بدین معنی که پایین‌ترین غلظت RNA مشخص شد و بعد مقدار RNA کل محاسبه شد. درنهایت برای همه واکنش‌ها غلظت‌های یکسانی از RNA نمونه‌های مختلف استفاده شد.

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA پارس توس استفاده شد. محتویات کیت دارای مخلوط بافر ۲X RT حاوی بافر RT 2X، ۱ میلی‌مولار مخلوط dNTP، ۸ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>، الیگو (t) ۱۶، هگزامر تصادفی، و تثبیت‌کننده بود. ترکیبات آنزیم نیز حاوی H- minus MMLV مقاوم در برابر حرارت، مهارکننده RNase و تثبیت‌کننده و آب DEPC است.

### انجام واکنش Real-time PCR

پس از ساخته‌شدن DNA مکمل RNA، باید میزان بیان ژن با روش Real-time PCR کمی انجام شود.

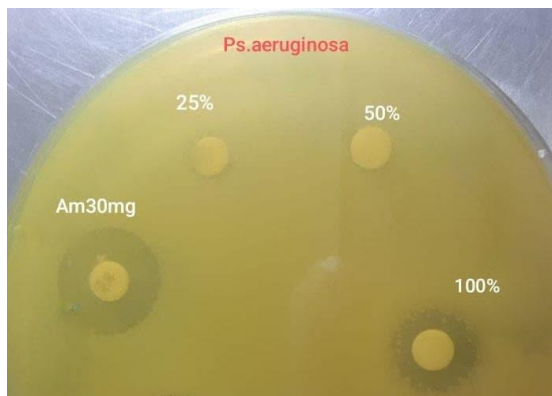
Real-time PCR، که به‌عنوان PCR کمی (qPCR) شناخته می‌شود، یک تکنیک زیست‌شناسی مولکولی قدرتمند است که برای تقویت و تعیین کمیت هم‌زمان توالی‌های DNA هدف در زمان واقعی استفاده می‌شود. برخلاف PCR سنتی، که فقط تجزیه و تحلیل نقطه پایانی را ارائه می‌کند، qPCR به‌دلیل استفاده از رنگ‌های فلورسنت یا پروب‌هایی که سیگنال‌هایی متناسب با مقدار DNA تولیدشده منتشر می‌کنند، امکان بررسی فرایند تکثیر ترادف‌ها را در صورت وقوع فراهم می‌کند. این روش بسیار حساس و اختصاصی است و قادر است مقادیر بسیار کمی از اسیدهای نوکلئیک را تشخیص دهد و در مواردی مانند تجزیه و تحلیل بیان ژن، تشخیص پاتوژن، مطالعات تنوع ژنتیکی و تشخیص بسیار ارزشمند است. با ارائه داده‌های کمی دقیق، PCR بلادرنگ به یک ابزار ضروری در محیط‌های تحقیقاتی، بالینی، و صنعتی تبدیل شده است و دانشمندان را قادر می‌سازد بینشی در مورد فرایندهای ژنتیکی و سلولی با دقت قابل‌توجهی به دست آورند. نتایج



شکل ۲. نمونه‌ای از نتایج تست انتشار از دیسک.

### نتایج بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره آویشن

در بررسی انجام شده چون هدف اثردهی عصاره روی سوبه‌های دارای مقاومت چندگانه بود، این ایزوله‌ها انتخاب شدند. باین‌حال، جهت بررسی میزان اثردهی عصاره روی جدایه‌های کلینیکی، سوبه حساس هم انتخاب شد. نتیجه آزمایش نشان داد که سوبه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک، یعنی غیرمقاومت چندگانه، تفاوت چندانی از نظر مقاومت به آویشن نسبت به سوبه‌های دارای مقاومت چندگانه نداشتند، به طوری که همه جدایه‌ها نسبت به غلظت‌های ۵۰ و ۲۵ درصد مقاوم بودند اما از بیست نمونه ۲ نمونه هاله عدم رشد اطراف دیسک ۱۰۰ درصد نشان دادند (حساس بودند). ایزوله حساس هم اطراف دیسک ۵۰ و ۱۰۰ هاله عدم رشد نشان داد ولی اطراف دیسک ۲۵ عدم هاله مشاهده شد. ایزوله‌ها نسبت به آمپی‌سیلین، به عنوان کنترل، حساسیت نشان دادند.



