



## Investigating the effect of the allicin and cinnamon active ingredients on resistant *Pseudomonas aeruginosa* to $\beta$ -lactamase *In Vitro* and *in silico* study

Somayeh Ataei Jalisch<sup>1\*</sup> and Houra Pourghafar<sup>2</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran,  
E-mail: [Atayi.somayeh@yahoo.com](mailto:Atayi.somayeh@yahoo.com)

2- Ph.D. graduated, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 10/03/2025

Revised: 01/02/2026

Accepted: 04/02/2026

### Abstract

**Background and Aim:** The increasing spread of antibiotic resistance, particularly among Gram-negative bacteria, has encouraged the exploration of combined therapeutic approaches involving antibiotics and plant-derived compounds for the treatment of bacterial infections. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of the bioactive compounds allicin and cinnamon on  $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

**Materials and Methods:** The herbal active compounds allicin and cinnamon were purchased from Sigma-Aldrich. Twenty clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from the Pathobiology Laboratory of Razi Hospital were used in this study. The isolates were subjected to standard biochemical tests to confirm identification and ensure bacterial purity. These tests included hemolysin production, oxidase, catalase, and urease activities, growth at 42 °C, and growth characteristics on MacConkey agar (MCA), triple sugar iron agar (TSI), sulfide–indole–motility (SIM) medium, and Mueller–Hinton agar, as well as Gram staining. To evaluate the antibacterial effects of the active compounds, cinnamon at a concentration of 0.5 mg mL<sup>-1</sup> and allicin at a concentration of 0.004 mg mL<sup>-1</sup> were tested. Antibacterial activity was assessed using the antibiogram method (Kirby–Bauer disk diffusion test) and quantitative determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using the serial dilution method. The diameter of the bacterial growth inhibition zones around discs impregnated with the active compounds was measured and recorded. For the in-silico analysis, the three-dimensional structures of allicin, cinnamon, and the target proteins were obtained from the PubChem database and the RCSB Protein Data Bank, respectively. Using Discovery Studio software, rotatable bonds, atomic charges, and the center of gravity of the molecules were determined. Molecular docking simulations were performed for the target proteins and repeated independently 200 times. In this study, the Lamarckian genetic algorithm (LGA) was applied, and the resulting data were analyzed. Finally, RNA extraction, cDNA synthesis, and RT-PCR were carried out to evaluate the effects of the active compounds on the expression level of the blaIMP gene.

**Results:** The 20 clinical strains were confirmed as *Pseudomonas aeruginosa* based on colony morphology, characteristic odor, pigment production on Mueller–Hinton agar, hemolysin production on blood agar, Gram staining (Gram-negative bacilli), positive oxidase test, growth



at 42 °C on nutrient agar, motility, and lack of sugar fermentation on MacConkey agar and TSI media. In the disk diffusion assay, the mean diameter of the growth inhibition zone was 16 mm for 0.004 mg·mL<sup>-1</sup> allicin and 17 mm for 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> cinnamon. The MIC and MBC of allicin were 0.001 and 0.002 mg·mL<sup>-1</sup> for one strain, and 0.002 and 0.004 mg·mL<sup>-1</sup> for the remaining strains, respectively. For cinnamon, the MIC and MBC were 0.125 and 0.25 mg·mL<sup>-1</sup> for one strain, and 0.25 and 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> for the others. Molecular docking analysis revealed that the minimum free binding energy ( $\Delta G$ ) between cinnamon and  $\beta$ -lactamase was  $-4.83$  kcal·mol<sup>-1</sup>, whereas that for allicin was  $-4.12$  kcal·mol<sup>-1</sup>. These results indicate that cinnamon has a stronger inhibitory interaction with  $\beta$ -lactamase and effectively reduces its activity. Compared with the control drug sulfonamide ( $\Delta G = -5.34$  kcal·mol<sup>-1</sup>), the small difference in binding energies suggests that both cinnamon and allicin positively interact with  $\beta$ -lactamase. Furthermore, treatment with sub-MIC concentrations of both compounds resulted in decreased expression of the blaIMP gene in *P. aeruginosa*.

**Conclusion:** One of the major challenges in combating pathogenic microorganisms is the increasing prevalence of antibiotic resistance. In this study,  $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains treated with cinnamon and allicin exhibited reduced expression of the  $\beta$ -lactam resistance gene compared to untreated strains, indicating that these compounds can decrease  $\beta$ -lactam resistance. Based on these findings, it is suggested that cinnamon and allicin could be used in combination with conventional antibiotics to treat *P. aeruginosa* infections, following validation in standard clinical trials.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, allicin, cinnamon, gene expression, molecular docking, RT-PCR

## بررسی اثر ماده آلیسین و سینامون بر سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به بتالاکتام تحت شرایط درشیشه و مطالعه بیوانفورماتیکی

سمیه عطائی جلیسه<sup>\*۱</sup> و حورا پورغفار<sup>۲</sup>

\*۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، پست الکترونیک: atayi.somayeh@yahoo.com

۲- دانش‌آموخته دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۵

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰

### چکیده

سابقه و هدف: گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی سبب شده است، استفاده از اثر ترکیبی آنتی‌بیوتیک‌ها و به‌دست آوردن ترکیب‌های گیاهی در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها مورد توجه قرار گیرد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ماده مؤثره آلیسین و سینامون بر سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به بتالاکتام می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ماده مؤثره گیاهی آلیسین و سینامون از شرکت سیگما خریداری شد. ۲۰ سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا تهیه‌شده از آزمایشگاه پاتوبیولوژی بیمارستان رازی شهر رشت، برای تأیید گونه و خالص‌سازی باکتری، آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل بررسی قابلیت تولید همولیزین، اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، قابلیت رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، منظره رشد در محیط‌های مک‌کانکی آگار، آگار سه قند آهن و سولفید-ایندول-تحرك، منظره رشد در محیط آگار مولر هینتون و رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. برای بررسی اثر ضدباکتریایی مواد مؤثره سینامون و آلیسین به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، از آزمون آنتی‌بیوگرام و آزمون کمی حداقل غلظت بازدارنده به‌روش رقت‌های متوالی MIC و MBC استفاده شد و در نهایت قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌های آغشته به ماده مؤثره، اندازه‌گیری و ثبت گردید. در ادامه، آزمون بیوانفورماتیک، برای آماده‌سازی لیگاند و پروتئین، ساختار سه‌بعدی آلیسین و سینامون و پروتئین‌های هر دو به‌ترتیب از پایگاه‌های داده pubchem و rcbcs به‌دست آمدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار Discover Studio بارهای قابل چرخش و مرکز ثقل مولکول در تمامی باندها مشخص و داکینگ مولکولی برای پروتئین در ۲۰۰ مرتبه مستقل تکرار شد. در این مطالعه، از الگوریتم ژنتیک Lamarckian GA استفاده شد و اطلاعات به‌دست آمده تحلیل شدند. استخراج RNA، سنتز cDNA و RT-PCR برای تعیین اثر مواد مؤثره بر میزان بیان ژن *blaIMP* انجام شد.

یافته‌ها: ۲۰ سویه باکتری مورد بررسی، براساس مرفولوژی کلنی، بوی کلنی، تشکیل رنگ‌دانه در آگار مولر هینتون، تولید همولیزین بر روی آگار خون‌دار، نتیجه رنگ‌آمیزی گرم (باسیل گرم منفی)، مثبت بودن آزمایش اکسیداز، رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس بر روی آگار مغذی، مثبت بودن تست حرکت، عدم تخمیر قندها در محیط‌های مک‌کانکی آگار و TSI به‌عنوان سودوموناس تأیید هویت شدند. میانگین قطر هاله عدم رشد در تست دیسک دیفیوژن باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مداخله با  $0.04 \text{ mg.mL}^{-1}$  آلیسین برابر با ۱۶mm و  $0.05 \text{ mg.mL}^{-1}$  سینامون، برابر با ۱۷ mm بود. ماده مؤثر آلیسین در یک سویه، MIC  $0.01 \text{ mg.mL}^{-1}$  و MBC  $0.02 \text{ mg.mL}^{-1}$  و در دیگر سویه‌ها MIC و MBC به‌ترتیب  $0.02 \text{ mg.mL}^{-1}$  و  $0.04 \text{ mg.mL}^{-1}$  گزارش شد. ماده مؤثر سینامون در یک سویه، MIC  $0.125$  و MBC  $0.25 \text{ mg.mL}^{-1}$  و در سایر سویه‌ها، MIC برابر با  $0.25$  و مقدار MBC  $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  به‌دست آمد. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین سینامون و پروتئین بتالاکتاماز، پایین‌ترین سطح حداقل انرژی آزاد اتصال ( $\Delta G$ ) را دارا می‌باشد ( $-4.83 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) و در مقابل، انرژی اتصال بین آلیسین و پروتئین بتالاکتاماز برابر با  $-4.24 \text{ kcal.mol}^{-1}$  است. با توجه به داده‌ها، می‌توان به این نتیجه رسید که ماده مؤثر سینامون بیشترین تأثیر را بر روی پروتئین بتالاکتاماز دارد و سینامون توانسته تأثیر مطلوبی بر روی تضعیف عملکرد و فعالیت پروتئین بتالاکتاماز بگذارد. اختلاف کم حداقل انرژی آزاد اتصال ( $\Delta G$ ) دو ماده مؤثر سینامون و آلیسین بر بتالاکتاماز، با برهم‌کنش داروی کنترل سولفونامید و بتالاکتاماز ( $-5.34 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )، نشان می‌دهد که تأثیر و برهم‌کنش سینامون و آلیسین بر پروتئین بتالاکتاماز مثبت است. سینامون و آلیسین، هر دو کاهش بیان ژن *blaIMP* را در باکتری

