



خصوصیات ضد میکروبی، ضد بیوفیلمی و فارماکوکینتیکی برخی از اسانس های خانواده نعنائیان علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين

محمد وليان^۱، ماتيا سادات برهانی^{۲*}، اسماعيل باباخانزاده سجیرانی^۳، عیسی جرجانی^۴، سهراب بوذرپور^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

۲- استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

۳- استادیار گیاهان دارویی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، ایران

۴- استادیار ژنتیک، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱۶

کلمات کلیدی:

استافیلوکوکوس اورئوس،

بادرنجبویه،

بیوفیلیم،

داکینگ مولکولی،

مقاومت آنتی بیوتیکی

DOI: 10.22034/FSCT.20.142. 82

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.142.6.6

* مسئول مکاتبات:

Msadat.borhani7@gmail.com;

[Borhani@gonbad.ac.ir](mailto:borhani@gonbad.ac.ir)

وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) و ونکومايسين (VRSA) در مواد غذایی، یک نگرانی جدی برای سلامت عمومی ایجاد کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی برخی از اسانس های خانواده نعنائیان شامل بادرنبویه، مریم گلی و نعنا فلفلی، بر سویه های MRSA و برای اولین بار بر VRSA است. بدین منظور، تست های دیسک دیفیوژن، تست حداقل غلظت مهاري رشد (MIC)، حداقل غلظت باکتری سیدالی (MBC)، حداقل غلظت مهار تشکیل بیوفیلیم (MBIC) و حداقل غلظت مورد نیاز برای مهار باکتری های موجود در بیوفیلیم (MBEC) تعیین شد. سپس ترکیبات مؤثره اسانس بادرنبویه علیه پروتئین های PBP2a، agrA و Bap با استفاده از اتوداک وینا مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، خصوصیات فارماکوکینتیک آن ها با استفاده از سرورهای ADMETsar و SwissADME بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان MIC اسانس بادرنبویه بر روی سویه MRSA به ترتیب برابر با ۰/۰۵ و ۰/۱۱۲ میلی گرم/میلی لیتر و بر روی سویه VRSA به ترتیب برابر با ۱/۸ و ۲/۵ میلی گرم/میلی لیتر به دست آمد. میزان MBEC اسانس بادرنبویه در سویه MRSA به ترتیب برابر با ۰/۰۳ میلی گرم/میلی لیتر و ۰/۱۱۲ میلی گرم/میلی لیتر و در سویه VRSA به ترتیب برابر با ۰/۰۹ میلی گرم/میلی لیتر و ۳/۲ میلی گرم/میلی لیتر شد. نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که ترکیب بتاکاریوفیلین چه در جایگاه فعال و چه در جایگاه آلوستریک پروتئین PBP2a انرژی اتصالی بالاتری از بقیه ترکیبات مورد بررسی نشان می دهد (۶/۶- کیلوکالری بر مول). از طرفی، ترکیبات مؤثره این اسانس، مخصوصاً سیترونل، تیمول و سیترال از نظر خصوصیات فارماکوکینتیک قابل قبول بودند. از آنجایی که آنتی بیوتیک های طبیعی می توانند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک های معمولی در درمان بیماری های ناشی از مواد غذایی *استافیلوکوکوس اورئوس* باشند، نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس بادرنبویه بر رشد و بیوفیلیم سویه های MRSA و VRSA مؤثر است و می تواند به عنوان یک کاندید دارویی در پیشگیری و درمان عفونت های ناشی از سویه های دارای مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری مورد استفاده قرار گیرد.

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس می تواند باعث عفونت های جدی مانند عفونت های جریان خون (باکتری می و سپتی سمی)، ذات الریه، مسمومیت غذایی و عفونت زخم شود. مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی سویه های این باکتری، به یک مشکل بالینی در سراسر جهان تبدیل شده است و محققان در تلاش اند که بتوانند داروهای جدید علیه این سویه ها پیدا کنند. در ایران، میزان بالای حضور سویه های مقاوم به متی-سیلین (MRSA¹) و ونکومایسین (VRSA²) در انواع مختلف گوشت خام و فرآوری شده، شیر خام، پنیر سنتی، غذاهای رستورانی و غذاهای بیمارستانی گزارش شده است [1]. آنتی بیوتیک های بتالاکتام مانند پنی سیلین، یکی از کارآمدترین آنتی بیوتیک هایی بوده اند که با اثر بر سنتز دیواره باکتریایی در درمان استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می شدند. مکانیسم آنتی بیوتیک های β -لاکتام، آسیلاسیون غیرقابل برگشت PBPها³ یا پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین می باشد [2]. پروتئین های PBP می توانند هم فعالیت ترنس پپتیدازی و هم فعالیت ترنس گلیکوزیلازی داشته باشند. یکی از مکانیزم های مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی، آنزیم های بتالاکتاماز بودند که با برش حلقه بتالاکتام در ساختار آنتی بیوتیک آن را برای باکتری بی اثر می ساختند. با توسعه آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم به بتالاکتامازها، مانند متی-سیلین و اگزاسیلین، سویه های MRSA پدیدار گشتند [3]. مقاومت در MRSA عمدتاً از بیان PBP2a، یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین که حداقل دو برابر حساسیت کمتر نسبت به بتالاکتام ها دارد، ناشی می شود [2]. امروزه، علاوه بر

سویه های مقاوم به متی سیلین، سویه هایی با به عرصه ظهور گذاشته اند که در برابر ونکومایسین که در درمان سویه های MRSA به کار می رود، نیز مقاومت نشان می دهند. یکی از علل مقاومت در برابر ونکومایسین، اپرون VanA حاوی ترنس پوزون Tn1546 کسب شده از باکتری انتروکوکوس می باشد. این اپرون منجر به تغییر D-آلانی-آلانی پتاپتید پتیدوگلیکان، به D-آلانی-D-لاکتات شده و در نتیجه امکان اتصال ونکومایسین دیگر فراهم نمی شود [4].

از دیگر علل مقاومت آنتی بیوتیکی و همچنین یکی از فاکتورهای ویروالانس سویه های مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس، توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم یا زیست لایه، تجمعانی از سلول های میکروبی است که به یک سطح متصل شده و توسط مواد پلیمری خارج سلولی پوشیده شده اند. باکتری هایی که بیوفیلم تشکیل می دهند، در مقایسه با باکتری های آزاد یا پلانکتونی، نسبت به استرس های سلولی از جمله آنتی بیوتیک ها، مواد سمی، فلزات سنگین، کمبود آب، افزایش یا کاهش PH محیط و نوسانات دمایی، از خود مقاومت بیشتری نشان می دهند [5]. مزایای ناشی از بیوفیلم برای باکتری های تشکیل دهنده آن، باعث شده که درمان عفونت های ناشی از این گونه باکتری ها به یک چالش اساسی تبدیل شود تا جایی که تخمین زده شده است بیش از ۸۰ درصد عفونت های انسانی توسط بیوفیل ها ایجاد می شوند [6;7]. در استافیلوکوکوس اورئوس، تشکیل بیوفیلم عمدتاً توسط ژن هایی مانند ژن پروتئین های متصل شونده به فیبرینوژن (fib)، پروتئین های متصل شونده به فیبرونکتین (fnaB و fnbB)، ژن های چسبندگی بین سلولی (icaA, B, C, D)، فاکتورهای کلمپینگ (clfA و clfB)، پروتئین متصل شونده به الاستین (ebp)، پروتئین متصل شونده به لامینین

1 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)2- Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA)

3- Penicillin-binding proteins (PBPs)

(eno)، پروتئین در ارتباط با بیوفیلیم (Bap) و پروتئین متصل شونده به کلاژن (cna) رمزگذاری می‌شود. ژن‌های فوق، پروتئین‌های سطحی مختلف را کدگذاری می‌کنند تا باعث چسبیدن /ستافیلوکوکوس/ اورئوس به میزبان، نفوذ و کلونیزه شدن آن و در نهایت منجر به تشکیل بیوفیلیم و بیماری‌زایی شوند. به علاوه، تشکیل بیوفیلیم معمولاً توسط سیستم کوئروم سنسینگ^۱ (حس حدنصاب) باکتری‌ها کنترل می‌شود [8].

از رهیافت‌های جدید محققان برای مبارزه با باکتری‌های دارای مقاومت چندگانه داروئی، توسعه داروهای مؤثر بر تشکیل بیوفیلیم و سایر فاکتورهای ویروالانس و همچنین داروهای مؤثر بر سیستم‌های کوئروم سنسینگ باکتری‌ها است. داروهایی که بیوفیلیم و کوئروم سنسینگ باکتری را مورد هدف قرار می‌دهند، فشار انتخابی زیادی برای باکتری ایجاد نمی‌کنند و بنابراین شانس کمتری برای ایجاد مقاومت داروئی در باکتری را به وجود می‌آورند [9]. بررسی مطالعات گذشته در سال‌های اخیر در مورد اثرات مهارکنندگی رشد، تشکیل بیوفیلیم و کوئروم سنسینگ (حس حدنصاب) باکتری‌های بیماری‌زا توسط فرآورده‌های گیاهی نشان داده است که فرآورده‌های گیاهی (شامل عصاره، اسانس و همچنین ترکیبات مؤثره و خالص آن‌ها) اثرات قابل توجهی از خود نشان می‌دهند و می‌توانند به عنوان کاندیدهای داروئی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های معمولی در نظر گرفته شوند. برخی از مقالات مروری مناسب در این زمینه موجود است که می‌توانند دید بهتری در زمینه مکانیزم اثر ترکیبات گیاهی بر سیستم کوئروم سنسینگ و بیوفیلیم باکتری‌ها ارائه کنند [10, 11, 12].

از میان گیاهان دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌توان به گیاهان خانواده نعنائیان یا لایمیا، که

دارای گیاهان داروئی و معطر بسیاری از جمله بادرنجبویه، نعنا، پونه کوهی، مریم‌گلی، زوفا، آویشن، اسطوخودوس، برازمل و غیره می‌باشد، اشاره کرد. در این خانواده گیاهی، ترکیبات مؤثره جالب توجهی از جمله سیترونال، تیمول، سیترال، بتاکاریوفیلین، لینالول، کارواکرول، آلفا پینن و... یافت شده است. هم اسانس و هم ترکیبات مؤثره گونه‌های گیاهی این خانواده می‌توانند به عنوان کاندیدهای داروئی جدید مورد بررسی بیشتر قرار گیرند [13].