شکل ۳. آزمون انتشار از دیسک آویشن. سمت راست نمونه‌ای از نتایج بعد از کشت را نشان می‌دهد. مقاوم به ۲۵ و ۵۰ درصد و حساس به ۱۰۰ درصد. سمت چپ نمونه‌های انجام شده قبل از کشت.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از روش رقت‌سازی در میکروپلیت استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده ۲۰۰۰ تا ۳/۹۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج MIC برای ۷ نمونه ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای ۳ نمونه ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان داد.

MBC حداقل غلظت کشندگی یک ماده ضد میکروبی است. برای بررسی آن ۵ میکرولیتر از غلظت‌های MIC، که رشد قابل مشاهده در آنها دیده نشد، برداشته و روی محیط آگاردار کشت داده شد. اولین غلظتی که رشد نکرده نبود MBC در نظر گرفته شد. نتایج MBC ۱۲۵ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

جدول ۳. برنامه آنالیز منحنی ذوب

مرحله منحنی ذوب	تعداد چرخه‌ها (۴۰)	مرحله هولدینگ
۹۴°C	۹۴°C	۳۰s
۵۱°C	۵۰°C	۵s
۹۴°C	۳۳s	۱۵s
۹۴°C	۱min	۱۵s

### بررسی بیان ژن *mexX* در حضور عصاره آویشن

جهت ارزیابی اثر عصاره آویشن روی بیان ژن *mexX* سوسپانسیون باکتریایی معادل  $10^5 \times 5$  تهیه شده و باکتری‌ها در حضور غلظت پایین‌تر از MIC عصاره کشت داده شدند. برای این منظور مثلاً اگر MIC ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد. زمانی که باکتری‌ها به انتهای فاز لگاریتمی رسیدند، استخراج *RNA* و بیان ژن انجام شد.

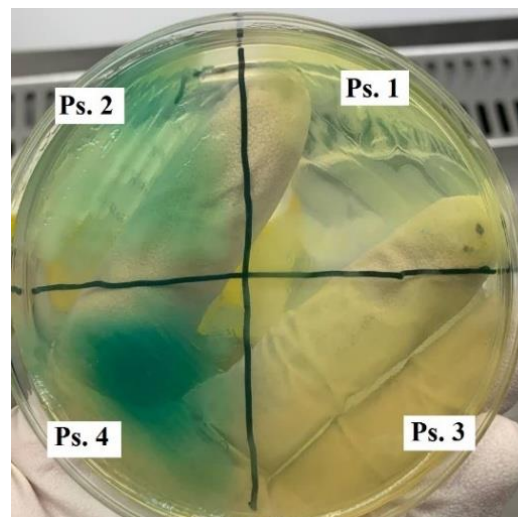
### تحلیل آماری

تحلیل‌های آماری همگی با آزمون تی با نرم‌افزار GraphPad prism نسخه ۱۰.۱.۲ انجام شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان حالت معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

### یافته‌ها

#### کشت و احیای جدایه‌ها

جدایه‌های سودوموناس *اثر جینوزا* برای تأیید روی محیط ستریماید آگار کشت داده شدند که نتایج آن در شکل ۱ مشخص شده است. محیط با رشد سودوموناس *اثر جینوزا* به رنگ سبز تغییر پیدا کرده است.



شکل ۱. نتایج کشت و احیای جدایه‌های سودوموناس *اثر جینوزا*. عکس سمت راست محیط ستریماید آگار و سمت چپ نوترینت آگار است.

### نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

سوبه‌های مورد بررسی دارای مقاومت چندگانه بودند. برای این منظور تست آنتی‌بیوگرام گذاشته شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفیپیم، آرترونام، نورفلوکسازین، لووفلوکسازین، سفتریفور و آمیکاسین استفاده شدند. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود فقط آنتی‌بیوتیک آرترونام هاله عدم رشد نشان داد که نشان‌دهنده حساسیت آن است. بقیه به دلیل مقاومت، هاله‌ای نشان ندادند.