سودوموناس آئروژینوزا در غلظت subMIC منجر شدند.

نتیجه‌گیری: امروزه یکی از مشکلات اصلی در رابطه با میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا، افزایش مقاومت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هاست. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به بتالاکتام تحت تیمار با سینامون و آلیسین کاهش بیان ژن مقاومت به بتالاکتام را نسبت به سویه تیمار نشده نشان می‌دهند و نتیجه اینکه تیمار با سینامون و آلیسین منجر به کاهش مقاومت به بتالاکتام می‌شود. پیشنهاد می‌گردد، دو ماده مؤثر سینامون و آلیسین، در کنار داروهای شیمیایی برای مبارزه با عفونت‌های ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا، بعد از انجام آزمایش‌های بالینی استاندارد استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، آلیسین، سینامون، بیان ژن، داکینگ مولکولی، RT-PCR.

## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب و عامل مهم حدود ده درصد از عفونت‌های بیمارستانی شایع به حساب می‌آید. مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری می‌تواند مقاومت‌های اکتسابی ناشی از انتقال پلاسمیدی باشد. یکی از عوامل تولید بتالاکتام‌هاست، این آنزیم‌ها می‌توانند بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند پنی‌سیلین و سفالوسپورین را غیرفعال کنند. این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث غیرفعال شدن آنها می‌شوند. پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های جدید از قبیل سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و رواج استفاده از آنها در درمان عفونت‌ها باعث پیدایش دسته جدیدی از این آنزیم‌ها به نام بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) شده است. در طی سال‌های گذشته شیوع سویه‌های مولد بتالاکتام رو به افزایش بوده و منجر به محدودیت درمان‌های دارویی شده است. درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله سودوموناس آئروژینوزا در افراد دچار سوختگی‌های شدید بسیار مشکل است، زیرا این باکتری مقاومت بالایی به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج دارد. از علل اصلی این مقاومت، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط این باکتری می‌باشد، که هم کلاس A این گروه از آنزیم‌ها، بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) و هم کلاس B آن متالوبتالاکتاماز (MBL)، در سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد (Tramperstranders et al., 2005; Dobrindt et al., 2004). در مطالعه‌ای که سپهری سرشت و همکاران انجام دادند، نتایج نشان داد که

سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان سوختگی مطهری غالب هستند و در این سویه‌ها تولید بتالاکتاماز با واسطه پلاسمید انجام می‌شود. بنابراین احتمال می‌رود این پلاسمیدها مقاومت را به سایر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا و یا به گونه‌های باکتری‌های دیگر منتقل نمایند (Sepehri et al., 2007).

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها از زمان‌های بسیار قدیم رایج بوده است، با پیشرفت زندگی شهری و افزایش جمعیت به تدریج از مصرف گیاهان دارویی کاسته و داروهای شیمیایی جایگزین آنها شده‌اند، البته با مصرف این داروها نیز مشکلاتی از قبیل مقاومت روزافزون در میکروارگانسیم‌ها و کاهش تأثیر در اثر کاربرد مداوم ایجاد شده است. درمان به وسیله گیاهان دارویی در مقایسه با داروهای شیمیایی، ارزان‌تر و آسان‌تر بوده و عوارض جانبی کمتری را به همراه دارد، از سویی تمایل مردم به مصرف داروهای گیاهی بیشتر از داروهای شیمیایی است (Sharififar et al., 2007; Karim et al., 2011). در میان گیاهان خوراکی، گیاه سیر همواره به عنوان یک داروی معجزه‌آسا با اثرهای درمانی گسترده مورد توجه می‌باشد (Hung et al., 1999).

سیر گیاهی تک لپه، با نام علمی *Allium sativum* از تیره لاله است و به دلیل دارا بودن خواص درمانی از قبیل، معالجه ناراحتی‌های قلبی، درد مفاصل، سردرد، سل، جذام، صرع، سرفه و سوء هاضمه در طول هزاران سال استفاده دارویی داشته است. اثرهای دارویی سیر به دلیل وجود ترکیب‌های

آنتی‌بیوتیک‌ها دارای اثرهای مؤثری در مهار این باکتری‌ها می‌باشد. این گیاه، بومی سریلانکا و جنوب هند است و پوست درختچه آن به‌عنوان ادویه به‌کار می‌رود (Shen *et al.*, 2002؛ Jayaprakasha *et al.*, 2000). دیدار در مطالعه‌ای نشان داد که هیدروسول استخراجی از دارچین دارای اثر ضدباکتریایی و ضدکپکی و دارای اثر ضدآنتی‌بیوتیکی است (Didar, 2019). در مطالعه‌ای Utcharyakiat و همکاران در شهر بانکوک کشور تایلند نشان دادند که روغن پوست دارچین و سینامالدهید ممکن است ترکیب‌های طبیعی فعالی باشند که می‌تواند به‌عنوان درمان جایگزین برای عفونت سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو مورد بررسی قرار گیرد (Utcharyakiat *et al.*, 2016).

تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر تأثیر عصاره‌های گیاهی بر روی طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه، جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یکی از باکتری‌های مهم عفونت بیمارستانی و اثر ماده مؤثره گیاهی آلیسین و سینامون بر سودوموناس‌های مقاوم به بتالاکتام تحت شرایط در شیشه (*in vitro*) و مطالعه بیوانفورماتیکی آن (*insilico*) و الگوریتم ژنتیکی Lamarckian GA می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری و جداسازی باکتری

مواد مؤثره گیاهی آلیسین و سینامون از شرکت سیگما آلمان به‌صورت محلول (آماده) خریداری شد و سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از آزمایشگاه بیمارستان رازی شهر رشت تهیه و برای تأیید سویه و خالص‌سازی باکتری آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلف شامل بررسی قابلیت تولید همولیزین، اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، قابلیت رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، منظره رشد در محیط‌های کشت مک کانکی آگار، TSI و SIM و منظره رشد در محیط مولر هینتون آگار انجام شد. همچنین مرفولوژی کلنی و باکتری و نوع رنگ‌پذیری در رنگ‌آمیزی گرم بررسی گردید (Forbes *et al.*, 2002).

ارگانوسولفور به نام آلیسین است. این ترکیب حدود ۱/۵ درصد وزن گیاه را تشکیل داده و عامل بوی سیر است. آلیسین در سیر تازه به‌صورت یک پیش‌ماده به نام آلتین بی‌رنگ و بی‌بو می‌باشد. زمانی که غشاء سلولی سیر با خرد شدن یا جویدن تخریب می‌شود، پیش‌ماده آلتین در تماس با آنزیم آلتیناز قرار گرفته و طی یک واکنش شیمیایی آلتین برای تشکیل یک مولکول آلیسین و دو مولکول دی‌سولفید هیدرولیز می‌شود. مقدار آلیسین تولید شده بستگی به مقدار آلتین در سیر و پایداری آنزیم آلتیناز دارد (Rabinkov *et al.*, 1998).