لازم به ذکر است که کاندیدهای داروئی علاوه بر خواص بیولوژیکی، باید از نظر خواص فارماکوکینتیک نیز مورد بررسی قرار گیرند، زیرا جهت کاربردی کردن فرآورده‌های گیاهی در صنایع غذایی و داروئی، ضروری است که اثرات دارو بر پاتوژن‌های میکروبی و نیز بر بدن انسان مورد بررسی قرار گیرد. از آن جایی که بررسی آزمایشگاهی اثربخشی و فارماکوکینتیک کاندیدهای داروئی در آزمایشگاه زمانبر، هزینه بردار و دارای خطرات ایمنی است، در سال‌های اخیر استفاده روش‌های *In silico* یا شبیه سازی درون‌رایانه‌ای مانند داکینگ مولکولی (به منظور بررسی اثربخشی کاندید داروئی بر پاتوژن) و ADME/ADMET (به منظور بررسی اثرات کاندید داروئی بر بدن یا فارماکوکینتیک داروئی) توسعه بیشتری یافته است. منظور از فارماکوکینتیک دارو، بررسی مواردی چون جذب دارو^۲، توزیع^۳، متابولیسم^۴ و دفع^۵ داروست که به اختصار ADME نامیده می‌شود. منظور از جذب دارو، فرآیند ورود و انتقال دارو از مسیر تجویز شده به درون جریان خون و پلاسما می‌باشد. منظور از توزیع دارو، نفوذ و انتشار آن به درون بافت‌ها و مایع بین سلولی است. منظور از متابولیسم دارو، شکسته شدن آن به اجزای فعال و

2- Absorption
3- Distribution
4- Metabolism
5- Excretion

1- Quorum sensing (QS)

کیت رنگ آمیزی گرم و کریستال ویوله از شرکت Merck (آلمان) تهیه شدند. میکروتیترپلیت ۹۶ خانه ای با خصوصیات جنس پلی استرینی، دارای چاهک های با انتهای صاف و بدون تیمار چاهک، از شرکت Biotest (چین) مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲. سویه های باکتریایی، محیط ها و شرایط کشت

سویه استاندارد /ستافیلوکوکوس/رئوس مقاوم به متی سیلین (ATCC ۳۳۵۹۱) از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شاهرود و سویه های بالینی مقاوم /ستافیلوکوکوس/رئوس، از بیمارستان امام حسین (ع) شاهرود تهیه گردید. بررسی تست های مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های بالینی با استفاده از E-test نشان داد که برخی از این سویه ها، در هیچ یک از غلظت های ونکومايسين هاله عدم رشد تشکیل نمی دهند و در نتیجه سویه مقاوم به ونکومايسين (VRSA) گزارش شدند. بنابه تعریف، سویه هایی که میزان MIC ونکومايسين آنها بین ۴-۸ میکروگرم/میلی لیتر باشد، سویه های نسبتاً مقاوم به ونکومايسين (VISA^۳) و در صورتی که میزان MIC ونکومايسين آنها بالای ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر باشد، سویه مقاوم به ونکومايسين (VRSA) باید در نظر گرفته شود [20]. از محیط کشت TSA برای کشت مجدد باکتری ها به صورت خالص به روش کشت خطی و از محیط کشت MHA برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس، به روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. به منظور ذخیره سازی طولانی مدت سویه ها، از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند (برابر با تعداد 1×10^8 CFU/mL) و گلیسرول ۳۰ درصد استفاده شد و نمونه ها در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

عمل کننده دارو است. منظور از دفع دارو، فرایند پاک سازی و حذف باقی مانده های مواد دارویی از بدن می باشد. گاهی پتانسیل سمیت دارو نیز مورد بررسی قرار می گیرد [2, 14]. تا جایی که نویسندگان اطلاع دارند تاکنون گزارشی از اثر اسانس های خانواده نعنائیان مورد مطالعه (مریم گلی، نعنا فلفلی و بادرنجبویه) بر رشد و تشکیل بیوفیلم سویه VRSA داده نشده است و مطالعات گذشته بیشتر بر روی عصاره این گیاهان و بر روی سویه های حساس /ستافیلوکوکوس/رئوس متمرکز بوده اند و حتی گزارشات اندکی در مورد اثرات مهاری اسانس گیاهان خانواده نعنائیان بر رشد و تشکیل بیوفیلم سویه MRSA موجود است [15-19]. بنابراین هدف این مطالعه، بر مبنای ارزیابی اثر این اسانس ها بر رشد و تشکیل بیوفیلم سویه های مقاوم آنتی بیوتیکی /ستافیلوکوکوس/رئوس در شرایط *In vitro* پایه گذاری شد. همچنین، مکانیزم اثر ترکیبات مؤثره این اسانس ها بر پروتئین های مؤثر در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی و پروتئین های مؤثر در تشکیل بیوفیلم /ستافیلوکوکوس/رئوس به صورت بیوانفورماتیکی و با استفاده از داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، فارموکوکینتیک کاندیدهای دارویی نیز بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱. مواد مورد استفاده

دیسک آنتی بیوتیک بلانک (خالی یا بدون آنتی بیوتیک) و دیسک آنتی بیوتیک های متی سیلین، ونکومايسين و لایزولید از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شدند. محیط های کشت مورد استفاده در این مطالعه یعنی تریپتیک سوی براث^۱ (TSB)، مولر هیتون براث^۲ (MHB) و همچنین آگار-آگار،

3- Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA)

1- Tryptic soy broth or Trypticase soy broth (TSB)

2- Mueller Hinton Broth (MHB)

۲-۳. گیاهان مورد بررسی و تهیه اسانس

در این مطالعه گیاهان مورد بررسی (بادرنجبویه، مریم گلی و نعنا فلفلی) توسط مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود در تابستان ۱۴۰۱ به میزان ۵۰۰ گرم جمع آوری شد. سپس گیاهان (سرشاخه ها و برگ) در دمای اتاق و در مکان خشک و تاریک خشک شدند. تهیه اسانس، با استفاده از روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر^۱ (شیمی آزما گستر، ایران) بر طبق پروتکل مطالعه قبلی صورت پذیرفت. بازده تولید اسانس بادرنبویه (۰,۷۴ درصد)، مریم گلی (۰,۶۶ درصد) و نعنا فلفلی (۰,۷ درصد) بر حسب حجم اسانس به دست آمده به ازای وزن خشک گیاه (۱۳۵ گرم) محاسبه شد. اسانس به دست آمده، چگالی حدود ۰/۹ mg/μL داشتند. تمامی اسانس ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش ها نگه داری شد [21, 22].

۲-۴. بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس به روش

دیسک دیفیوژن (انتشار از دیسک)

در این تست از رقت های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ اسانس ها استفاده شد که به دلیل چگالی حدود ۰/۹ mg/μL اسانس ها، ۱۰ میکرولیتر اسانس ها از رقت های مورد بررسی به ترتیب معادل ۹۰، ۹ و ۰/۹ میکروگرم خواهند بود. از توپین ۲۸۰ به عنوان امولسیفایر یا ماده امولسیون کننده^۳ به میزان ۳ درصد حجم/حجم اسانس روغنی و از آب مقطر برای رقت سازی استفاده شد. میزان ۱۰ میکرولیتر از رقت های اسانس به دست آمده، بر روی دیسک آنتی بیوگرام بلائک (خالی یا بدون آنتی بیوتیک) استریل ۶ میلی متری قرار داده شد. سپس دیسک ها بر روی کشت چمنی سویه های

استافیلوکوکوس /رئوس مقاوم به آنتی بیوتیک، در محیط کشت MHA بافاصله ۱/۵ سانتیمتر از کناره های پلیت و ۲ سانتیمتر از یکدیگر قرار داده شدند. پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و سپس قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش اندازه گیری شد. آنتی بیوتیک لایزولید (در غلظت ۳۰ میکروگرم) نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. میزان فعالیت ضدباکتریایی اسانس مورد مطالعه، بر اساس نتایج قطر هاله عدم رشد به صورت غیرفعال (قطر هاله عدم رشد کمتر از ۷ میلی متر)، نسبتاً فعال (قطر هاله عدم رشد بین ۷-۹ میلی متر)، فعال (قطر هاله عدم رشد بین ۹-۱۲ میلی متر) و بسیار فعال (قطر هاله عدم رشد بیش از ۱۲ میلی متر) گزارش شد [23].

۲-۵. بررسی حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و

کشدگی باکتریایی (MBC) به روش میکرودايلوشن (ریز رقت سازی)

پروتکل MIC استفاده شده در این تحقیق، مطابق با روش مطالعه قبلی انجام شد [13]. در این تست، از محیط کشت MHB (۵۰ میکرولیتر)، رقت های ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰، ۱/۶۴۰ و ۱/۱۲۸۰ اسانس (۵۰ میکرولیتر) و غلظت نهایی باکتری استافیلوکوکوس /رئوس در هر چاهک، معادل ۵×۱۰^۵ CFU/mL (۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی ۱۰۰ برابر رقیق شده کدورت نیم مک فارلند معادل CFU/mL ۵×۱۰^۶ باکتری) استفاده شد. همچنین علاوه بر چاهک های تست، چاهک های کنترل مثبت یا کنترل رشد (دارای محیط کشت و باکتری و فاقد اسانس) به منظور اطمینان از شرایط مناسب رشد باکتری و همچنین کنترل منفی یا کنترل استریلیتی (دارای تنها محیط کشت و فاقد باکتری و اسانس) نیز به منظور تأیید عدم آلودگی در حین انجام کار، در نظر گرفته شدند. در نهایت، میکروتیتر پلیت به مدت ۲۴ ساعت در

1- Clevenger

2- Tween80

3- Emulsifier

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از اتمام انکوباسیون، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (ویرا طب تجهیز، ایران) خوانده شد. حداقل غلظتی از اسانس که منجر به حداقل ۵۰ درصد کاهش جذب نوری نسبت به کنترل رشد گردید، به عنوان حداقل غلظت مهار رشد باکتری (MIC^1) در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که هر رقت اسانس، به صورت ۳ تکرار انجام شده است.

به منظور پیدا کردن حداقل غلظتی از اسانس که باعث مرگ باکتری می‌شود (MBC^2)، بعد از تعیین MIC ، ۱۰ میکرولیتر از محتویات چاهک‌های معادل غلظت MIC و بالاتر از آن، برداشته و بر روی محیط TSA کشت داده شد. حداقل غلظت کشندگی اسانس به غلظتی گفته می‌شود که در مجاورت آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها از بین رفته باشند و به عبارت دیگر تنها ۰/۱ درصد از باکتری‌ها زنده بمانند. با توجه به این که حجم نمونه کشت ۱۰ میکرولیتر (10^{-2} mL) و تعداد اولیه باکتری‌ها 5×10^5 CFU/mL می‌باشد، پس انتظار می‌رود غلظتی از اسانس که حداکثر باعث تشکیل حداکثر ۵ کلونی در پلیت شده است، به عنوان MBC مطرح گردد (معادله ۱).

معادله ۱:

$$10^{-2} \text{ mL} \times 5 \times 10^5 \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \times \frac{0.1}{100} = 5 \text{ CFU}$$

۲-۶. بررسی حداقل غلظت مهار تشکیل بیوفیلم

(MBIC) به روش میکرودایلوشن (ریزرقق سازی)

بنا به تعریف، حداقل غلظت مهار تشکیل بیوفیلم ($MBIC^3$)، حداقل غلظتی از یک ماده ضد میکروبی است که از تشکیل بیوفیلم ارگانیسم مورد مطالعه جلوگیری می‌کند [24]. به منظور

بررسی MBIC، سوسپانسیون باکتریایی دارای کدورت نیم مک فارلند (دارای جذب نوری ۰/۱۳-۰/۰۸ در طول موج ۶۳۰ نانومتر و برابر با 1×10^8 CFU/mL)، با استفاده از محیط کشت مولر هیتون برات (MHB) حاوی ۱ درصد گلوکز به دست می‌آید. مشابه با روش تعیین MIC، سوسپانسیون باکتریایی (۱۰۰ میکرولیتر)، اسانس گیاهی (۵۰ میکرولیتر) و محیط کشت استریل (۵۰ میکرولیتر) به چاهک‌های میکروتیتر پلیت اضافه شدند. همچنین چاهک‌های کنترل مثبت یا کنترل رشد (بدون افزودن اسانس) و کنترل منفی یا استریلیتی (محیط کشت استریل) نیز در نظر گرفته شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محتویات میکروتیتر پلیت با وارونه کردن آن به آرامی و یا با کمک سمپلر تخلیه می‌شود تا تنها باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم در چاهک‌ها باقی بمانند. به منظور اطمینان از خروج سلول‌های پلانکتونیک، شستشوی چاهک‌ها با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک استریل صورت گرفت. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به چاهک‌ها اضافه و پس از گذشت ۱۰ دقیقه شستشوی دوباره چاهک‌ها صورت پذیرفت. نهایتاً ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به همه چاهک‌ها اضافه و سپس خوانش جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر انجام شد [25]. درصد مهار تشکیل بیوفیلم از معادله ۲ محاسبه می‌شود که در آن C متوسط جذب کنترل (تشکیل بیوفیلم کنترل مثبت یا باکتری در غیاب اسانس)، T جذب تیمار شده‌ها (یا تشکیل بیوفیلم در حضور اسانس) و B متوسط جذب کنترل منفی (یا محیط کشت استریل) است [26].