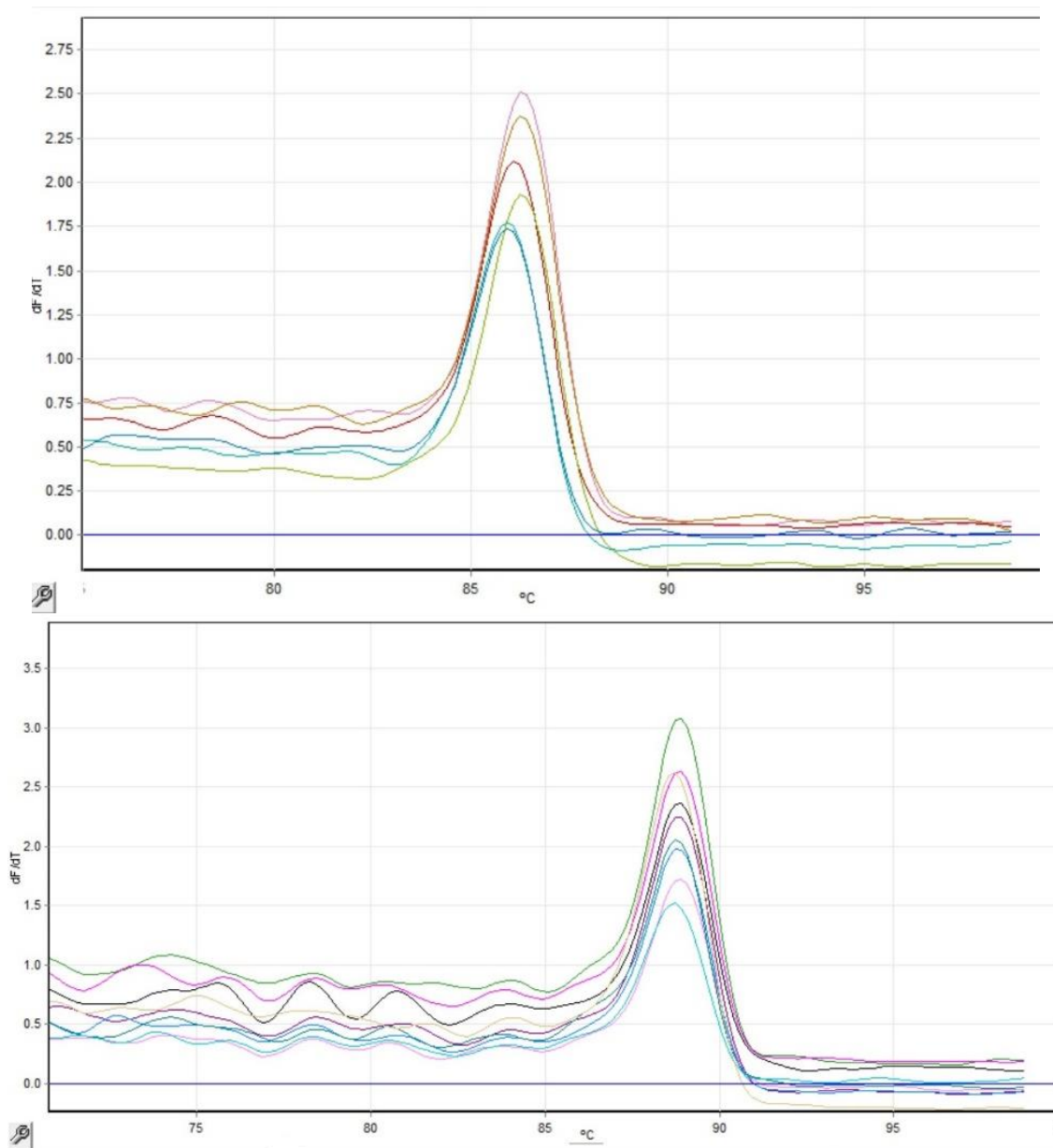
یک ژن در همه نمونه‌ها باید با هم منطبق باشند و همچنین باید همه منحنی‌ها تک‌قله باشند. در مطالعه حاضر منحنی ذوب یک پیک منفرد و شارپ برای نمونه‌ها و یک پیک هم برای ژن هدف 16srRNA نشان داد (شکل ۴).