مطالعه گیاهان دارویی به‌منظور کشف روش‌های درمانی جدید که دارای عوارض جانبی کمتر و ارزش اقتصادی بالاتری می‌باشند، در سطح جهان اهمیت خاصی پیدا کرده است. همچنین سیر دارای خواص ضد میکروبی، ضدقارچی، ضد ویروسی و خلط‌آور نیز می‌باشد (Yusha *et al.*, 2008). مطابق مطالعه Donkert و همکاران (۱۹۷۹) غلظت بالای عصاره سیر دارای اثر باکتری‌کشی بر روی سودوموناس آئروژینوزا بود. در مطالعه Block (۱۹۸۵) حساسیت باکتری‌های مختلف و ایزوله‌های کلینیکی به ترکیب‌های خالص آلیسین خیلی چشمگیر بود. در بررسی مقایسه‌ای دیگری، اثر همکاری عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک توبرمایسین بر کاهش بیان ژن‌های دخیل در کروموسوم سنسینگ در سودوموناس آئروژینوز مثبت بود (Gods Zadeh *et al.*, 2021).

دارچین (*Cinnamomum verum*) از قطعات خشک شده پوست درخت و از تیره برگ‌بو است که در غذاها به‌عنوان ادویه و در داروها استفاده می‌شود. دارچین حاوی ترکیب‌های فنولی و غیرفنولی با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا می‌باشد. این ترکیب‌ها به‌عنوان عوامل احیاءکننده و بی‌اثرکننده رادیکال‌های پراکسید و شلات‌کننده فلزات عمل نموده و از واکنش‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند. دارچین دارای خواص درمانی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت، ضد ویروس و ضد اسپاسم است (Mirfeizi *et al.*, 2014؛ Ghandehari *et al.*, 2014؛ Sharifzadeh *et al.*, 2016). عصاره دارچین بر روی باکتری‌های عامل عفونت ادراری از جمله سودوموناس آئروژینوزا و غیره اثر دارد، این عصاره در مقایسه با

## آزمایش دیسک دیفیوژن

می‌باشند. اولین لوله‌ای که در آن کدورت مشاهده نمی‌شود، به‌عنوان MIC گزارش می‌گردد.

## محاسبه حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)

حداقل غلظت باکتری‌کشی، حداقل غلظت یک داروی ضد میکروبی است که باعث کاهش سه‌لگاریتی (۹۹/۹ درصد کشندگی) سویه باکتری می‌شود. از طریق چشمی، کدورت لوله‌ها، به‌دلیل رنگی بودن مواد مؤثره به‌سختی قابل تشخیص است، در نتیجه، محتویات هر لوله، روی پلیت دارای محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت خطی داده شد تا میزان رشد و عدم رشد باکتری مشاهده شود. از لوله شماره یک تا پنج، بر روی پلیت شماره یک تا پنج، به‌ترتیب کشت خطی داده شد. در ادامه، پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت، داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پیش فرض این است، به‌ترتیب از پلیت شماره یک تا پنج، شاهد افزایش رشد باکتری باشیم. هرچه در پلیت‌های ابتدایی‌تر رشد باکتری دیده نشود ماده مؤثر مورد مطالعه دارای خواص ضد میکروبی قوی‌تری خواهد بود.

مطالعه بیوانفورماتیکی (*insilico*)

برای مطالعه بیوانفورماتیک و آماده‌سازی لیگاند و پروتئین، ساختار سه‌بعدی آلپسین و سینامون و پروتئین‌های هر دو به‌ترتیب از پایگاه داده <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> و [www.rcbs.org](http://www.rcbs.org) به‌دست آمدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار Discover Studio بارهای قابل چرخش و مرکز ثقل مولکول در تمامی باندها مشخص شد و بعد از اضافه شدن اتم‌های هیدروژن قطبی به پروتئین و حذف مولکول‌های آب، بار کلی آن با استفاده از شارژ کالمن تعیین گردید. داکینگ مولکولی برای پروتئین در ۲۰۰ مرتبه مستقل تکرار شد. در این مطالعه الگوریتم زنتیک Lamarckian GA مورد استفاده قرار گرفت و اطلاعات به‌دست آمده تجزیه و تحلیل گردید. در این روش پروتئین‌هایی که بیشترین میان‌کنش را با آلپسین و

در این آزمایش از ۲۰ سویه بالینی تهیه شده از آزمایشگاه بیمارستان رازی شهر رشت استفاده شد. ابتدا روی محیط کشت مولر هینتون آگار باکتری سودوموناس آروژینوزا در کنار شعله و محیط استریل به‌ترتیب کشت داده شد، سپس دیسک‌های بلانک (Blank) به مقدار ۱۰ میکرولیتر به عصاره گیاهی آلپسین و سینامون آغشته و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک Cabapenem براساس دستورالعمل CLSI به‌عنوان شاهد مثبت و دیسک بلانک آغشته به آب مقطر به‌عنوان شاهد منفی روی محیط کشت قرار گرفت، در ادامه پلیت‌ها داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شدند.

## تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC)

حداقل غلظت مهاری، کمترین غلظت یک ماده شیمیایی است که از رشد قابل مشاهده باکتری جلوگیری می‌کند. برای انجام این آزمایش، پنج لوله آزمایش تمیز و اتوکلاو شده انتخاب و به‌ترتیب شماره‌گذاری شدند. در هر لوله، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون برات ریخته شد. سپس در اولین لوله، ۰/۵ میلی‌لیتر ماده مؤثر (غلظت سینامون ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آلپسین ۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ریخته و کاملاً مخلوط گردید. به کمک سمپلر استریل، ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله اول برداشت و در لوله دوم ریخته شد و پس از به‌هم‌زدن دوباره، نیمی از آن به لوله بعدی انتقال داده شد و به‌همین صورت تا لوله پنجم ادامه یافت. از لوله پنجم، به‌وسیله سمپلر، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول برداشت و دور ریخته شد. به این ترتیب، رقت ۱:۲ تا ۱:۳۲ تهیه گردید. سپس به همه لوله‌ها، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (نیم مک‌فارلند) اضافه گردید. دهانه همه لوله‌ها با پنبه پلمپ و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در روش MIC، لوله‌هایی که کدورت نداشته و زلال و شفاف هستند فاقد رشد باکتری بوده و لوله‌های کدر، نماینده رشد باکتری‌ها

سینامون داشته‌اند طی آنالیزهای متعدد نرم‌افزاری و تفسیر نتایج حاصل مشخص گردید.

#### روش کار مولکولی

ابتدا باکتری‌ها را با غلظت SubMIC آلیسین (۰/۰۰۱) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و سینامون (۰/۱۲۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تیمار کرده و یک گروه از باکتری‌ها بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل قرار داده شد. استخراج RNA با استفاده از کیت Sina pure (سیناکلون، ایران) انجام شد.

#### سنتز cDNA با استفاده از کیت سیناکلون

در مرحله اول سنتز cDNA، ۳ میکرولیتر Total RNA و ۱ میکرولیتر Random Hexamer و ۱ میکرولیتر Depc water و ۵ میکرولیتر dNTP mix و میکروتیوب ریخته و مواد مزبور به آرامی مخلوط شدند. در ادامه، مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس درون ترموسایکلر انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون و خروج از دستگاه بلافاصله به مدت ۲-۳ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس برای سنتز cDNA به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند، در ادامه cDNA سنتز شده پس از خروج از دستگاه در دمای ۲۰- سلسیوس برای انجام واکنش‌های بعدی نگهداری شد.

#### نحوه انجام واکنش RT-PCR با ژن مرجع *16srRNA*

ترکیب مواد برای انجام واکنش ریل‌تایم PCR طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (سیناکلون، ایران) در

میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری به شرح زیر انجام گردید.

#### برنامه دمایی برای انجام آزمون qPCR

برنامه زمانی و دمایی دستگاه Real-time PCR thermocycler برای سنجش تغییرات بیان ژن عبارتند از: دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، دمای واسرشت‌سازی ثانویه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و دمای اتصال ۵۰-۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه. این آزمون در ۴۰ چرخه تکرار شد.