$$\text{معادله ۲: } \% = (C - T) / (C - B) \times 100$$

مهار تشکیل بیوفیلم

1- Minimal inhibitory concentration (MIC)

2- Minimal bactericidal concentration (MBC)

3- Minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC)

۷-۲. بررسی حداقل غلظت کشندگی باکتریایی در

بیوفیلم (MBEC) به روش میکرودايلوشن (ریزرت سازی)

به منظور بررسی حداقل غلظت کشندگی باکتریایی در بیوفیلم (MBEC^۱) در مجاورت اسانس گیاهی، نیز مشابه روش تعیین MBIC، از محیط کشت مولر هیتون براث (MHB) حاوی ۱ درصد گلوکز، برای به دست آوردن سوسپانسیون باکتریایی دارای کدورت نیم مک فارلند استفاده شد. در تست MBEC ابتدا اجازه داده شد تا بیوفیلم باکتریایی در عدم حضور اسانس تشکیل گردد، سپس اسانس مورد بررسی به چاهک های تست اضافه و میزان مهار رشد یا کشندگی باکتری های موجود در بیوفیلم، در مجاورت اسانس مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور، سوسپانسیون باکتریایی دارای کدورت استاندارد نیم مک فارلند توسط محیط کشت MHB دارای ۱ درصد گلوکز، ابتدا تا رقت ۱/۱۰۰ رقیق سازی و سپس ۱۰۰ میکرولیتر آن به چاهک های تست و کنترل مثبت (یا کنترل رشد) اضافه شد. یک ستون خالی میکروتیتر پلیت نیز به عنوان کنترل زمینه در خوانش با الایزا در نظر گرفته شد. سپس میکروتیتر پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت بدون جابجایی و همزنی قرار گرفت. نهایتاً محتویات میکروتیتر پلیت با وارونه کردن آن به آرامی و یا با کمک سمپلر تخلیه، سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک وارد و مجدداً چاهک های میکروتیتر پلیت را تخلیه کرده تا باکتری های پلانکتونیک خارج شده و همراه با باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلم رنگ آمیزی نشوند. آنگاه به چاهک های ستون های اول تا نهم، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت MHB اضافه گردید. سپس به چاهک های ستون های اول تا هفتم، به میزان ۱۰۰

میکرولیتر اسانس با رقت های متفاوت از ۱/۱۰ تا ۱/۶۴۰ اضافه شد و از آنجائی که در چاهک ها به همان حجم محیط کشت نیز اضافه شده است، رقت های اسانس در ستون های مزبور برابر با ۱/۲۰ تا ۱/۱۲۸۰ خواهد بود. چاهک های ستون ۸ و ۹ به ترتیب به عنوان کنترل مثبت (فاقد اسانس) و کنترل منفی (فاقد اسانس و باکتری) مشابه با روش MIC تهیه شدند. سپس میکروتیتر پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. نحوه شستشو، رنگ آمیزی با کریستال ویوله، افزودن اتانول و خوانش در الایزا ریدر دقیقاً مشابه با روش MBIC می باشد. همچنین درصد مهار رشد باکتری در بیوفیلم نیز با استفاده از معادله ۲ به دست آمد.

۸-۲. بررسی اثر ترکیبات مؤثره اسانس در مقاومت

آنتی بیوتیکی و بیوفیلم باکتری با استفاده از داکینگ مولکولی

با توجه به نتایج تست های میکروبی، در ادامه کار از ترکیبات مؤثره اسانس بادرنجبویه به منظور انجام داکینگ استفاده شد. ابتدا ترکیباتی که غلظتی برابر یا بیشتر از ۱ درصد در نتایج طیف سنجی جرمی - کروماتوگرافی گازی^۲ (GC-MS) داشتند، مشخص شدند [13]. ساختار مولکولی آن ها از طریق سایت PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) با فرمت sdf. به دست آمدند و سپس توسط سرور Open Babel online به فرمت pdb. تبدیل شدند تا ساختارها در فرآیند داکینگ راحت تر مورد استفاده قرار گیرند. کد دسترسی و فرمول مولکولی این ترکیبات در جدول ۱ آورده شده است. تمامی این ترکیبات از نوع ترکیبات ترپنوئیدی می باشند.

2- Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

1- Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC)

Table 1 Characteristics of plant-derived natural ligands used in the molecular docking

No.	Ligand Name	PubChem Compound identifier (CID)	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	Percent in essential oil	Group
1	Citronellal	7794	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	37	Aldehyde/Monoterpene
2	Thymol	6989	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	12	Phenol/Monoterpene
3	Citral	638011	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	10	Aldehyde/Monoterpene
4	B-Caryophyllene	5281515	C ₁₅ H ₂₄	204.35	7	Sesquiterpene
5	1,3,8-P-Menthatriene	176983	C ₁₀ H ₁₄	134.22	7	Monoterpene
6	Linalool	6549	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	3	Alcohol/Monoterpene
7	Carvacrol	10364	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	1	Phenol/Monoterpene

پروتئین PBP2a در جدول ۲ آورده شده است. در این جدول، جایگاه باقی مانده ها و دومین های کلیدی پروتئین PBP2a با استفاده از سرور UniProt KB (<https://www.uniprot.org/uniprotkb>) به دست آمده است. علاوه بر پروتئین PBP2a، پروتئین های مؤثر در کوئروم سنسینگ و بیوفیلیم یعنی agrA (کد دسترسی در PDB = 4g4k) و Bap (کد دسترسی در PDB = 7DM0) نیز با لیگاندهای گیاهی و آنتی بیوتیکی داکینگ شدند. ساختارهای سه بعدی تمامی پروتئین ها از سرور RCSB BDB (<https://www.rcsb.org/>) دریافت شد.

ساختار لیگاندهای آنتی بیوتیکی مانند متی سیلین (PubChem CID=6087) و سفنارولین (PubChem CID=9852981) نیز از سایت PubChem دریافت و تبدیل به فرمت pdb. شد. از آنتی بیوتیک ها به عنوان کنترل در فرآیند داکینگ استفاده شد. لازم به ذکر است سویه های مورد مطالعه نسبت به سفنارولین حساس و نسبت به متی سیلین مقاوم بودند. در این مطالعه، از ۳ ساختار پروتئین PBP2a/ستافیلوکوکوس /رئوس برای فرآیند داکینگ استفاده شده است تا بررسی شود که آیا ساختارهای متفاوت تعیین شده پروتئین ها می تواند در نتایج داکینگ مؤثر باشد یا خیر. خصوصیات ساختاری

Table 2 Structural characteristics of PBP2a protein effective in MRSA antibiotic resistance

Protein name	PDB code	Method	Structure	Catalytic residue(s)	UniProtKB	Sequence Length	Ligand(s)
PBP2a	5m18	X-RAY diffraction 1.98 Å	2 chains: A, B 26-140: MecA-N		Q7DHH4		beta-muramic acid D-Alanyl-D-Alanine
PBP2a	3zfv	X-RAY diffraction 2.25 Å	140-309: PBP-dimer	S403	A0A0H3JPA5	668aa (PDB:642aa)	Ceftaroline
PBP2a	1vqq	X-RAY diffraction 1.8 Å	346-657: Transpeptidase		Q93IC2		None

برهمکنش با استفاده از نرم افزار UCSF chimera (نسخه 1.16) و همچنین Swiss PDB viewer یا spdbv (نسخه 4-10) بهینه سازی شد. سپس ساختاری که دارای کمترین انرژی بود، انتخاب و جهت مطالعات داکینگ از نرم افزار

به منظور بررسی برهمکنش لیگاندها و رسپتور (پروتئین) در پایدارترین حالت از لحاظ انرژی و ساختار، پیش از انجام داکینگ، همه ساختارهای مولکولی از نظر انرژی

AutoDock Tools استفاده گردید. فرآیند داکینگ با استفاده از اتوداک وینا که سرعت و صحت بیشتری از اتوداک دارد، به منظور بررسی میل اتصال ترکیبات موثره اسانس بادرنجبویه بر پروتئین‌های مؤثر در مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم صورت پذیرفت [27]. نرم‌افزار AutoDock Tools (نسخه ۴٫۲) در ابتدا ساختارهای پروتئینی و لیگاندهای گیاهی را به فرمت pdb دریافت می‌کند و با اضافه کردن اطلاعات بار و نوع اتم، آن‌ها را به فرمت pdbqt تبدیل می‌کند. مشخصات گرید باکس در جایگاه فعال پروتئین PBP2a دارای خصوصیات مختصات نقاط مرکزی برابر با $x = 18/123$ ، $y = -20/86$ ، $z = -17/413$ و تعداد نقاط در هر محور برابر با $x = 30$ ، $y = 30$ و $z = 30$ می‌باشد. همچنین مشخصات گرید باکس در جایگاه آلوستریک پروتئین PBP2a دارای خصوصیات مختصات نقاط مرکزی برابر با $x = 15/347$ ، $y = -19/277$ ، $z = -50/318$ و تعداد نقاط در هر محور برابر با $x = 30$ ، $y = 30$ و $z = 30$ می‌باشد. پس از انجام فرآیند داکینگ بهترین کنفورماسیون با پایین‌ترین میزان انرژی اتصال به عنوان نتیجه انتخاب شد.

۲-۹. بررسی خصوصیات فارماکوکنتیک کاندیدهای

داروئی

از سرورهای SwissADME

(<http://www.swissadme.ch/index.php>) و admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>) با استفاده از کد SMILES ترکیبات، به پیش‌بینی خصوصیات کاندیدهای داروئی پرداخته شد. سرور SwissADME، شش خصوصیت فیزیکوشیمیایی یعنی چربی‌دوستی^۱ (LIPO)، اندازه^۲ (SIZE)، قطبیت^۳ (POLAR)، حلالیت^۴ (INSOLU)،

انعطاف‌پذیری^۵ (FLEX) و اشباع بودن^۶ (INSATU) در نظر گرفته شد. یکی از خصوصیات منحصر به فرد این سرور این است که برای راحت‌تر بودن مشاهده نتایج، یک نمودار راداری که در آن هر محور نشان‌دهنده یکی از این خصوصیات است، ارائه می‌دهد و در این نمودار، محدوده مجاز به صورت ناحیه صورتی‌رنگ نشان داده شده است. در نمودار راداری، زمانی یک مولکول داروهمانند^۷ در نظر گرفته می‌شود که از محدوده مجاز تجاوز نکند. محدوده مجاز هر یک از این ۶ خصوصیت فیزیکوشیمیایی به قرار زیر است: چربی‌دوستی (XLOGP3 بین ۵+ الی ۰/۷-)، اندازه یا وزن مولکولی (بین ۵۰-۱۵۰ g/mol)، قطبیت (محدوده ناحیه سطحی قطبی توپولوژیکی^۸ یا TPSA بین ۲۰ Å² الی ۱۳۰ Å²)، حلالیت (log S کمتر از ۶)، اشباع (نسبت کربن‌ها در هیبریداسیون sp³ کمتر از ۰/۲۵ نباشد) و انعطاف‌پذیری (عدم وجود بیش از ۹ باند قابل چرخش) [28]. به علاوه سرور SwissADME فرصتی برای ارزیابی قانون پنج لیپینسکی^۹ فراهم می‌کند. لیپینسکی و همکارانش (۱۹۹۷) از طریق تعریف قانون ۵، راهنمایی برای پیش‌بینی قابل جذب بودن ترکیبات از راه خوراکی ارائه کردند. قانون ۵، بر اساس محاسبه توزیع ویژگی‌های چندین هزار دارو، پیش‌بینی می‌کند که جذب یا نفوذ کم در مواردی اتفاق می‌افتد که مولکول موردنظر ویژگی‌هایی مانند وزن مولکولی بیش از ۵۰۰ دالتون، فاکتور چربی‌دوستی (ClogP) بیش از ۵، تعداد اتم‌های پذیرنده پیوند هیدورژنی بیش از ۱۰ و تعداد اتم‌های دهنده پیوند هیدورژنی بیش از ۵ را داشته باشد [29]. همچنین، در این مطالعه از سرور admetSAR به منظور بررسی سمیت کاندیدهای داروئی موردبررسی استفاده شد.