بررسی مولکولی اثر عصاره آویشن روی بیان ژن *mexX* با روش

*qRT-PCR*

بررسی منحنی‌های ذوب قبل و بعد از اثر عصاره

از آنجاکه هر ژن منحنی ذوب مخصوص به خود دارد، منحنی‌های



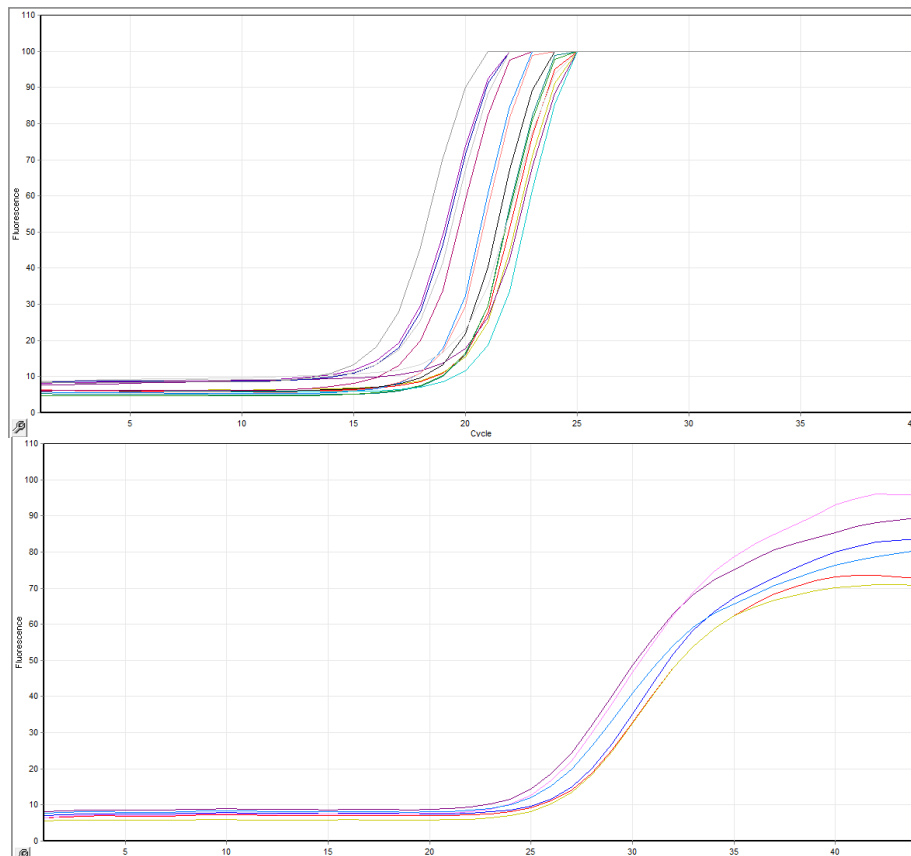
شکل ۴. نتایج آنالیز منحنی ذوب مربوط به ژن *mexX* در مرحله قبل (بالا) و بعد از اثر عصاره (پایین). منحنی سمت راست مربوط به بیان ژن هدف و منحنی سمت چپ مربوط به بیان ژن داخلی 16srRNA است.

نور خطی می‌شوند.

پس از یک سیکل مشخص، واکنش وارد فاز افزایشی می‌شود که به آن فاز لگاریتمی می‌گویند. زمان ورود واکنش به این فاز بستگی به مقدار DNA اولیه دارد. هرچه میزان الگوی اولیه بیشتر باشد، واکنش در سیکل‌های کمتری وارد فاز لگاریتمی خواهد شد. در این فاز، محصول دورشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود، به طوری که میزان محصولات به طور نمایی افزایش می‌یابد. فاز نهایی، فاز Plateau است که در آن ترکیبات واکنش به تدریج مصرف می‌شوند و تکثیر محصولی اتفاق نمی‌افتد. بنابراین افزایش در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود.