#### توالی پرایمرها

ژن *16SrRNA* در باکتری‌ها، یک ژن بسیار حفاظت‌شده (Housekeeping) است. به دلیل پایداری در باکتری‌ها در اغلب آزمایش‌های مربوط به بیان ژن هدف در کنار سایر پرایمرها به‌عنوان مرجع در نرمال‌سازی داده‌ها استفاده می‌شود. ژن *blaIMP* نیز به‌عنوان ژن هدف انتخاب شده، زیرا آنزیم متالو-بتالاکتاماز IMP را کد می‌کند که یکی از مهمترین سازوکارهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری‌هاست و هدف مداخله درمانی یا مهارگری است. توالی پرایمرهای مورد استفاده به‌صورت اختصاصی برای ژن‌های هدف در این مطالعه با نرم‌افزار primer 3 plus طراحی شدند. از آنجایی که این پرایمرها بر روی نواحی حفاظت‌شده در توالی‌های چندگانه همتراز شده از ژن‌های *16SrRNA* و *blaIMP* طراحی شده‌اند و یک توالی ژنومی منفرد و خاص به‌عنوان مرجع برای طراحی به‌کار نرفته است، بنابراین ارجاع به یک شماره دسترسی واحد که مورد استفاده باشد مناسب به‌نظر نمی‌آید (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

Table 1. The used primer sequences

Gene name	Size (bp)	Primer sequence
F- <i>16SrRNA</i>	120	AGCATTTCGGATGGGAACCTTA
R- <i>16SrRNA</i>		GTCGTCCCCGCCTTCCT
F- <i>blaIMP</i>	120	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC
R- <i>blaIMP</i>		GTAAGTTTCAAGAGTGATGC

## نتایج

هاله عدم رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مداخله با ماده مؤثره آلیسین برابر با ۱۶ mm و ماده مؤثره گیاهی سینامون برابر با ۱۷ mm بود. برای ماده مؤثره گیاهی آلیسین در سویه شماره ۱، MIC، ۰/۰۰۱، و MBC mg.mL<sup>-1</sup> ۰/۰۰۲ و در ۴ سویه دیگر MIC و MBC یکسان به ترتیب ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۴ mg.mL<sup>-1</sup> گزارش شد و برای ماده مؤثره گیاهی سینامون در سویه شماره ۱، MIC، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ mg.mL<sup>-1</sup> MBC و در ۴ سویه دیگر، MIC ۰/۲۵ و MBC mg.mL<sup>-1</sup> ۰/۵ به دست آمد (جدول ۲).

در این تحقیق از ۲۰ سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. شناسایی باکتری براساس مرفولوژی کلنی، بوی کلنی، تشکیل رنگ‌دانه در محیط آگار مولر هینتون، تولید همولیزین بر روی آگار خون‌دار، مشاهده مورفولوژی باکتری در رنگ‌آمیزی گرم (باسیل گرم منفی)، مثبت بودن تست اکسیداز، رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس بر روی آگار مغذی، مثبت بودن تست حرکت، عدم تخمیر قندها در محیط‌های مک کانکی و TSI به‌عنوان سودوموناس شناسایی شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میانگین قطر

جدول ۲- حداقل غلظت مهاری و کشندگی مواد مؤثره گیاهی آلیسین و سینامون بر نوع مقاوم سودوموناس آئروژینوزا

Table 2. MIC and MBC of allicin and cinnamon against resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Cinnamon MBC (mg.mL <sup>-1</sup> )	Allicin MBC mg.mL <sup>-1</sup>	Cinnamon MIC mg.mL <sup>-1</sup>	Allicin MIC mg.mL <sup>-1</sup>	Bacteria Starin
0.25	0.002	0.125	0.001	1
0.5	0.004	0.25	0.002	2
0.5	0.004	0.25	0.002	3
0.5	0.004	0.25	0.002	4
0.5	0.004	0.25	0.002	5

سینامون (لیگاند یا متصل‌شده) بیشترین تأثیر را بر روی پروتئین بتالاکتاماز دارد و سینامون توانسته تأثیر مطلوبی بر روی تضعیف عملکرد و فعالیت پروتئین بتالاکتاماز بگذارد، در نتیجه منجر به تنزل میزان مقاومت باکتریایی گردد. اختلاف کم حداقل انرژی آزاد اتصال ( $\Delta G$ ) دو ماده مؤثره سینامون و آلیسین بر بتالاکتاماز، با برهم‌کنش داروی کنترل سولفونامید و بتالاکتاماز ( $-5/34 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )، به ترتیب  $-0/51 \text{ kcal.mol}^{-1}$  و  $-1/1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ، نشان می‌دهد که تأثیر و برهم‌کنش سینامون و آلیسین بر پروتئین بتالاکتاماز مثبت است (جدول ۳).

برای یافتن اینکه ماده مؤثره آلیسین و سینامون، کدامیک، روی پروتئین بتالاکتاماز اثر مهاری بهتری دارد، آزمایش با سه بار تکرار برای هر یک از مواد مؤثره انجام شد، تا نتیجه دقیق‌تری حاصل شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که داکینگ مولکولی بین سینامون و پروتئین بتالاکتاماز پایین‌ترین سطح حداقل انرژی آزاد اتصال ( $\Delta G$ ) را دارد ( $-4/83 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) و در مقابل، انرژی اتصال بین آلیسین و پروتئین بتالاکتاماز برابر با  $-4/24 \text{ kcal.mol}^{-1}$  می‌باشد. با توجه به داده‌ها، می‌توان به این نتیجه رسید که ماده مؤثره

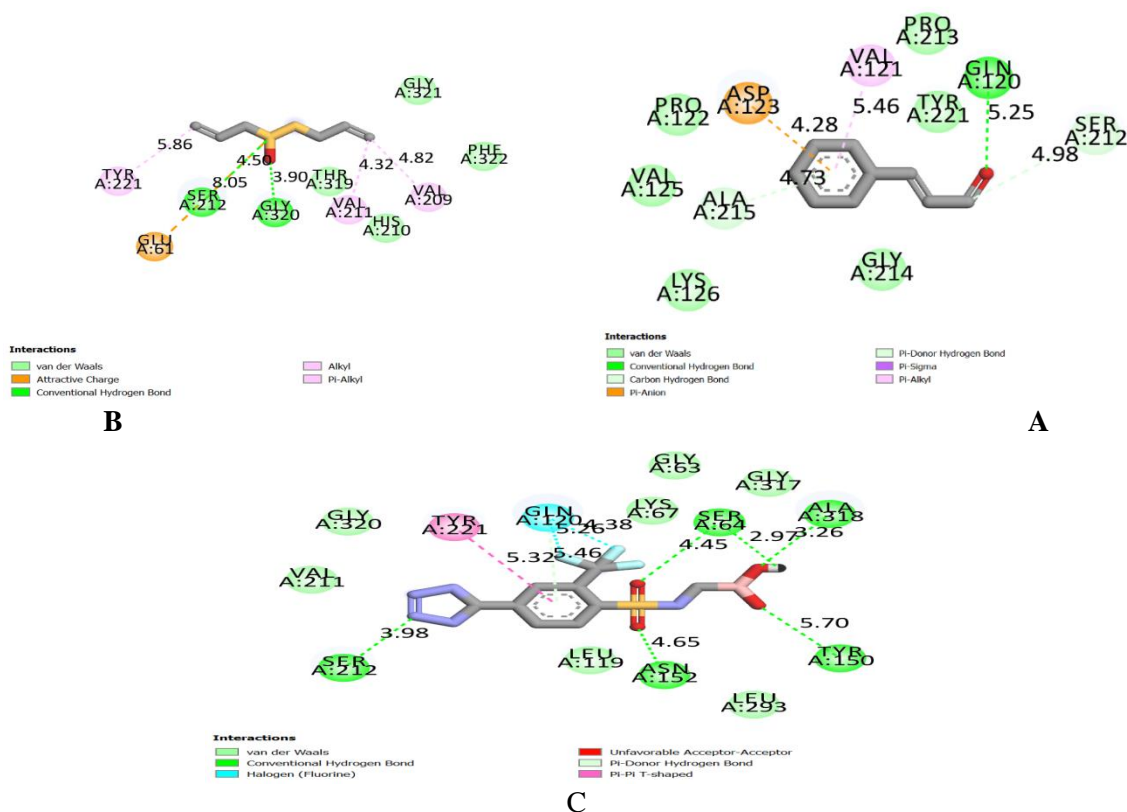
جدول ۳- داکینگ مولکولی بتالاکتاماز با لیگاندهای آلیسین، سینامون و سولفونامید

Table 3.  $\beta$ -lactamase molecular docking with allicin, cinnamon, and sulfonamide