5- Flexibility
6- Saturation
7- Druglike
8- Topological polar surface area
9- Lipinski's rule of five

1- Lipophilicity
2- Molecular weight
3- Polarity
4- Solubility

۲-۱۰. آنالیزهای آماری

در این مطالعه، آزمایش‌های مورد بررسی به صورت ۳ تکرار انجام شدند. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و توسط تست ناپارامتریک کروسکال-والیس^۱ انجام شده است. مقدار *P-value* کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنادار بودن آماری نتیجه در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱. فعالیت ضد باکتریایی اسانس

از میان اسانس‌های مورد بررسی، اسانس بادرنجبویه در غلظت‌های ۹۰ میکروگرم (۰/۰۹ میلی گرم) و ۹۰۰ میکروگرم (۰/۹ میلی گرم) به ازای هر دیسک، بر روی سویه‌های MRSA و VRSA مؤثرتر بوده است (شکل ۱). البته، در غلظت ۹ میکروگرم اثرات ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه، بر روی هیچ یک از سویه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. قطر هاله عدم رشد MRSA در حضور غلظت ۹۰۰ میکروگرم، بیش از ۱۲ میلی متر و در حضور غلظت ۹۰ میکروگرم، بین ۹-۱۲ میلی متر بوده است. بنابراین، در غلظت‌های مورد بررسی، اثر اسانس بادرنجبویه نسبت به سویه MRSA بسیار فعال (برای غلظت ۹۰۰ میکروگرم) و فعال (برای غلظت ۹۰ میکروگرم) گزارش می‌شود. همچنین، قطر هاله عدم رشد VRSA در حضور غلظت‌های ۹۰۰ میکروگرم و ۹۰ میکروگرم از اسانس بادرنجبویه، در محدوده ۹-۱۲

میلی متر بوده و بدین ترتیب اثر اسانس بادرنجبویه علیه VRSA، در غلظت‌های نامبرده، فعال (برای غلظت ۹۰۰ میکروگرم) و یا نسبتاً فعال (برای غلظت ۹۰ میکروگرم) گزارش می‌شود. اسانس‌های نعنا فلفلی و مریم‌گلی بر روی سویه VRSA مؤثر نبودند و هاله عدم رشدی نشان ندادند.

1- Kruskal-Wallis test

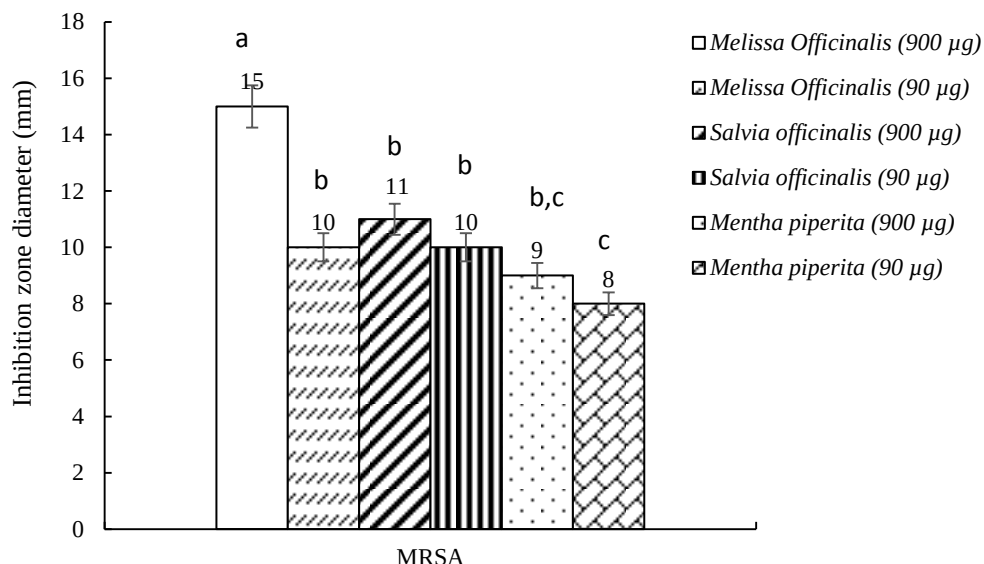


Fig 1 Antibacterial activity of the studied essential oils against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains by disk diffusion method

مرگ سویه MRSA می‌گردد، به ترتیب ۳۶ برابر و ۲۲ برابر کمتر از غلظتی است که همین اثرات را در سویه VRSA ایجاد می‌کند. اسانس‌های نعنا فلفلی و مریم‌گلی در غلظت‌های بالاتری نسبت به بادرنجبویه دارای خاصیت ضد میکروبی بودند.

۳-۲. حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و کشندگی

باکتریایی (MBC)

همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، میزان MIC و MBC سویه VRSA تفاوت آشکاری با سویه MRSA دارد. برای مثال، غلظتی از اسانس بادرنجبویه که باعث مهار رشد و

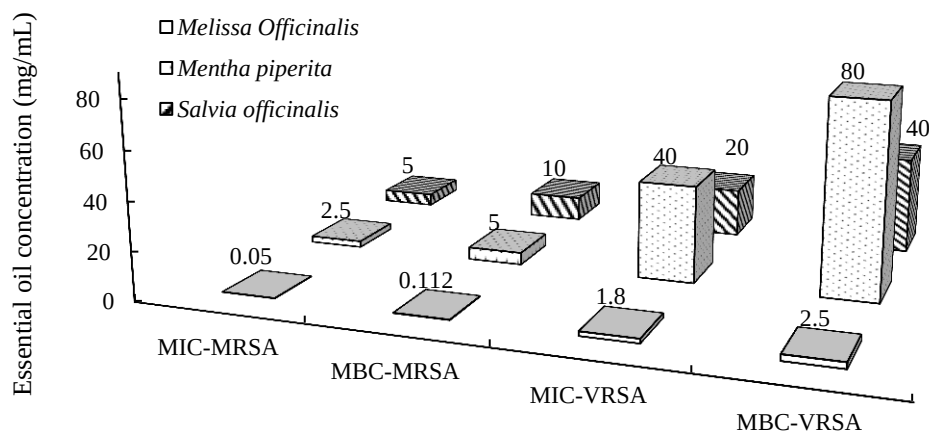


Fig 2 MIC and MBC of the studied essential oils against *Staphylococcus aureus* antibiotic-resistant strains

نتایج MBIC و MBEC در شکل ۳ نمایش داده شده است. نتایج موید آن است که غلظت ۳۰ میکروگرم (۰/۰۳ میلی‌گرم) اسانس بادرنجبویه، باعث مهار تشکیل بیوفیلم

۳-۳. حداقل غلظت مهار تشکیل بیوفیلم (MBIC) و

کشندگی باکتریایی در بیوفیلم (MBEC)

تشکیل یافته، در MRSA به غلظت ۰/۱ میلی گرم/میلی لیتر و در سویه VRSA به غلظت ۳/۲ میلی گرم/میلی لیتر از اسانس بادرنجبویه نیاز است.

سویه MRSA می گردد. درحالی که برای مهار تشکیل بیوفیلם سویه VRSA، به غلظت بسیار بیشتری از اسانس بادرنجبویه (۳۰ برابر) یعنی ۹۰۰ میکروگرم (۰/۹ میلی گرم) نیاز است. همچنین، برای مهار بالای ۹۰ درصد باکتری ها در بیوفیلם

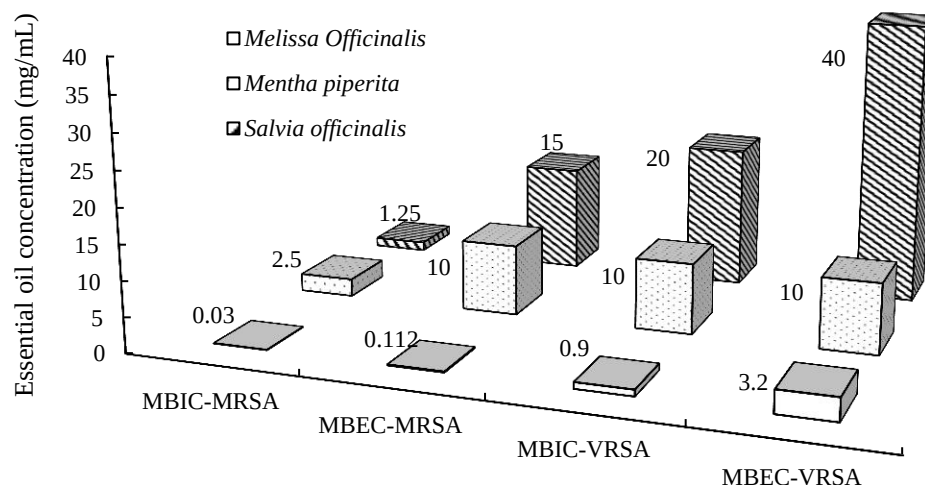


Fig 3 MBIC and MBEC of the studied essential oils against *Staphylococcus aureus* antibiotic-resistant strains

آنتی بیوتیک ها و لیگاندهای گیاهی مورد بررسی به ترتیب بر روی پروتئین $Bap < agrA < PBP2a$ بیشتر بوده است. به عبارت دیگر، نتایج نشان داد که تمامی لیگاندهای مورد بررسی میل اتصال کمتری برای پروتئین های $agrA$ و Bap دارند. نتایج داکینگ جایگاه فعال و همین طور جایگاه آلوستریک پروتئین $PBP2a$ با استفاده از ساختارهای مختلف این پروتئین (1vqq, 3zfz, 5m18) نشان داد که در اکثر موارد نتایج مشابهی به دست می آید و شباهت به دست آمده برای ساختارهای 1vqq و 5m18 بیشتر بوده است. هر دو ساختار نامبرده دارای رزولوشن ساختاری مشابهی هستند. نتیجه به دست آمده، دیگر نتایج داکینگ این مطالعه را مورد تایید قرار می دهد.