#### بررسی منحنی تکثیر در *qRT-PCR*

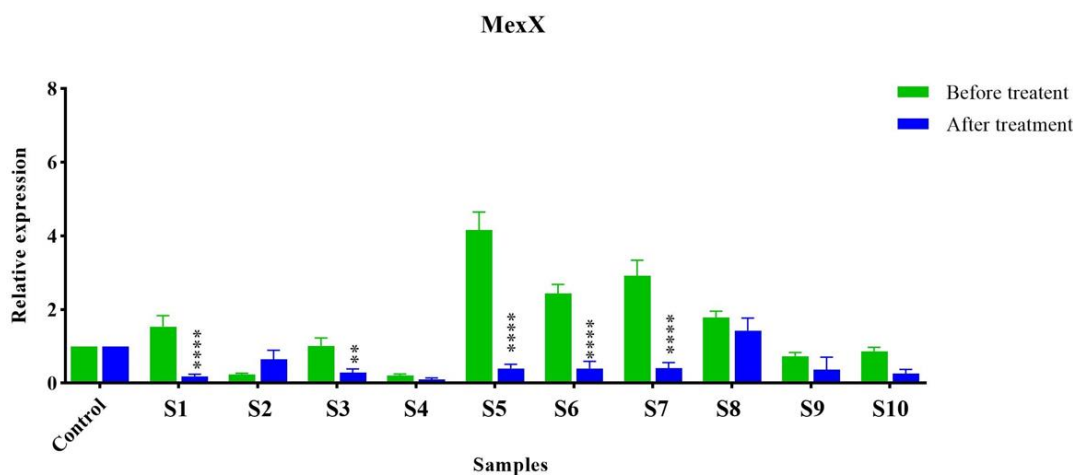
بیشرفت فرایند تکثیر در *qRT-PCR* از طریق نمودار تکثیر گرافیکی نشان داده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است در این نمودار شدت فلورسانس در محور *y* و عدد چرخه در محور *x* مشاهده می‌شود. در فاز ابتدایی، تا حدود چرخه ۱۰ تا ۱۵ تغییر قابل توجهی در تعداد محصولات تکثیرشده مشاهده نمی‌شود. این بخش از نمودار، که به آن فاز Baseline یا فاز خطی می‌گویند، جایی است که تکثیر محصولات به اندازه‌ای نیست که موجب افزایش قابل توجه نور فلورسنت شود. نور ثبت‌شده در این مرحله به حداقل می‌رسد و بیشتر ناشی از cDNA، پرایمرها و رنگ‌های فلورسنت است که باعث ایجاد



شکل ۵. نمونه‌ای از نمودارهای منحنی تکثیر ژن *mexX* قبل (بالا) و بعد از اثر عصاره (پایین).

فنونتیپ مقاومت چندگانه ۶ نمونه به‌طور معناداری کاهش در بیان ژن *mexX* آنها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). سه نمونه کاهش داشتند ولی سطح کاهش بیان *mexX* معنادار نبود. نمونه S۲ افزایش بیان البته نه معنی‌دار و به میزان کم نشان داد.

نتایج MIC برای ۷ نمونه ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای ۳ نمونه ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد. تغییرات بیان ژن *mexX* در باکتری‌ها براساس مقایسه نسبی آنها با سویه استاندارد سودوموناس *اِثروجینوزا* PAO1 و با هم ارزیابی شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در نمودار شکل ۶ از ده جدایه باکتری سودوموناس *اِثروجینوزا* با



شکل ۶. نمودار مقایسه‌ای بیان ژن *mexX* نسبت به سویه استاندارد سودوموناس *اِثروجینوزا* PAO1 قبل از اثر عصاره (به رنگ سبز) و بعد از اثر عصاره (به رنگ آبی). به صورت اختصاصی، مقادیر P کمتر از ۰/۰۵، کمتر از ۰/۰۱، کمتر از ۰/۰۰۱ و کمتر از ۰/۰۰۰۱ نمایش داده شده است.