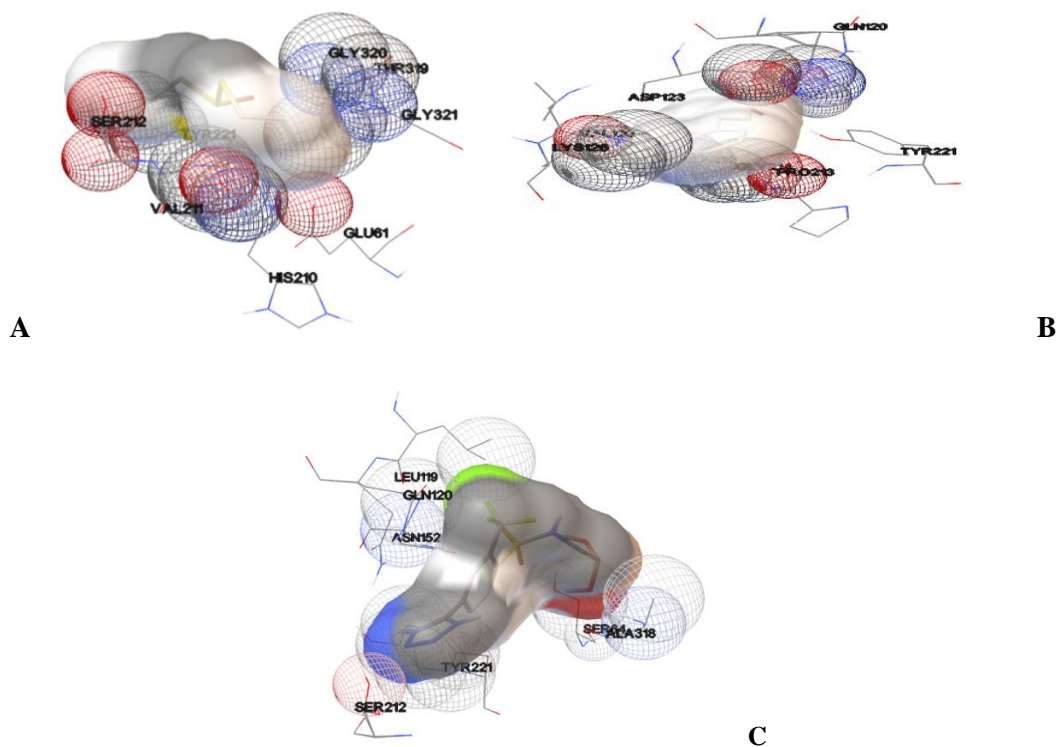
Amino acids involved in the interaction	( $\Delta G$ ) kcal.mol <sup>-1</sup>	Ligand
GLY – PHF – VAL – HIS – THR – SER – GLU – TYR	-4.24	Allicin
GLN – SER – TYR – PRO – VAL – ASP – ALA – LYS – GLY	-4.83	Cinnamon
ALA – TYR – GLY – SER – LYS – LEU – ASN – GLN – VAL	-5.34	Sulfonamide

ارتباط معکوس دارد. با توجه به مشاهدات، نتایج برهم‌کنش اسیدهای آمینه پروتئین بتالاکتاماز و مواد مؤثره سینامون و آلیسین نیز مثبت ارزیابی می‌شود. پنج پیوند هیدروژنی بین اسیدهای آمینه سرین، تیروزین، آلانین و آسپاراژین پروتئین بتالاکتاماز و داروی کنترل سولفونامید تشکیل و اسیدهای آمینه تیروزین، لوسین، آسپاراژین، سرین، والین، گلیسین، لیزین، گلوتامیک‌اسید و آلانین در زنجیره A بتالاکتاماز با سولفونامید مطابق شکل ۱ برهم‌کنش نشان دادند. نتایج، اثر مهاری مطلوب سینامون و آلیسین بر بتالاکتاماز را در مقایسه با داروی کنترل سولفونامید نشان می‌دهد (شکل ۱ و ۲ و جدول ۳).

آمینواسیدهای گلیسین، سرین، تیروزین، والین، هیستیدین، فنیل‌آلانین و گلوتامیک‌اسید در زنجیره A پروتئین بتالاکتاماز، توسط طول پیوندهای متفاوت هیدروژنی به مولکول آلیسین متصل شدند. دو اسید آمینه، گلیسین با طول پیوند هیدروژنی ۳/۹۰ و تیروزین با طول پیوند ۴/۵۰ پیکومتر، به آلیسین متصل گردیدند. یک پیوند هیدروژنی بین مولکول سینامون و اسید آمینه گلیسین پروتئین بتالاکتاماز با طول پیوند ۵/۲۵ پیکومتر تشکیل گردید. آمینواسیدهای گلیسین، سرین، تیروزین، والین، پرولین، آلانین، لیزین و گلوتامیک‌اسید در زنجیره A پروتئین بتالاکتاماز به مولکول سینامون متصل شدند. طول پیوند، با استحکام پیوند و انرژی تفکیک پیوند



شکل ۱- تصویر دوبعدی برهم‌کنش آلیسین (A)، سینامون (B) و سولفونامید (C) با بتالاکتاماز با استفاده از نرم‌افزار Chimera 1.14  
**Figure 1. Two-dimensional illustration of the interaction between cinnamon (A), allicin (B), and sulfonamide (C) with  $\beta$ -lactamase using Chimera 1.14 software**



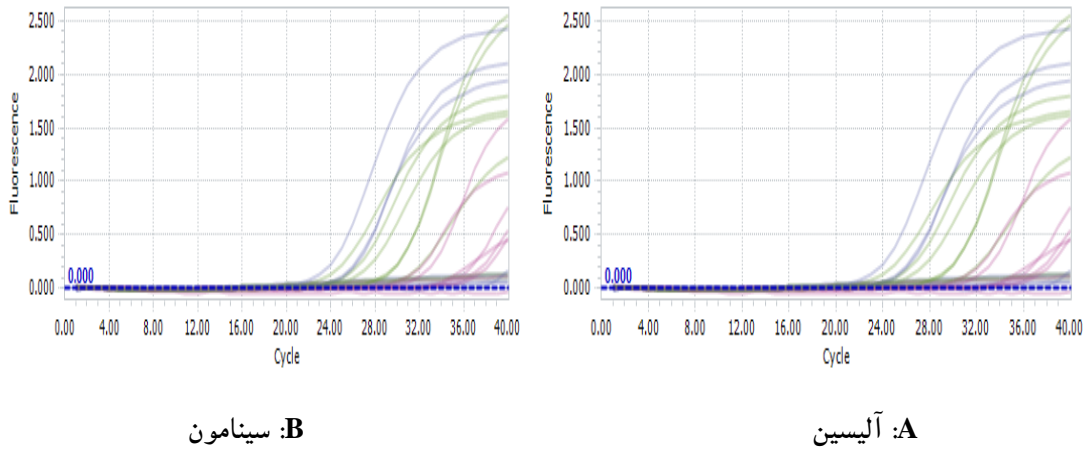
شکل ۲- تصویر سه بعدی از برهم کنش بین آلیسین (A) و سینامون (B)، سولفونامید (C) و بتالاکتاماز با استفاده از نرم افزار Chimera

#### 1.14

Figure 2. Three-dimensional illustration of the interaction between Allicin (A), Cinamon (B), Sulfonamide (C) and  $\beta$ -lactamase using Chimera 1.14 software

ترکیب هدف و تیمار نشده نشان می‌دهند. محور افقی (Cycle) نشان‌دهنده تعداد چرخه‌های تکثیر است و محور عمودی (Fluorescence) بیانگر میزان فلورسانس تولیدشده بر اثر تکثیر محصول PCR است که متناسب با مقدار DNA هدف در هر چرخه می‌باشد. نتیجه نشان می‌دهد که در گروه تیمار شده با ترکیب هدف، منحنی تکثیر ژن *blaIMP* به چرخه‌های بالاتری (Ct value بالاتر) تغییر کرده است که نشان‌دهنده کاهش مقدار غلظت اولیه الگو و کاهش بیان این ژن نسبت به گروه تیمار نشده است. در مقابل، منحنی مربوط به ژن کنترل *16SrRNA* در هر دو گروه در چرخه‌های مشابهی ظاهر شد.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده، سوبه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به بتالاکتام تحت تیمار با سینامون و آلیسین کاهش بیان ژن مقاومت به بتالاکتام را نسبت به سوبه تیمار نشده نشان می‌دهند و نتیجه اینکه تیمار با مواد مؤثره مذکور، منجر به کاهش مقاومت به بتالاکتام می‌گردد. شکل ۳ یک نمودار Real-time PCR (Quantitative PCR) را نشان می‌دهد که خروجی استاندارد دستگاه Real-time PCR thermocycler است. این نمودارها، منحنی‌های تکثیر (Amplification Curves) را برای دو ژن هدف *blaIMP* (ژن مقاومت به بتالاکتام) و ژن کنترل داخلی *16SrRNA* در دو گروه تیمار شده با