بر اساس شکل ۵، آنتی بیوتیک سفنارولین از میان تمام لیگاندهای مورد بررسی بالاترین انرژی اتصال را با تمام پروتئین های مورد مطالعه داشته است. متی سیلین نیز در

۳-۴. اثر ترکیبات موثره اسانس در مقاومت

آنتی بیوتیکی و بیوفیلם باکتری با استفاده از داکینگ مولکولی

در این مطالعه، هدف اصلی از داکینگ مولکولی بررسی اثر ترکیبات مهم اسانس بادرنجبویه (سیترونال، تیمول، سیترال، بتاکاریوفیلن، منتاترین، لینالول و کارواکرول) بر پروتئین های *استافیلوکوکوس/رئوس* (پروتئین های $PBP2a$, $agrA$, Bap) بوده است. همچنین این تست، برای مقایسه اثرات آنتی بیوتیک ها (سفنارولین و متی سیلین) و لیگاندهای گیاهی بر پروتئین های مورد مطالعه، جایگاه فعال و جایگاه آلوستریک پروتئین $PBP2a$ و همچنین بررسی این که آیا فایل های ساختاری مختلف از یک پروتئین بر نتایج داکینگ می تواند موثر باشد، به کار گرفته شد. نتایج این سنجش در شکل های ۴ و ۵ آورده شده است. با توجه به شکل ۴، اثر

مرتبه دوم قرار می گیرد. بنابراین، هیچ یک از ترکیبات اسانسی انرژی اتصال بالاتری نسبت به آنتی بیوتیک سفترالین و حتی متیسیلین نداشته اند. در میان ترکیبات مورد بررسی، بتاکاریوفیلین بالاترین میل اتصال هم برای جایگاه فعال و هم جایگاه آلوستریک پروتئین PBP2a را نشان داده است و بعد از آن ترکیبات کارواکرول و تیمول قرار دارند.

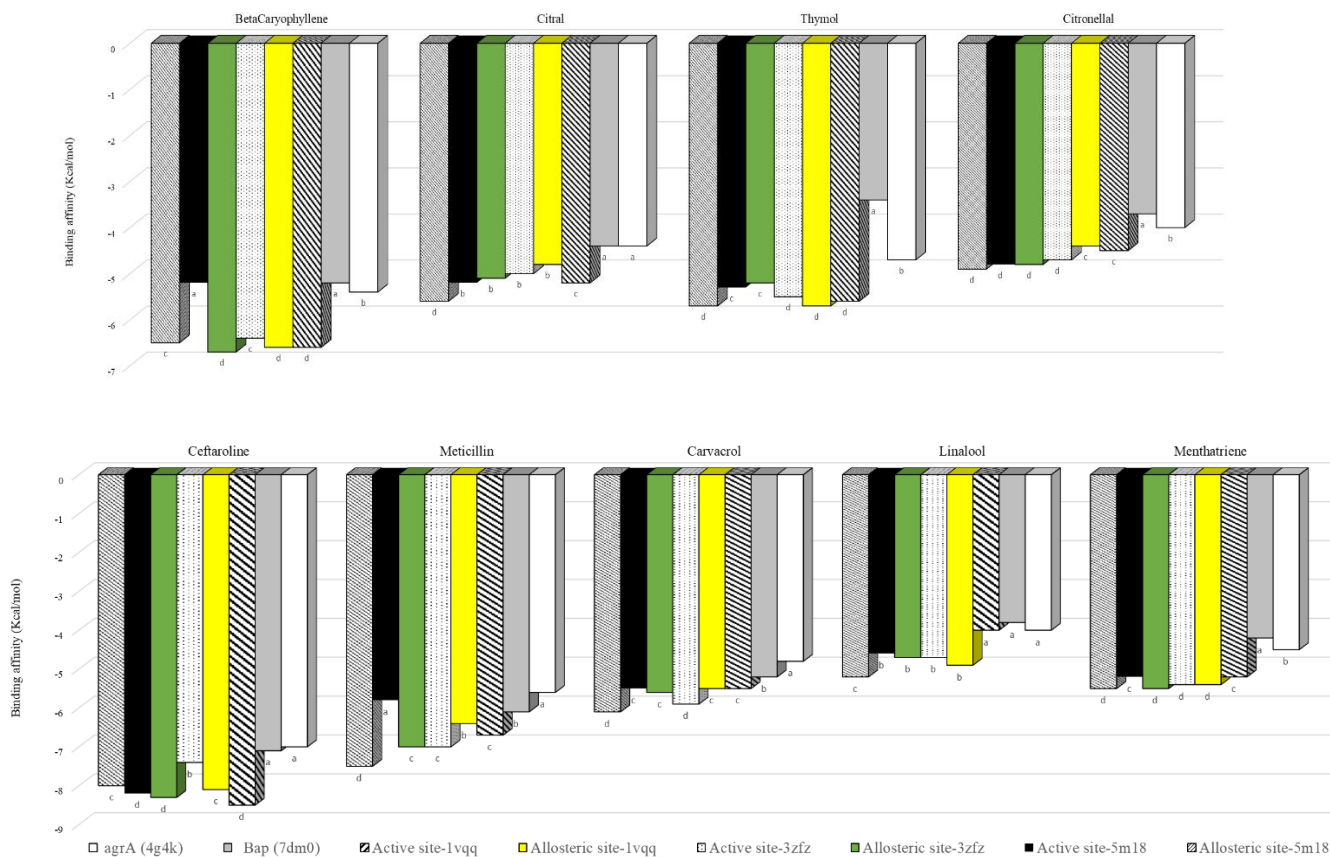


Fig 4 Molecular docking results. Lowercase letters near each column represent statistically significant differences in the results (p -value < 0.05). Columns having the same letter are not significantly different.

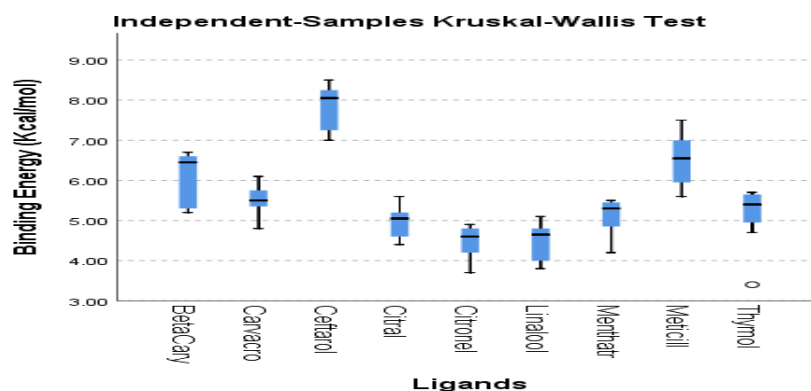


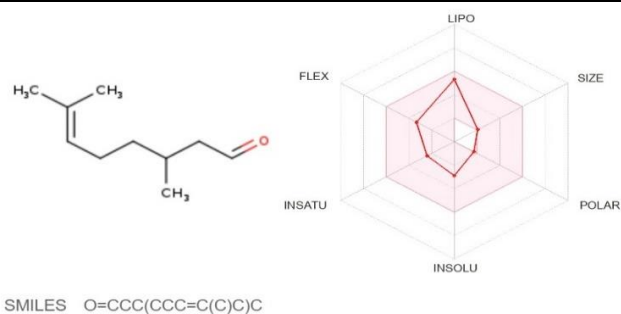
Fig 5 Analysis of molecular docking results using Kruskal-Wallis test

مورد بررسی در این مطالعه، در نمودار راداری در محدوده مجاز قرار گرفته‌اند و می‌توانند به‌عنوان داروهمانند در نظر گرفته شوند.

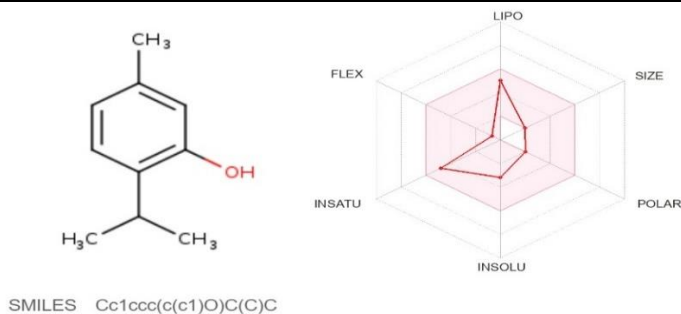
۳-۵. خصوصیات فارماکوکینتیک کاندیدهای دارویی

نتایج خصوصیات فارماکوکینتیک و شبیه دارو بودن ترکیبات توسط سرور SwissADME در شکل ۷ آورده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود تمام ترکیبات

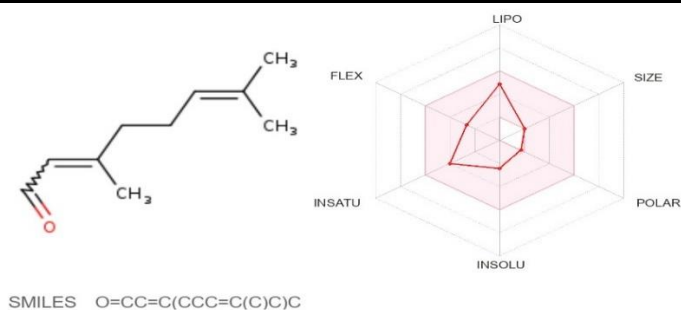
(Citronellal)



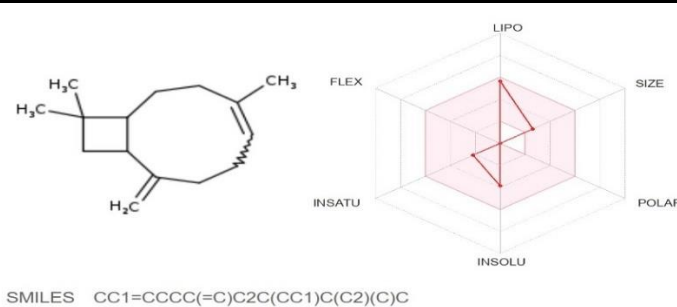
(Thymol)



(Citral)

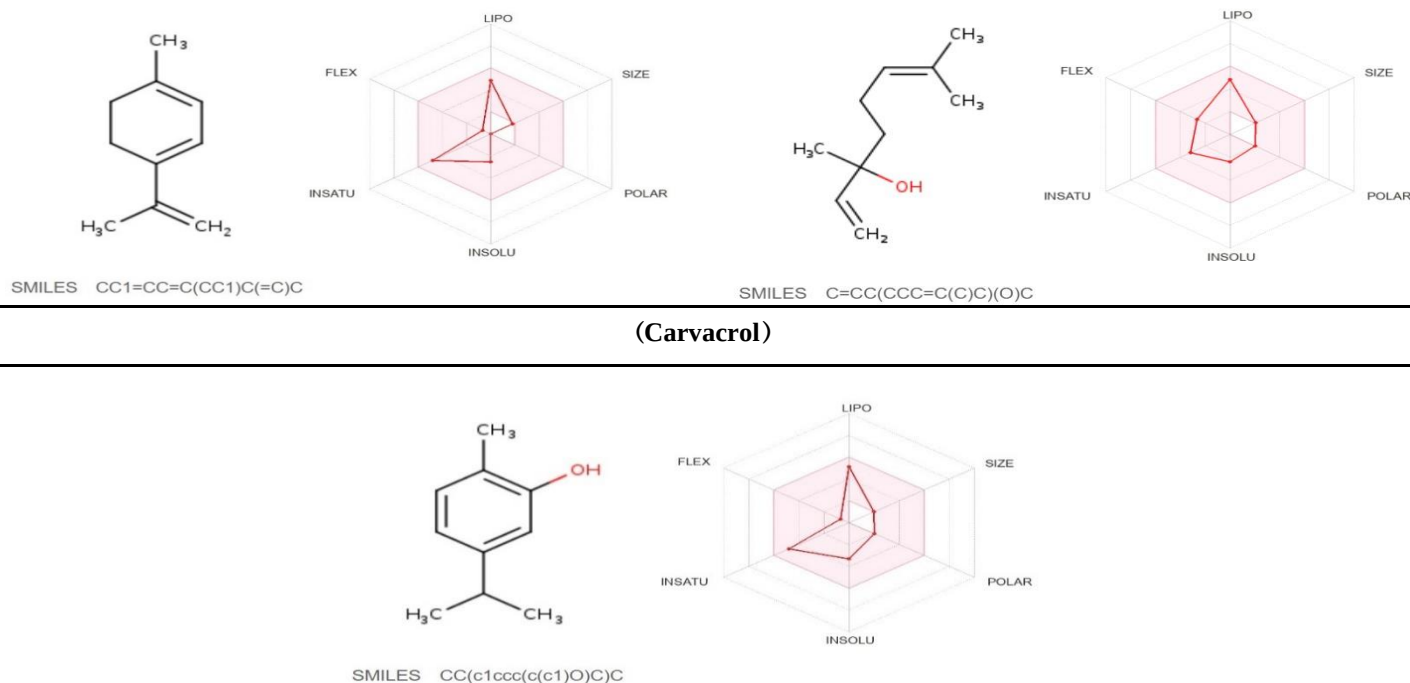


(B-Caryophyllene)