بسیار بالا در نظر گرفته شد. مقایسه نتایج نشان داد در برخی از ایزوله‌ها بیان ژن *mexX* در حضور عصاره آویشن به‌طور معناداری کاهش یافته است. افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس *اِثروجینوزا*، به‌ویژه در ایزوله‌های مقاوم به چند دارو، به یک بحران جهانی سلامت تبدیل شده است (۱۵). در میان مکانیسم‌های مقاومت متعدد، سیستم‌های پمپ افلاکس نقش

## بحث

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر عصاره آویشن باغی بر بیان ژن *mexX* بخشی از سیستم پمپ افلاکس *mexXY* در باکتری سودوموناس *اِثروجینوزا* بود. از آنجاکه جدایه‌های بالینی مورد مطالعه مقاومت چندگانه داشتند، احتمال فعال‌بودن و بیان این پمپ در آنها

نشان می‌دهد (۲۲). علاوه بر این، پلانایپان و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که ترکیبات مشتق شده از گیاه، از جمله تیمول از آویشن، می‌تواند فعالیت پمپ خروجی را در باکتری‌های گرم منفی کاهش دهد که یافته‌های این مطالعه را بیشتر تأیید می‌کند (۲۳).

### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد عصاره آویشن دارای فعالیت‌های ضد میکروبی وابسته به میزان غلظت آن، در برابر *Sudomonas aeruginosa* با مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک است. به‌طور کلی، مطالعه انجام‌شده نشان داد عصاره آویشن پتانسیل خوبی به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی در برابر *Sudomonas aeruginosa* دارد. اینکه عصاره آویشن می‌تواند بیان *mexX* را در بیشتر جدایه‌ها کاهش دهد، بسیار امیدوارکننده است، زیرا نشان می‌دهد که ممکن است عصاره آویشن باکتری‌های مقاوم را دوباره به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس کند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه پیام نور و همکاران دخیل در اجرای پروژه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### ملاحظات اخلاقی

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه نویسنده اول با کد ۳۰۰۴۰۸۰ از معاونت آموزشی دانشگاه پیام نور کشور است. با توجه به قوانین دانشگاه پیام نور، با توجه به اینکه موضوع پایان‌نامه، روی انسان یا حیوان آزمایشگاهی نیست، لذا نیاز به کد اخلاق ندارد. بدین وسیله مجریان از آن دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### سهم نویسندگان

همه نویسندگان در نگارش مقاله همکاری داشته‌اند.

### حامی مالی

نویسندگان مقاله حاضر از معاونت آموزشی دانشگاه پیام نور کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی برای نویسندگان در این مقاله وجود ندارد.

کلیدی در کاهش غلظت درون سلولی آنتی‌بیوتیک‌ها و شکست درمانی ایفا می‌کند (۱۶). این مطالعه با هدف بررسی پتانسیل دوگانه عصاره آویشن به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی طبیعی و تعدیل‌کننده بیان این پمپ‌های افلاکس طراحی شد. یافته‌های این تحقیق نشان داد عصاره هیدروالکلی آویشن فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی علیه سویه‌های *P. aeruginosa* دارد. این نتایج با گزارش‌های قبلی در مورد فعالیت ضد میکروبی گونه‌های مختلف آویشن مطابقت دارد (۱۷).

نکته برجسته این پژوهش تأثیر معنی‌دار غلظت‌های زیرمهارکننده عصاره آویشن بر کاهش بیان ژن‌های *mexB* و *mexD* بود. این دو ژن در مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله فلوروکینولون‌ها و بتا-لاکتام‌ها نقش اساسی دارند (۱۸). ترکیبات فنلی موجود در عصاره آویشن ممکن است با این سیستم‌های تنظیمی تعامل کنند و منجر به سرکوب رونویسی ژن‌های هدف شوند. علاوه بر این، استرس اکسیداتیو ایجادشده توسط ترکیبات فنلی می‌تواند بر مسیرهای سیگنالینگ تنظیم‌کننده بیان پمپ‌های افلاکس را تأثیر بگذارد (۱۹).

از دیدگاه بالینی، پیامدهای این یافته‌ها قابل توجه است. توانایی عصاره آویشن در مهار هم‌زمان رشد باکتری و کاهش بیان پمپ‌های افلاکس کلیدی، آن را به کاندیدای مناسبی برای استراتژی‌های درمانی ترکیبی تبدیل می‌کند. استفاده از این عصاره به‌عنوان کمک‌درمان (ادجوانت) همراه با آنتی‌بیوتیک‌های متعارف می‌تواند راهبردی امیدوارکننده برای غلبه بر مقاومت واسی و کاهش دوز مورد نیاز آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۲۰). این رویکرد به‌طور بالقوه می‌تواند دوره درمان را کوتاه‌تر و از ظهور مقاومت‌های جدید جلوگیری کند.