شکل ۳- نمودار تکثیر مربوط به ژن های *blaIMP* و *16SrRNA* گروه تیمار شده با آلیسین و سینامون و تیمار نشده در باکتری سودوموناس آئروژینوزا

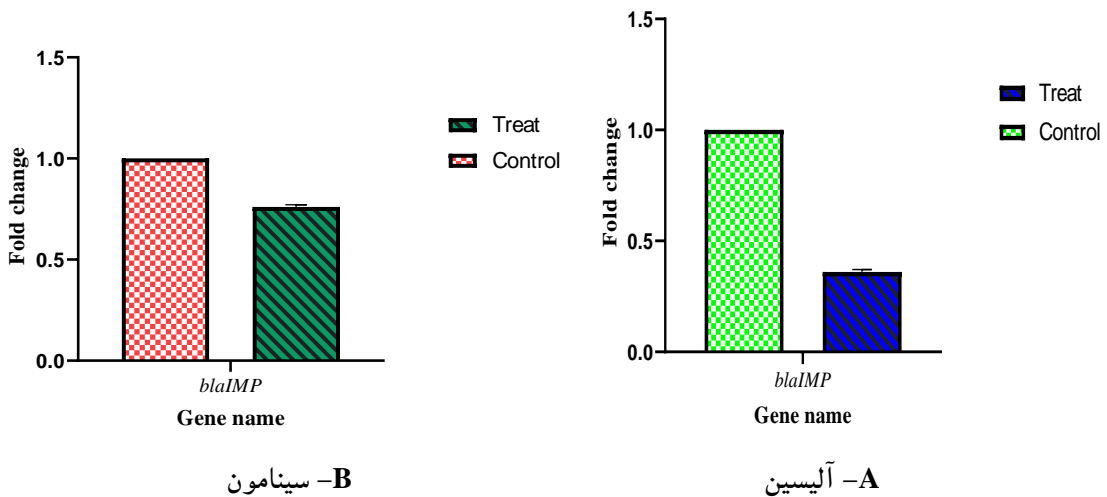
خطوط آبی در نمودار تیمار نشده (بیان ژن بالا) و خطوط صورتی تیمار شده (کاهش بیان ژن) می باشد.

**Fiuger 3. Amplification diagram of *blaIMP* and *16SrRNA* genes of allicin and cinnamon treated and untreated groups in *Pseudomonas aeruginosa***

blue lines in the diagram are untreated (high gene expression) and pink lines are treated (decrease gene expression).

نسبت به سویه تیمار نشده نشان می دهد و داده ها نشان داد که تیمار با آلیسین منجر به کاهش بیشتر بیان ژن مقاومت به بتالاکتام می گردد (شکل ۴).

داده های ارزیابی تغییر بیان ژن در سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به بتالاکتام تحت تیمار با آلیسین و سینامون کاهش بیان ژن مقاومت به بتالاکتام را



شکل ۴- بیان ژن *blaIMP* در سودوموناس آئروژینوزا تحت تیمار با آلیسین و سینامون

**Fiuger 4. *blaIMP* gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* affected by allicin and cinnamon treatments**

## بحث

روی تعدادی از باکتری‌ها و مخمرها از جمله سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس را بررسی کردند. مطابق این بررسی همه ارگانسیم‌ها به وسیله عصاره سیر مهار شدند. غلظت بالای از عصاره سیر دارای اثر باکتری‌کشی بر روی سودوموناس آئروژینوزا بود. در مطالعه دیگری مشخص شد که عصاره سیر بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بوده و این باکتری را نابود می‌کند (Fitriana et al., 2019).

در مطالعه Yadav و همکاران (۲۰۱۹) هم نتایج نشان داد که عصاره گیاهی سیر دارای اثر ضد میکروبی بالایی علیه *E. coli*، با قطر هاله مهاری ۳۵-۱۷ mm و استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله مهاری ۱۶-۳۰ mm است. Bidakhti و Ebrahimi (۱۹۹۳) عصاره کلروفومی سیر با اثر ضد میکروبی بالا با استفاده از دیسک ۱۶۰۰ میکروگرمی را بر روی سودوموناس آئروژینوزا گزارش کردند. در مطالعه Vasconcelos و همکاران (۲۰۱۸) در راستای بررسی سازوکار اثرهای ضد میکروبی دارچین، گزارش نمودند که گیاه دارچین سبب صدمه به غشاء سلولی، تغییر پروفایل لیپیدها، ممانعت از فعالیت آنزیم ATPases و تقسیم سلولی، سبب مرگ باکتری‌های گرم منفی و مثبت می‌گردد. بیشترین اثر ضد میکروبی دارچین به سینامالدهید و سینامیک اسید نسبت داده شده است.

گیاهان خوراکی، ادویه‌جات و سبزیجات معطر که قابلیت ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند، می‌توانند جایگزین‌های طبیعی قابل قبولی برای مواد نگهدارنده شیمیایی باشند. تحقیقات انجام شده در طی سال‌های اخیر، تأثیر عصاره‌های گیاهی ذکر شده را بر روی طیف گسترده‌ای از میکروارگانسیم‌ها شامل باکتری، کپک و مخمر نشان می‌دهد. اگرچه در مورد طیف فعالیت و قدرت عصاره‌های گیاهی اختلاف وجود دارد، اما هر دو اثر میکروب‌کشی و ممانعت از رشد میکروب برای اسانس‌های گیاهی در متون علمی گزارش شده است. اسانس‌های گیاهی را می‌توان به‌عنوان عوامل ضد میکروبی در محصولات که با طعم آنها سازگار باشد، استفاده کرد. در این مطالعه، سوبه‌های سودوموناس

باتوجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، تلاش برای دستیابی به آگاهی‌های بیشتر از موارد استفاده مؤثره ترکیبات موجود در گیاهان و کاربردشان در درمان بیماری‌های مختلف انجام شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در همه کشورهای جهان یکی از معضلات مهم در درمان بیماری‌های عفونی می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب بیمارستانی عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها محسوب می‌شود، که ممکن است به دلیل داشتن ژن‌های خاص، با مقاومت بالای دارویی همراه باشد. در این تحقیق، از ۲۰ سوبه بالینی تهیه شده از آزمایشگاه بیمارستان رازی شهر رشت، استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مداخله با ماده مؤثره آلیسین برابر با ۱۶ mm و سینامون برابر با ۱۷ mm بود. داده‌های داکینگ مولکولی نشان داد، برهم‌کنش بین سینامون و پروتئین بتالاکتاماز پایین‌ترین سطح حداقل انرژی آزاد اتصال ( $\Delta G$ ) را دارا می‌باشد ( $-4/83 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) و در مقابل، انرژی اتصال بین آلیسین و پروتئین بتالاکتاماز برابر با  $-4/24 \text{ kcal.mol}^{-1}$  است. با توجه به داده‌ها، می‌توان به این نتیجه رسید که ماده مؤثره سینامون (لیگاند یا متصل‌شده) بیشترین تأثیر را بر روی پروتئین بتالاکتاماز دارد و سینامون توانسته تأثیر مطلوبی بر روی تضعیف عملکرد و فعالیت پروتئین بتالاکتاماز بگذارد و منجر به تنزل میزان مقاومت باکتریایی گردد. نتایج داکینگ مولکولی، اثر ضد میکروبی مطلوب دو ماده مؤثره مورد بررسی در مطالعه ما، سینامون و آلیسین را گزارش می‌دهند. در مطالعه نوری‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۴ قطر هاله عدم رشد برای گیاه دارچین در عصاره آبی ۱۷ mm و در عصاره الکلی ۱۲ mm گزارش شد، نتایج نشان داد که گیاه مورد آزمایش دارای خاصیت ضدباکتریایی بوده و نتایجی همسو با مطالعه ما دارد (Norizadeh et al., 2007). در مطالعه‌ای دیگر، Donkert و همکاران (۱۹۷۹) اثر مهارنده عصاره سیر، پیاز و موسیر به‌روش تست دیسک دیفیوژن بر

نتایج تأکیدی بر کاربرد روزمره آن، همانند مطالعه ما می‌باشد (Nojookambari *et al.*, 2019).