(1,3,8-P-Menthatriene)

(Linalool)



(Carvacrol)

Fig 6 Physicochemical properties of the effective compounds of the studied essential oils by the SwissADME server

Carcinogenicity (trinary) مدل‌های مورد بررسی در طبقه‌بندی پتانسیل سرطان‌زا بودن ترکیب است [30]. منظور از hERG زیرواحد آلفای کانال یونی پتاسیم است که این کانال نقش مهمی در هدایت الکتریکی قلب دارد و به هماهنگ کردن ضربان قلب کمک می‌کند. منظور از آروماتاز^۲ یا استروژن سنتتاز، آنزیمی است که مسئول یک مرحله کلیدی در بیوسنتز استروژن است [31]. منظور از PPAR γ ^۳ گیرنده فعال‌کننده تکثیر پراکسی زوم گاما است یک رستپور هسته‌ای است که به‌عنوان فاکتور رونویسی عمل می‌کند و در ذخیره اسیدهای چرب و متابولیسم گلوکز نقش دارد. خانواده گیرنده‌های هسته‌ای PPAR نقش تنظیمی عمده‌ای در هموستاز انرژی و عملکرد متابولیک ایفا می‌کنند [32].

همچنین خصوصیات فارماکوکینتیک لیگندهای گیاهی مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است. در این جدول، منظور از GI absorption (میزان جذب از طریق سیستم گوارشی)، BBB permeant (نفوذ از سد خونی مغزی)^۱، P-gp substrate (سوبسترای گلیکوپروتئین P که یک پروتئین انتقال‌دهنده بوده و نقش مهمی در مقاومت چند دارویی با واسطه انتقال فعال داروها از داخل سلول به خارج سلول ایفا می‌کند)، CYP inhibitors (مهارکننده‌های مختلف سیتوکروم P450 (CYP450) که برای تولید عوامل متعددی از جمله کلسترول و استروئیدها و برای سم‌زدایی مواد شیمیایی خارجی و متابولیسم داروها ضروری هستند)، Log Kp (معیاری برای بیان نفوذ به پوست) می‌باشد.

نتایج سمیت دارویی به‌دست‌آمده از سرور admetSAR در جدول ۴ ذکر شده است. در این جدول، منظور از Carcinogenicity (binary) و

2- Aromatase

3- Peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPAR- γ or PPARG)

1- Blood-brain barrier penetration (BBB)

Table 3 Pharmacokinetic characteristics of the effective compounds of the studied essential oils by SwissADME server

Pharmacokinetics	Citronellal	Thymol	Citral	B-Caryophyllene	1,3,8-P-Menthatriene	Linalool	Carvacrol
GI absorption	High	High	High	Low	Low	High	High
BBB permeant	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P-gp substrate	No	No	No	No	No	No	No
CYP1A2 inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	Yes
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	Yes	No	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	Yes	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No
CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No
Log Kp (skin permeation)	-4.52 cm/s	-4.87 cm/s	-5.08 cm/s	-4.44 cm/s	-4.97 cm/s	-5.13 cm/s	-4.74 cm/s
Lipinski	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Table 4 Medicinal toxicity characteristics of the effective compounds of the studied essential oils by the admetSAR server

Admet predicted profile	Citronellal	Thymol	Citral	B-Caryophyllene	1,3,8-P-Menthatriene	Linalool	Carvacrol
Carcinogenicity (binary)	-	-	-	-	-	-	-
Carcinogenicity (trinary)	Non-required	Non-required	Non-required	Warning	Warning	Non-required	Non-required
Eye corrosion	+	+	+	-	+	-	+
Eye irritation	+	+	+	+	+	+	+
Ames mutagenesis	-	-	-	-	-	-	-
hERG (the human Ether-à-go-go-Related Gene) inhibition	-	-	-	+	-	-	-
Micronuclear	-	-	-	-	-	-	-
Hepatotoxicity	+	+	+	-	+	-	-
skin sensitization	+	+	+	+	+	+	+
Respiratory toxicity	-	-	-	-	-	-	-
Reproductive toxicity	-	-	-	-	+	-	-
Mitochondrial toxicity	-	+	-	-	-	-	+
Nephrotoxicity	+	-	+	+	+	+	-
Acute Oral Toxicity (c)	III	III	III	III	III	III	III
Estrogen receptor binding	-	-	-	-	-	-	-
Androgen receptor binding	-	-	-	-	-	-	-
Thyroid receptor binding	-	-	-	-	-	-	-
Glucocorticoid receptor binding	-	-	-	-	-	-	-
Aromatase binding	-	-	-	-	-	-	-
PPAR gamma	-	-	-	-	-	-	-
Biodegradation	+	-	+	-	+	+	-

۴- بحث

گزارش‌ها حضور سویه‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس ارئوس* و مخصوصاً MRSA از منابع غذایی مختلف از جمله گوشت‌های فرآوری شده و همچنین شیوع عفونت‌های بیمارستانی تهدیدکننده حیات از جمله پنومونی، باکتری می و عفونت‌های زخم جراحی ناشی از این باکتری، زنگ خطری جدی است که می‌تواند در سال‌های آینده در صورت پیدا نشدن جایگزین‌های آنتی‌بیوتیکی، مشکلات بالینی عمده‌ای را در پی داشته باشد. به دلیل مقاومت گسترده آنتی‌بیوتیکی بتالاکتام‌ها، خط اول درمان عفونت‌های جدی سویه‌های MRSA، آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی) می‌باشد. هم آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و هم ونکومایسین، در نهایت یکپارچگی دیواره سلولی باکتری را تضعیف و منجر به لیز باکتری می‌شوند. با این حال گزارش‌های افزایش مقاومت به ونکومایسین، محققان را دریافتن کاندیدهای دارویی مناسب‌تر ترغیب کرده است [33].

با این وجود، در توسعه داروهای مدرن، علاوه بر ارزیابی کارایی آن‌ها، باید توانایی داروها برای رسیدن به اهدافشان در شکل زیست فعال نیز بررسی گردد. این بررسی‌ها، شامل آزمایش‌های بالینی در سطح سلول، حیوانی و انسانی است که اغلب پرهزینه و مملو از خطرات ایمنی هستند. در این راستا، استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی که می‌توانند با صرفه‌جویی در زمان و هزینه کمک شایان توجهی داشته باشند، راهگشا خواهد بود [34]. در این مطالعه، به بررسی اثرات برخی از اسانس‌های خانواده نعنائیان (مریم گلی، نعنا فلفلی و بادرنبویه) بر سویه‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس ارئوس* پرداخته شد. از میان اسانس‌های مورد بررسی، اسانس بادرنبویه نتایج بهتری را نسبت به اسانس‌های مریم گلی و نعنا فلفلی نشان داد. نتایج اولیه با استفاده از تست دیسک دیفیوژن نشان داد که اسانس بادرنبویه در غلظت ۹ میکروگرم، نه بر روی سویه MRSA و نه VRSA اثر مهاری نداشت. در غلظت ۹۰ میکروگرم و ۹۰۰ میکروگرم، اثر آن بر روی سویه MRSA (۱۰ و ۱۵ میلی متر) نسبت به VRSA (۹ و ۱۱ میلی متر) بیشتر بوده است.

با این وجود، منجر به ایجاد هاله عدم رشد در هر دوسویه شده است. نتایج دیسک دیفیوژن بر روی سویه‌های حساس *استافیلوکوکوس ارئوس*، توسط عصاره بادرنبویه در مطالعه احمدی و همکاران (۱۳۹۵) برابر با ۲۳ میلی‌متر، توسط اسانس‌های بادرنبویه در مطالعات علیزاده و همکاران (۱۳۹۴) برابر با ۱۵ میلی‌متر و در مطالعه ارژنگ و همکاران (۱۳۹۴) برابر با ۱۵/۳۳ میلی‌متر به دست آمد [15, 16, 17]. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات قبلی که بر روی سویه‌های حساس *استافیلوکوکوس ارئوس* کارکرده‌اند، نشان می‌دهد که بادرنبویه می‌تواند در مهار رشد سویه‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی به متی سیلین و ونکومایسین *استافیلوکوکوس ارئوس* نیز موفق عمل کند. همچنین مقایسه نتایج دیسک دیفیوژن مطالعه حاضر با مطالعات قبلی که بر روی سویه MRSA کارکرده بودند، مانند مطالعه ابو-شباب و همکاران (۲۰۰۶) که عصاره آبی (۱۲ میلی‌متر) و اتانولی (۱۵ میلی‌متر) بادرنبویه را بر روی MRSA اثر داده بودند و مطالعه سیپاهی و همکاران (۲۰۲۲) که به بررسی اسانس (۲۵ میلی‌متر) بادرنبویه بر روی MRSA پرداختند، جالب‌توجه بوده است [18, 19]. علت تفاوت در نتایج به‌دست‌آمده در مطالعات مختلف، علاوه بر این‌که به نامعلوم بودن غلظت عصاره یا اسانس بادرنبویه در تست دیسک دیفیوژن مطالعات قبلی برمی‌گردد، می‌تواند به دلیل شرایط تست متفاوت، تفاوت در غلظت و نوع ترکیبات گیاهی و سویه‌های MRSA متفاوت باشد، اما بازهم تأیید می‌کند که اسانس بادرنبویه می‌تواند اثرات آنتی باکتریال بر سویه‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس ارئوس* داشته باشد. میزان MIC و MBC اسانس بادرنبویه بر روی سویه MRSA در مطالعه حاضر، به ترتیب برابر با ۰/۰۵ و ۰/۱۱۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به دست آمد. در حالی که میزان MIC و MBC اسانس بادرنبویه بر روی سویه VRSA به ترتیب برابر با ۱/۸ و ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. در تست‌های MIC و MBC نیز، در غلظت‌های نزدیک به ۹ میکروگرم اسانس، اثر مهاری بر سویه‌های مورد بررسی مشاهده نشد که در توافق با نتایج تست دیسک دیفیوژن است. در مطالعه ارژنگ و همکاران (۱۳۹۴) MIC و MBC اسانس بادرنبویه بر سویه‌های حساس *استافیلوکوکوس*