یافته‌های این مطالعه با مطالعات دیگر در ایران و جهان مطابقت دارد. به‌عنوان مثال، مطالعه دینیز (Diniz) و همکاران (۲۰۱۵) در ایران فعالیت ضد میکروبی عصاره آویشن را علیه *Sudomonas aeruginosa* ارزیابی کرد و مقادیر MIC را از ۱۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش داد که با مقادیر MIC ۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده‌شده در این مطالعه قابل مقایسه است (۲۱).

در سطح جهانی، مطالعات مختلف اثرات عصاره آویشن را به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی به اثبات رسانده است. نوسترو (Nostro) و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که اسانس آویشن با برهم‌زدن یکپارچگی غشای سلولی و مهار فعالیت پمپ خروجی به‌طور مؤثری از رشد *Sudomonas aeruginosa* جلوگیری می‌کند (۲۲). می‌توان گفت کاهش مشاهده‌شده بیان ژن *mexX* در این مطالعه در حضور آویشن، بیانگر ادعای نوسترو و همکاران است و مکانیسم اثر عصاره آویشن را

## References

- World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance. 2023. [Link](#)
- Dadgostar P. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3903-10. [doi: 10.2147/IDR.S234610](#). [pmid](#)
- Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4):e00031-19. [doi: 10.1128/CMR.00031-19](#). [pmid](#)
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177-92. [doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013](#). [pmid](#)
- Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(2):337-418. [doi: 10.1128/CMR.00117-14](#). [pmid](#)
- Fernández 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](#). [pmid](#)
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv.* 2015;33(8):1582-1614. [doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001](#). [pmid](#)
- Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MDM, Segura-Carretero A, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: health and potential uses. *Phytother Res.* 2018;32(9):1688-1706. [doi: 10.1002/ptr.6109](#). [pmid](#)
- Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. *Food Chem.* 2015;173:339-47. [doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.042](#). [pmid](#)

10. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 2012;3:12. [doi: 10.3389/fmicb.2012.00012](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
11. Blanco AR, Sudano-Roccaro A, Spoto GC, Nostro A, Rusciano D. Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular staphylococcal isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4339-43. [doi: 10.1128/AAC.49.10.4339-4343.2005](https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4339-4343.2005). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111111/)
12. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81. [doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
13. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (11th ed.). CLSI standard M07. Clin Lab Standard Institute. 2021. [Link](#)
14. Mogana R, Adhikari A, Tzar MN, Ramliza R, Wiart C. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(1):55. [doi: 10.1186/s12906-020-2837-5](https://doi.org/10.1186/s12906-020-2837-5). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32511111/)
15. Abushaheen MA, Muzaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis Mon.* 2020;66(6):100971. [doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100971](https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32511111/)
16. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence.* 2013;4(3):223-9. [doi: 10.4161/viru.23724](https://doi.org/10.4161/viru.23724). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
17. Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia AT, Horhat FG. Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J Med Life.* 2014;7 Spec No. 3(Spec Iss 3):56-60. [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
18. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(8):2003-20. [doi: 10.1093/jac/dky042](https://doi.org/10.1093/jac/dky042). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
19. Zhao X, Yu Z, Ding T. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms.* 2020;8(3):425. [doi: 10.3390/microorganisms8030425](https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
20. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):482-501. [doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482](https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
21. Diniz AF, Santos B, Nóbrega LMMO, Santos VRL, Mariz WS, Cruz PSC, et al. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* (thyme) essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat product. *Braz J Biol.* 2023;83:e275306. [doi: 10.1590/1519-6984.275306](https://doi.org/10.1590/1519-6984.275306). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
22. Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;230(2):191-5. [doi: 10.1016/S0378-1097\(03\)00890-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00890-5). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)
23. Palaniappan K, Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2010;140(2-3):164-8. [doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.001). [pmid](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511111/)