سازوکارهای مقاومت دارویی این باکتری به دو گروه ذاتی و اکتسابی تقسیم می‌شوند. این باکتری‌ها به دلیل نفوذپذیری کم غشاء خارجی، بیان دائمی چندین پمپ افلاکس و تولید انواع آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌ها (مانند سفالوسپورینازها) به‌طور ذاتی به چندین آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند و به آسانی ژن‌های مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها را به‌راحتی از سایر باکتری‌ها کسب می‌کنند و افزایش سویه‌های با مقاومت چندگانه در آنها به‌سرعت در حال گسترش است. افزایش سویه‌های مقاوم این باکتری‌ها معضل بهداشتی جهانی بوده در نقاط مختلف دنیا گزارش شده است و سبب کاهش گزینه‌های درمانی عفونت ناشی از این باکتری‌ها می‌گردد (Kumar *et al.*, 2012; Tsakris *et al.*, 2009). با گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و پیدایش سویه‌های مقاوم، به‌ویژه در باکتری‌های گرم منفی، اثر ترکیبی آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعات مختلف بررسی شده است. دلایل استفاده از ترکیب آنتی‌بیوتیکی در درمان عفونت‌های ناشی از ایزوله‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا، فراهم نمودن طیف وسیع آنتی‌بیوتیکی برای درمان عفونت‌های بیماران بدحال، کاهش سویه‌های مقاوم، کاهش سمیت وابسته به غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش قدرت مهار و اثرکشندگی میکروب‌ها می‌باشد (Soltan *et al.*, 2014).

در این بررسی، حداقل انرژی آزاد اتصال آلیسین و سینامون ( $4/24 \Delta G \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) و  $\Delta G$  سولفونامید  $5/34 \text{ kcal.mol}^{-1}$  و سینامون  $4/83 \text{ kcal.mol}^{-1}$  و  $\Delta G$  سولفونامید  $5/34 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) به‌دست آمد که اختلاف کم  $\Delta G$  آلیسین و سینامون داروی کنترل نشان داد که تأثیر آنها مثبت است. تعداد پیوندهای هیدروژنی در آلیسین و سینامون با سولفونامید به ترتیب (۲ و ۵) و (۱ و ۰) بود که در برهم‌کنش میان آلیسین و بتالاکتاماز  $GLY320$ : A و  $SER212$ : A و در برهم‌کنش بین سولفونامید و بتالاکتاماز  $TYR150$ : A-  $ASN152$ : A-  $ALA$ : A-  $SER$

آئروژینوزا با مقاومت آنتی‌بیوتیکی از نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه بیمارستان رازی شهر رشت جداسازی شدند و اثر ماده مؤثره سینامون موجود در گیاه دارچین و آلیسین موجود در گیاه سیر بر سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به بتالاکتام تحت شرایط درشیشه به روش اصلاح شده انتشار دیسک، MIC و MBC انجام و مطالعه بیوانفورماتیکی الگوریتم ژنتیکی Lamarckian GA مورد استفاده و بررسی شد. در مطالعه دیگری حداقل غلظت مهارکننده (MIC) برای باکتری *E. coli* ( $30 \text{ mg. mL}^{-1}$ ) و *S. aureus* ( $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) است (Yadav *et al.*, 2019).

در این مطالعه برای ماده مؤثر گیاهی آلیسین در سویه ۱، MIC  $0/001$  و  $MBC \text{ mg.mL}^{-1} 0/002$  و در ۴ سویه دیگر MIC و MBC یکسان و به ترتیب  $0/002$  و  $0/004$  گزارش شد و برای ماده مؤثره گیاهی سینامون در سویه شماره ۱، MIC  $0/125$  و  $MBC \text{ mg.mL}^{-1} 0/25$  و در ۴ سویه دیگر، MIC  $0/25$  و  $MBC \text{ mg.mL}^{-1} 0/5$  بدست آمد. در بررسی که توسط Wilson و Cutler (2004) انجام شد، نتایج نشان داد که عصاره سیر در غلظت  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  بیشترین MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و در غلظت  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (حداقل غلظت کشندگی)، همچنین بیشترین MBC را بر روی سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس داشته است. براساس گزارش‌های منتشر شده، در حال حاضر بیش از ۳۰ درصد داروهای گیاهی در بیمارستان‌ها و درمانگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. سیر دارای ترکیب‌های آلی گوگردار است که بسیار واکنش‌پذیرند و خاصیت ضد میکروبی وسیع بر روی باکتری‌ها حتی در غلظت‌های بسیار پایین دارند. آلیسین یا دی‌آلیل‌دی‌سولفیداکسید، مهمترین ترکیب گوگردی سیر با فعالیت ضد میکروبی است. همچنین، در مصر از سیر برای درمان تصلب شریان، فشارخون بالا، تقویت سیستم ایمنی و برای جلوگیری از سرطان استفاده می‌شود (Yusha *et al.*, 2008). دارچین، سیر و زنجبیل در فرم محلول در متانول، کلروفورم و استون می‌توانند اثرهای ضدباکتریایی مناسبی بر علیه باکتری‌های پاتوژن تولیدکننده MBL نشان دهند، این

متالوبتالاکتاماز در بیماری‌های عفونی، پزشکان را در تجویز رژیم صحیح آنتی‌بیوتیکی یاری داده و در کنترل انتشار مقاومت مؤثر است. به‌ویژه در سال‌های اخیر که مقاومت میکروبی در بیشتر گونه‌های باکتری‌ها رو به تزايد است، الزاماً به آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مناسب نیاز می‌باشد. بنابراین دانشمندان تحقیقات بر روی قسمت‌های مختلف گیاهان دارویی، برای کشف داروهای جدید با منشأ گیاهی را در اولویت قرار داده‌اند (Islam et al., 2010). جستجو برای ترکیب‌های جدید به‌منظور کنترل میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا برای بیشتر محققان جهان قابل توجه است. ترکیب‌های طبیعی تولید شده با متابولیسم ثانویه گیاهان، به‌عنوان آنتی‌بیوتیک طبیعی بر علیه تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا استفاده شده‌اند. امروزه یکی از مشکلات اصلی در رابطه با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا، افزایش مقاومت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها است. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به بتالاکتام تحت تیمار با سینامون و آلیسین کاهش بیان ژن مقاومت به بتالاکتام را نسبت به سویه تیمار نشده نشان می‌دهد و نتیجه اینکه تیمار با سینامون و آلیسین منجر به کاهش مقاومت به بتالاکتام می‌گردد. بنابراین پیشنهاد می‌شود ماده مؤثره سینامون و آلیسین در کنار داروهای شیمیایی، برای مبارزه با عفونت‌های ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا به‌کار رود و اثر کشندگی سینامون و آلیسین روی ویروس‌ها و قارچ‌ها بررسی گردد. از محدودیت‌های این پژوهش، اندازه کوچک حجم نمونه بود. برای دستیابی به نتایج دقیق‌تر، بررسی تعداد بیشتری باکتری مقاوم و نیز بررسی سویه‌های حساس نیز توصیه می‌گردد.