برای کشته شدن باکتری پلانکتونی (MBC) و کشته شدن باکتری موجود در بیوفیلم (MBEC) سویه MRSA مورد نیاز است. اما در مورد سویه VRSA غلظت بیشتری از اسانس بادرنجبویه، برای مهار رشد باکتری موجود در بیوفیلم ($MBIC = 3/2 \text{ mg/mL}$) نسبت به باکتری پلانکتونی ($MBC = 2/5 \text{ mg/mL}$) مورد نیاز بود. این نتیجه نشان می‌دهد که تشکیل بیوفیلم در سویه VRSA در مقاومت این سویه نسبت به اسانس تأثیر داشته است. به دلیل مشاهده خاصیت باکتری‌سیدالی اسانس بادرنجبویه، یکی از مکانیزم‌های ضد میکروبی ترکیباتی که می‌توانند اثرات باکتری‌سیدالی داشته باشند، اثر بر سنتز دیواره سلولی باکتری‌ها است [36]. بنابراین در داکینگ مولکولی، به بررسی میانکشی ترکیبات مؤثره اسانس بادرنجبویه بر پروتئین دخیل در سنتز دیواره /ستافیلوکوکوس/ارئوس مقاوم یعنی PBP2a پرداخته شد، تا احتمالاً مکانیزم عملکردی اسانس بادرنجبویه بر این باکتری مشخص شود. علاوه بر بررسی چگونگی برهمکنش ترکیبات اسانس بادرنجبویه با جایگاه فعال PBP2a، نحوه برهمکنش آن‌ها با جایگاه آلوستریک PBP2a نیز مورد مطالعه قرار گرفت، زیرا ماهاسنان^۱ و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کرده بودند که جایگاه آلوستریک PBP2a که از جایگاه فعال این آنزیم دورتر است، زمانی که به درستی توسط آنتی‌بیوتیک بتالاکتام یا سوبسترا (مانند رشته پپتیدوگلیکان همسایه) اشغال شود، باقی‌مانده‌های دروازه‌بان^۲ را در جایگاه فعال باز می‌کند و ترکیب باقی‌مانده‌های کلیدی را مجدداً تنظیم می‌کند تا امکان کاتالیز فراهم شود. به این ترتیب PBP2a توسط آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مهار نخواهد گشت. همچنین این فرضیه با مشاهده اینکه سفترالین (یکی از دو سفالوسپورین مؤثر ضد MRSA) به صورت کووالانسی به جایگاه فعال و به طور غیرکووالانسی به محل آلوستریک متصل می‌شود، نیز اثبات می‌شود. به علاوه، در سویه‌های بالینی مقاوم به سفترالین که اخیراً کشف شده‌اند، جهش‌های نقطه‌ای در جایگاه آلوستریک PBP2a مشاهده شده است. به نظر می‌رسد تنظیم آلوستریک فعالیت PBP2a اهمیت تکاملی قابل توجهی داشته باشد [2]. نتایج این مطالعه نیز نشان داده است (شکل ۵) که آنتی‌بیوتیک

ارئوس بالای ۲۰۰ میکروگرم یا ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در هر دو تست و در مطالعه علیزاده و همکاران (۱۳۹۴) میزان MIC برابر ۰/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و میزان MBC برابر با ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر گزارش شده است [16, 17]. بنابراین می‌توان گفت اسانس بادرنجبویه در مطالعه حاضر، دارای اثر مهاری یا کشندگی بیشتری نسبت به مطالعات ذکر شده داشته است؛ با وجود این که در مطالعات نامبرده از سویه‌های حساس /ستافیلوکوکوس/ارئوس استفاده شده و نتایج تست دیسک دیفیوژن مطالعه حاضر مشابه با آن‌ها بوده است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مقایسه اثرات ضد باکتریایی بین مطالعات مختلف بهتر است بر اساس تست دیسک دیفیوژن صورت نگیرد بلکه تست میکروتیتراپلست که در آن غلظت‌های مشخص و متفاوتی از ماده ضد میکروبی مورد بررسی قرار می‌گیرد، برای مقایسه ارجح‌تر است. در هر دو سویه MRSA و VRSA غلظتی از اسانس که باعث کشته شدن باکتری پلانکتونی می‌شود (MBC)، نسبت به غلظتی از آن که باعث مهار رشد باکتری پلانکتونی می‌گردد (MIC) ۲ برابر بوده است. از آنجائی که ترکیبات ضد میکروبی در صورتی که میزان MIC و MBC آن‌ها بیش از ۴ برابر تفاوت نداشته باشند، باکتری‌سیدال در نظر گرفته می‌شوند، بنابراین می‌توان گفت اسانس بادرنجبویه بر روی سویه‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی /ستافیلوکوکوس/ارئوس خاصیت باکتری‌سیدالی از خود نشان داده است [35]. علاوه بر مهار رشد باکتری، اسانس بادرنجبویه نتایجی مثبتی بر تشکیل بیوفیلم (MBIC) و همچنین بر مهار رشد باکتری‌های موجود در بیوفیلم (MBEC) از خود نشان داد. نتایج تست‌های MBIC و MBEC در سویه MRSA به ترتیب برابر با ۰/۰۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و ۰/۱۱۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین نتایج تست‌های MBEC و MBIC در سویه VRSA به ترتیب برابر با ۰/۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و ۳/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر می‌باشد. در مقایسه این نتایج با نتایج MIC و MBC اسانس بادرنجبویه می‌توان گفت که در هر دو سویه مورد بررسی، اسانس بادرنجبویه در غلظت کمتر منجر به مهار تشکیل بیوفیلم (MBIC) و در غلظت بالاتر منجر به مهار رشد باکتری (MIC) می‌گردد (شکل‌های ۲ و ۳). جالب است که غلظت‌های مشابهی از اسانس

1- Mahasanen

2- Gatekeeper residues

بالین وجود، نتایج داکینگ این مطالعه نشان داد که هیچ کدام از ترکیبات موثره اسانس بادرنبویه موردبررسی، میل اتصالی بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام موردبررسی چه در جایگاه فعال و چه در جایگاه آلوستریک نداشتند. این نتایج می تواند با نتایج تست های آزمایشگاهی که اسانس بادرنبویه بر روی سویه های MRSA و VRSA مؤثر بود، در تناقض به نظر آید. اما باید در نظر داشت که در اسانس، مجموعه ای از ترکیبات موثره باهم موردبررسی قرار می گیرند، اما در فرآیند داکینگ هر ترکیب به صورت مجزا آنالیز می شود. به عبارت دیگر، اثرات احتمالی سینرژیسمی ترکیبات باهم نیز، باید در نظر گرفته شود. از طرف دیگر، مکانیزم عملکردی ترکیبات موثره اسانس، می تواند اثر بر سنتز دیواره و به عبارت دیگر پروتئین PBP2a نباشد. بنابراین، به منظور پی بردن به مکانیزم عملکردی این ترکیبات، نیاز به تحقیقات بیشتری است. بنابراین در این مطالعه، به بررسی اثر ترکیبات اسانس بادرنبویه بر پروتئین های مؤثر در تشکیل بیوفیلم از جمله پروتئین در ارتباط با بیوفیلم (Bap) و همچنین پروتئین *agrA* نیز پرداخته شد. پروتئین *agrA* یکی از اجزای سیستم سیگنالینگ کلاسیک دوجزئی در سیستم کوثروم سنسینگ است (پروتئین تنظیم پاسخ) و در صورت فعال شدن، منجر به افزایش بسیار زیاد رونویسی از پروموتورهای P2 و P3 اپرون *agr*، در اواخر فاز $\log$ منحنی رشد، یعنی زمانی که غلظت مولکول های سیگنال در محیط بالا است، می شود [41]. از میان لیگاند های گیاهی موردبررسی، بتاکاریوفیلین و کارواکرول بالاترین میل اتصالی را به پروتئین های Bap و *agrA* نشان دادند. هرچند میل اتصالی آن ها برای پروتئین های ذکر شده کمتر از پروتئین PBP2a می باشد.

با توجه به اثرات مثبت اسانس بادرنبویه بر سویه های مقاوم /ستافیلوکوکوس /رئوس، ترکیبات این اسانس از نظر خصوصیات مختلف و احتمال داروهمانند بودن، توسط سروهای آنالیز ADMET موردبررسی قرار گرفت (جداول ۳ و ۴). به طور کلی می توان گفت، تمامی ترکیبات موردبررسی خصوصیات قابل توجهی را در این آنالیز از خود نشان دادند و از قانون ۵ لیپسنکی تبعیت می کردند و بنابراین در صورت استفاده به عنوان دارو، به صورت خوراکی قابل جذب هستند. همچنین نتایج این بررسی نشان داده تمامی

سفارولین انرژی اتصالی بالاتری نسبت به متی سیلین چه در جایگاه فعال و چه در جایگاه آلوستریک داشته است. این نتیجه می تواند علت حساسیت سویه های MRSA به این آنتی بیوتیک را به خوبی روشن سازد. از میان ترکیبات اسانس بادرنبویه، ترکیب بتاکاریوفیلین بالاترین انرژی اتصالی را با جایگاه فعال و جایگاه آلوستریک پروتئین PBP2a نشان داد. انرژی اتصالی بتاکاریوفیلین هم در جایگاه آلوستریک و هم در جایگاه فعال با متی سیلین قابل مقایسه بود، در حالی که بقیه ترکیبات موردبررسی اسانس بادرنبویه، انرژی اتصالی کمتری را در هر دو جایگاه پروتئین PBP2a از خود نشان دادند. بتاکاریوفیلین یا ترانس کاریوفیلین، یک سسکویی ترپن دو حلقه ای است که در چندین گیاه از جمله دارچین، رزماری و فلفل قرمز یافت می شود. این مولکول در طول مسیر موالونات در گیاهان از مولکول پیش ساز استیل کوآ تولید می شود. بتاکاریوفیلین هم به دلیل ساختار منحصر به فرد که در طبیعت غیرمعمول است و هم به دلیل عطر و طعم شیرین مطلوبش، مورد توجه محققان قرار گرفته است [37, 38, 39]. لازم به ذکر است که بتاکاریوفیلین یک آگونیست فیتوکانابینوئیدی انتخابی از گیرنده های نوع ۲ (CB_2-R) است، اما به دلیل عدم تمایل به گیرنده کانابینوئید نوع ۱ (CB_1)، جز ترکیبات روان گردان محسوب نمی شود. این ترکیب، اثرات ضد تشنج، ضد درد، آرام بخشی و ضد افسردگی دارد. در میان فعالیت های بیولوژیکی مختلف، بتاکاریوفیلین از طریق مهار واسطه های التهابی اصلی، مانند نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS)، اینترلوکین ۱ بتا ($IL-1\beta$)، اینترلوکین ۶ ($IL-6$) و فاکتور نکروز تومور (TNF)، اثر ضد التهابی نشان داده است [38]. علاوه بر این، نتایج دیگر مطالعات اثربخشی بتاکاریوفیلین در عفونت های /ستریپتوکوکوی را نشان داده اند [40].

در مجموع، با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان گفت اسانس بادرنبویه اثرات ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی مناسبی علیه سویه های MRSA و VRSA باکتری استافیلوکوکوس ارئوس نشان داد. همچنین بررسی های In-Silco ترکیبات این اسانس علیه پروتئین مؤثر بر مقاومت به متی سیلین (PBP2a)، کوئروم سنسینگ (agrA) و تولید بیوفلم (Bap) نشان داد که احتمالاً این ترکیبات به صورت سینرژسم عمل می کنند. از میان ترکیبات اسانس بادرنبویه، بتاکاریوفیلین و کارواکرول نتایج بهتری علیه پروتئین های PBP2a، agrA و Bap نشان دادند. از طرفی، نتایج به دست آمده از آنالیز ADMET ترکیبات مؤثره این اسانس نیز قابل قبول بود. بنابراین، اسانس بادرنبویه می تواند به عنوان یک ماده ضدمیکروبی طبیعی با عوارض جانبی کم برای پیشگیری و همین طور درمان عفونت های استافیلوکوکوس ارئوس از جمله عفونت های ناشی از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر: نویسندگان مقاله از دانشگاه گنبد کاووس و مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود به دلیل فراهم آوردن شرایط انجام تست های آزمایشگاهی این مطالعه، کمال تشکر را دارند.