A: ۳۱۸-SER بود و در برهم‌کنش میان سینامون و بتالاکتاماز گلایسین A: GLN۱۲۰ بود و در برهم‌کنش بین سولفونامید و بتالاکتاماز A: TYR ۱۵۰- A: ASN ۱۵۲- A: ALA۳۱۸- A: SER۲۱۲ بود. فعالیت ضد میکروبی آلیسین می‌تواند به‌تنهایی یا به‌شکل ترکیبی، آنزیم بتالاکتام را در گونه‌های استافیلوکوکوس و سودوموناس آئروژینوزا مهار کند (Cai et al., 2007). در مطالعه ولدبیگی و همکاران آلیسین بر روی مهار فاکتورهای ویروالانس کمک‌کننده به کروموسوم سینسینگ برای تشکیل بیوفیلم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا مؤثر است (Valadbeigi et al., 2013). در مطالعه دیگری نشان داده شد، عصاره سیر بر روی تشکیل بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروژینوزا در عفونت‌های سیستمیک فیبروزیس مؤثر است (Ghodake et al., 2023). در مطالعه‌ای که Sepehri و همکاران (۲۰۰۷) در سال ۲۰۰۷ انجام دادند نتایج نشان داد که سویه‌های تولیدکننده بتالاکتاماز سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان سوختگی مطهری غالب هستند و در این سویه‌ها تولید بتالاکتاماز با واسطه پلاسمید انجام می‌شود. بنابراین احتمال دارد این پلاسمیدها مقاومت را به سایر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا و یا به گونه‌های دیگر باکتری‌ها منتقل نمایند. در مطالعه دیگری مشخص شد که روغن پوست دارچین و سینامالدئید بر سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو است و اثرهای هم‌افزایی در ترکیب با سایر عوامل ضد میکروبی دارد (Utcharyakiat et al., 2016). روغن دارچین در جلوگیری از مقاومت دارویی بر روی جدایه‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا از منابع انسانی و حیوانی مؤثر است (Valadbeigi et al., 2013). انجام آزمون‌های فنوتیپی در تشخیص ایزوله‌های مولد

## References

- Block, E., 1985. The chemistry of garlic and onions. Scientific American, 252(3): 114-119. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0385-114>
- Cai, Y., Wang, R., Pei, F. and Liang, B., 2007. Antibacterial activity of allicin alone and combination with  $\beta$ -lactamase against *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of Antibiotics, 60(5): 335-338. <https://doi.org/10.1038/ja.2007.45>
- Cutler, R.R. and Wilson, P., 2004. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. British Journal of Biomedical Science, 61(2): 71-74. <https://doi.org/10.1080/09674845.2004.11732646>
- Didar, Z., 2019. The study of antimicrobial and anti-

- enzymatic activity (potato poly-phenol oxidase) of *Cinnamomum verum* hydrosol: A laboratory study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 18(1): 3-16. <https://journal.rums.ac.ir/browse>
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J., 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(4): 414-24. <https://doi.org/10.1038/nrmicro884>
  - Donkert, J., Tromp, T.F., Devries, H. and Klasen, H.J., 1979. Antimicrobial activity of crude juices of *Allium ascalonicum*, *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Medizinische Microbiologie und Parasitologie*, 245(1-2): 229-39. <https://europepmc.org/article/med/44616>
  - Fitriana, N., Aniya, A., Pamasyah, F., Anam, M. and Lestari, S., 2019. The effectiveness comparison of single bulb garlic extract for antibacterial agent *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 276(1): 012028. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/276/1/012028>
  - Ghandehari yazdi, A.P., Nikooyi, A. and Sedaghat Broojeni, L., 2014. Review of pharmaceutical and functional properties of cinnamon. *Journal of Medicinal Herbs*, 5(3): 127-135. <https://sanad.iau.ir/Journal/jhd/Article/1009049>
  - Gharache Bidakhti, H. and Ebrahimi, A., 1993. Investigating the antibacterial and antifungal effects of different extracts of black seed, turmeric and garlic. Master's Thesis (Professional Doctorate), Mashhad University of Medical Sciences.
  - Ghodake, V., Dhoble, S. and Vavilala Sand Patravale, V., 2023. Anti-biofilm potential against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in cystic fibrosis infection by systemically developed garlic extract incorporated liposomal formulation. *Journal of Drug Delivery and Technology*, 82: 43-59. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104359>
  - Gods Zadeh, M., Moradi Bidhendi, S. and Ashrafi, F., 2021. Comparative study of garlic extract on the expression of genes involved in quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and the antibiotic Tobramycin. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 15(1): 107-120. <https://doi.org/10.30699/ijmm.15.1.107>
  - Islam, S., Rahman, A., Sheikh, M.I., Rahman, M., Jamal, A.H.M. and Alam, F., 2010. In vitro antibacterial activity of methanol seed extract of *Elettaria cardamomum* (L.) maton. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75(3): 113-117. <http://acs.agr.hr/acs/index.php/acs/article/view/561>
  - Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L. and Sakariah, K.K., 2000. Chemical composition of the flower oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48(9): 4294-4295. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf991395c>
  - Karim, A., Nouman, M., Munir, S. and Sattar, S., 2011. Pharmacology and phytochemistry of pakistani herbs and herbal drugs used for treatment of diabetes. *International Journal of Pharmacology*, 7: 419-439. <https://doi.org/10.3923/ijp.2011.419.439>
  - Kumar, S.H., De, A.S., Baveja, S.M. and Gore, M.A., 2012. Prevalence and risk factors of metallo-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in burns and surgical wards in a tertiary care hospital. *Journal of Laboratory Physicians*, 4(1): 39-42. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.98670>
  - Lihua, L., Jianhui, W., Jialin, Y. and Guaxin, L., 2013. Effects of allicin on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors. *Polish Journal of Microbiology*, 62(3): 243-251. <http://www.pjmonline.org>
  - Mirfeizi, M., Mehdizadeh Tourzani, Z., Zahra Mirfeizi, S., Asghari Jafarabadi, M., Rezvani, H. and Shoghi, M., 2014. Effects of cinnamon on controlling blood glucose and lipids in patients with type II diabetes mellitus: A double blind, randomized clinical trial. *Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences*, 57(3): 533-541. <https://doi.org/10.22038/mjms.2014.3008>
  - Nojookambari, N.Y., Eslami, G., Hashemi, A., Sadredinamin, M., Tarashi, S., Roshani, M. and Yazdanesad, S., 2019. In vitro antimicrobial activity of *Cinnamomum verum*, *Allium sativum*, and *Zingiber officinale* extracts on metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: A potential therapeutic approach. *Acta Microbiologica Hellenica*, 64(2): 25-35. <https://www.researchgate.net/publication/344290037>
  - Nordmann, P., Naas, T., Fortineau, N. and Poirel, L., 2007. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5): 436-440. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.07.004>
  - Norizadeh, E., Shokoohi, B. and Latifi Navid, S., 2007. In vitro comparison of the antimicrobial effect of turmeric and cinnamon water and ether extracts on the growth rate of *Helicobacter Pylori*. *Iranian Journal of Public Health*, 36(Supple 2): 2251. <https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/2906>

- Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovskil Wilchek, M., Mirelman, D. and Weiner, L., 1999. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1379(2): 233-244. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(97\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00104-9)
- Sepehri Seresht, S., Najar Peerayeh, S., Sattari, M. and Rezaee, M.A., 2007. Production of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Hakim Research Journal*, 10(1): 61-65. <https://hakim.tums.ac.ir/article-1-335-en.html>
- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M., 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18: 800-805. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.04.002>
- Sharifzadeh, S. and Mohammadzadeh, M., 2016. The effects of aqueous extract of cinnamon on blood biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health*, 23(201): 66-76. <http://journal.zums.ac.ir/article-1-3346-en.html>
- Shen, Q., Chen, F. and Luo, J., 2002. Comparison studies on chemical constituents of essential oil from *Romulus cinnamomi* and cortex *cinnamomi* by GC-MS. *Journal Chinese Medicine Mate*, 25: 257-258. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12583177/>
- Soltan Dallal, M.M., RastegarLari, A., Bakhtiari, R., Nikmanesh, B. and SharifiYazdi, M., 2014. Synergistic effect of ciprofloxacin with piperacillin, ceftazidim and imipenem against enterococi. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*, 22(92): 23-32. <http://journal.zums.ac.ir/article-1-2675-en.html>
- Tsakris, A., Poulou, A., Kristo, I., Pittaras, T. and Spanakis, N., 2009. Large dissemination of VIM-2-metallo-  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11): 3524-3529. <https://doi.org/10.1128/jcm.01099-09>
- Utcharyakiat, I., Surassmo, S., Jaturanpinyo, M., Khuntayaporn, P. and Chomnwang M., 2016. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16: 185. <https://www.springermedizin.de/>
- Valadbeigi, T. and Moradi, H., 2013. An investigation of antibacterial effect of methanol and acetone extracts in some lichens in Ilam. *Journal of Microbial Biology*, 2(5): 43-50. <https://www.sid.ir/paper/237472/>
- Vasconcelos, N.G., Croda, J. and Simionatto, S., 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial Pathogenesis*, 120: 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.036>
- Yadav, M., Bohra, R. and Gupta, N., 2010. In vitro determination of antibacterial effects of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(09): 498-506. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.809.060>
- Yusha, U.M., Garba, L. and Shamsudeen, U., 2008. In vitro inhibitory activity of garlic and ginger extracts on some respiratory tract isolates of gram- negative organisms. *International Journal of Biomedical and Health Sciences*, 4(2): 57-60. <http://www.asopah.org>