۶- منابع

- [1] Mohamadi, S., Rezaee, R., Hashemi, M., Kiani, B., Ghasemi, S., Alizadeh Sani, M., & Afshari, A. (2023). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), and Vancomycin-Resistant *Enterococci* (VRE) contamination of food samples in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 17(2), 2-2.
- [2] Mahasanen, K. V., Molina, R., Bouley, R., Batuecas, M. T., Fisher, J. F., Hermoso, J. A., ... & Mobashery, S. (2017). Conformational dynamics in penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, allosteric communication network and enablement of catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 139(5), 2102-2110.
- [3] Fishovitz, J., Hermoso, J. A., Chang, M., & Mobashery, S. (2014). Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB life*, 66(8), 572-577.
- [4] Périchon, B., & Courvalin, P. (2009). VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(11), 4580-4587.
- [5] Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), e00026-19.
- [6] David MZ, Daum RS. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Staphylococcus aureus: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis*. 2017:325-83.

ترکیبات (به جز بتاکاریوفیلین)، مهارکننده انواع مختلف سیتوکروم p450 نبودند، بنابراین اختلالی در سم زدایی مواد شیمیایی خارجی و متابولیسم داروها توسط این ترکیبات در بدن ایجاد نمی شود. مهار ایزوفرم های مختلف سیتوکروم P450 (بیشتر از همه، CYP3A4) توسط بتاکاریوفیلین توسط مطالعات قبلی نیز گزارش شده است [38]. همچنین ترکیبات مورد بررسی، در تست های پتانسیل سرطان زایی (مدل binary، مدل trinary و تست Ames) خاصیت سرطان زایی از خود نشان ندادند. لازم به ذکر است که بسیاری از مطالعات *In vitro* و *In vivo* نشان می دهند بتاکاریوفیلین حتی خاصیت ضدتوموری دارد و فنوتیپ حیوانات مورد استفاده برای مدل سازی تومورها (کولون، سینه، پانکراس، لنفوم، ملانوم و سرطان گلیوما) و همچنین بیماری های سیستم عصبی (بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر، مولتیپل اسکلروزیس، اسکروز جانبی آمیوتروفیک، سکنه مغزی) را بهبود می بخشد [38]. همچنین از آنجائی که هیچ یک از ترکیبات به عنوان سوبسترای P-gp یا گلیکوپروتئین P نبودند، در صورت استفاده از آن ها به عنوان دارو همانند، مقاومت چند دارویی مشاهده نخواهد شد.

۵- نتیجه گیری

- [7] Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.
- [8] Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602.
- [9] Saipriya, K., Swathi, C. H., Ratnakar, K. S., & Sriharan, V. (2020). Quorum-sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potential target for new drug development. *Journal of applied microbiology*, 128(1), 15-27.
- [10] Ta, C. A. K., & Arnason, J. T. (2015). Mini review of phytochemicals and plant taxa with activity as microbial biofilm and quorum sensing inhibitors. *Molecules*, 21(1), 29.
- [11] Moradi, F., & Hadi, N. (2021). Quorum-quenching activity of some Iranian medicinal plants. *New Microbes and New Infections*, 42, 100882.
- [12] Bouyahya, A., Chamkhi, I., Balahbib, A., Rebezov, M., Shariati, M. A., Wilairatana, P., ... & El Omari, N. (2022). Mechanisms, anti-quorum-sensing actions, and clinical trials of medicinal plant bioactive compounds against bacteria: a comprehensive review. *Molecules*, 27(5), 1484.
- [13] Ehsani, A., Alizadeh, O., Hashemi, M., Afshari, A., Aminzare, M. (2017). Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. *Veterinary Research Forum*, 8 (3), 223-229.

- [14] Guan, L., Yang, H., Cai, Y., Sun, L., Di, P., Li, W., ... & Tang, Y. (2019). ADMET-score—a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *Medchemcomm*, 10(1), 148-157.
- [15] Ahmadi, E., Abdollahi, A., Najafipour, S., Meshkibaf, M. H., Fasihi Ramandi, M., Namdar, N., ... & Allahverdi, G. (2016). Surveying the effect of the phenol compounds on antibacterial activity of herbal extracts: in vitro assessment of herbal extracts in Fasa-Fars province. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 6(2), 210-220.
- [16] Arzhang, M., Dakhili, M., & Farahani, F. (2015). Investigation of Chemical Compounds and Anti-microbial Activity of Essential Oil of Melissa officinalis L. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 9(1), 7-13.
- [17] Alizade, O., Ehsani, A., Hashemi, M., Mohamadi, S., & Khalili, S. (2015). Comparative antibacterial effects of essential oils of Melissa officinalis and Deracocephalum moldavica L. against some pathogenic bacteria in food in vitro. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 17(4), 80-87.
- [18] Abu-Shanab, B., ADWAN, G. M., Jarrar, N., Abu-Hijleh, A., & Adwan, K. (2006). Antibacterial activity of four plant extracts used in Palestine in folkloric medicine against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Turkish Journal of Biology*, 30(4), 195-198.
- [19] Sipahi, N., Kekeç, A. I., & Halaç, B. (2022). In Vitro Effect of Some Essential Oils against Multiple Antibiotic-Resistant Bacteria from Cats and Dogs. *Pakistan Veterinary Journal*, 42(4), 561-565.
- [20] Shariati, A., Dadashi, M., Moghadam, M. T., van Belkum, A., Yaslianifard, S., & Darban-Sarokhalil, D. (2020). Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate Staphylococcus aureus clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.
- [21] Handa, S. S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1(1), 21-40.
- [22] Phuyal, N., Jha, P. K., Raturi, P. P., Gurung, S., & Rajbhandary, S. (2019). Essential oil composition of Zanthoxylum armatum leaves as a function of growing conditions. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1873-1885.
- [23] Dadgar, T., Ghaemi, E., Bazueri, M., Asmar, M., Mazandarani, M., Saifi, A., Bayat, H. (2008). The antibacterial effects of 20 herbal plants on methicillin resistant and sensitives S.aureus in Golestan province. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, 9(1), 55-62.
- [24] Qureshi, K. A., Imtiaz, M., Parvez, A., Rai, P. K., Jaremko, M., Emwas, A. H., ... & Fatmi, M. Q. (2022). In vitro and in silico approaches for the evaluation of antimicrobial activity, time-kill kinetics, and anti-biofilm potential of thymoquinone (2-Methyl-5-propan-2-ylcyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione) against selected human pathogens. *Antibiotics*, 11(1), 79.
- [25] Hassanshahiyan, M., Saadatfar, A., & Masoumi, F. (2018). Antimicrobial properties of Hyssopus officinalis extract against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm form. *Biological Journal of Microorganism*, 7(28), 91-101.
- [26] Yaghoobi, M. M., Khaleghi, M., Rezanejad, H., & Parsia, P. (2018). Antibiofilm activity of Dracocephalum polychaetum extract on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 5(1), 61772-61772.
- [27] Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- [28] Ndombera, F., Maiyoh, G., Tuei, V. (2019). Pharmacokinetic, physicochemical and medicinal properties of n-glycoside anti-cancer agent more potent than 2-deoxy-d-glucose in lung cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 165-176.
- [29] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.
- [30] Li, X., Du, Z., Wang, J., Wu, Z., Li, W., Liu, G., ... & Tang, Y. (2015). In silico estimation of chemical carcinogenicity with binary and ternary classification methods. *Molecular informatics*, 34(4), 228-235.
- [31] Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W. C., Robertson, K., Britt, K., ... & Jones, M. (2002). Aromatase—a brief overview. *Annual review of physiology*, 64(1), 93-127.
- [32] Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(4), 236.
- [33] Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., & Baba, T. (2014). Multi-drug-resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), 593-601.
- [34] Rao, V. S., & Srinivas, K. (2011). Modern drug discovery process: An in silico approach. *Journal of bioinformatics and sequence analysis*, 2(5), 89-94.
- [35] French, G. L. (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1107-1117.
- [36] Salamaga, B., Kong, L., Pasquina-Lemonche, L., Lafage, L., von und zur Muhlen, M., Gibson, J. F., ... & Foster, S. J. (2021). Demonstration of the role of cell wall homeostasis in Staphylococcus aureus growth and the action of bactericidal antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(44), e2106022118.
- [37] Ahmed, E. A., Abu Zahra, H., Ammar, R. B., Mohamed, M. E., & Ibrahim, H. I. M. (2022). Beta-Caryophyllene Enhances the Anti-Tumor Activity of Cisplatin in Lung Cancer Cell Lines through Regulating Cell Cycle and Apoptosis Signaling Molecules. *Molecules*, 27(23), 8354.
- [38] Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J., ... & Sinicropi, M. S. (2019). β -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences*, 9(24), 5420.
- [39] Stevens, N., & Allred, K. (2022). Antidiabetic potential of volatile cinnamon oil: A review and exploration of mechanisms using in silico molecular docking simulations. *Molecules*, 27(3), 853.
- [40] Yoo, H. J., & Jwa, S. K. (2018). Inhibitory effects of β -caryophyllene on Streptococcus mutans biofilm. *Archives of oral biology*, 88, 42-46.
- [41] Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R. P., Bes, M., ... & Lina, G. (2002). High genetic variability of the agr locus in Staphylococcus species. *Journal of Bacteriology*. 2002 Feb; 184(4): 1180–1186.



Scientific Research

Antibacterial, antibiofilm, and pharmacokinetic properties of some Lamiaceae essential oils against methicillin- and vancomycin-resistant *staphylococcus aureus*

Mohammad Valian¹, Matia Sadat Borhani^{2,*}, Esmail Babakhanzadeh Sajirani³, Eisa Jorjani⁴, Sohrab Boozarpour⁴

- 1- MSc student of Genetics, Biology Department, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran.
- 2- Assistant professor of Microbiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran.
- 3- Assistant Professor of Medicinal Plants, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran
- 4- Assistant professor of Genetics, Biology Department, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran.

ABSTRACT

The presence of methicillin-resistant (MRSA) and vancomycin-resistant (VRSA) *Staphylococcus aureus* in food raises a public health concern. This study aimed to investigate the antibacterial and anti-biofilm activity of some Lamiaceae essential oils including *Melissa Officinalis*, *Salvia officinalis*, and *Mentha piperita* against MRSA and for the first time on VRSA strains. For this purpose, the disk diffusion test, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC), and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) were determined. Then, *M. Officinalis* essential oil compounds were investigated against PBP2a, agrA, and Bap proteins using AutoDock Vina. Finally, pharmacokinetic properties were investigated using ADMETsar and SwissADME servers. Based on the obtained results, the MIC and MBC values of *M. Officinalis* essential oil against MRSA strain were equal to 0.05 and 0.112 mg/ml, and against VRSA strain were equal to 1.8 and 2.5 mg/ml, respectively. The MBIC and MBEC of *M. Officinalis* essential oil against MRSA strain were equal to 0.03 mg/ml and 0.112 mg/ml, and against VRSA strain were equal to 0.9 mg/ml and 3.2 mg/ml, respectively. The results of molecular docking showed that β -Caryophyllene had a greater binding affinity to PBP2a protein either in the active site or in the allosteric site (-6.6kcal/mol). On the other hand, the effective compounds of this essential oil, especially citronellol, thymol, and citral, were acceptable in terms of pharmacokinetic properties. Since natural antibiotics can be an alternative to conventional antibiotics in the treatment of *Staphylococcus aureus* food-borne diseases, the results of this study showed that *Melissa Officinalis* essential oil is effective on the growth and biofilm of MRSA and VRSA strains, and it can be used as a drug candidate in the prevention and treatment of infections caused by antibiotic-resistant strains of this bacterium.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/6/26

Accepted: 2023/8/7

Keywords:

Staphylococcus aureus,*Melissa Officinalis*,

Biofilm,

Molecular docking,

Antibiotic resistance

DOI: 10.22034/FSCT.20.142.82

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.142.6.6

*Corresponding Author E-Mail:

Msadat.borhani7@gmail.com;[Borhani@gonbad.ac.ir](mailto:borhani@gonbad.ac.ir)