

Comparative Study of Garlic Extract Effect on the Expression of Genes Involved in Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and the Antibiotic Tobramycin

Mansoureh Ghods Zadeh¹, Soheila Moradi Bidhendi^{2*}, Fatemeh Ashrafi³

1. Master of Microbiology, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.15.1.107](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.1.107)



ABSTRACT

Background: The expression of most genes involved in pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled and regulated by a gene system called quorum sensing (QS). The purpose of this study was to investigate the quorum quenching of garlic extract in preventing the expression of genes involved in QS system of *P. aeruginosa*.

Methods: In the present cross-sectional study, 12 *P. aeruginosa* strains were collected from burn wounds, cultured on special media and then confirmed by differential tests. The PCR test was performed to detect the *lasI* and *lasR* genes. The expression level of *lasI* gene was assessed in the presence of garlic extract and tobramycin antibiotic by real-time PCR, and the active ingredient of garlic extract was analyzed by HPLC.

Results: Examination of 12 strains cultured on special and differential media showed that all 12 strains were *P. aeruginosa*. The PCR results indicated that all strains had 100% *lasI* and *lasR* genes. The real-time PCR results also revealed that the garlic extract was able to reduce the expression level of *lasI* gene in *P. aeruginosa*. It was found that tobramycin has a greater ability to reduce the expression level of this gene compared with garlic extract.

Conclusion: This study showed that the garlic extract could reduce the expression of *lasI* gene in *P. aeruginosa* isolates, and that the active ingredients of this extract could be used to treat infections as an alternative to antibiotic therapy.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Garlic extract, Tobramycin, Quorum Sensing

Received: 2020/08/09; Accepted: 2020/10/13; Published Online: 2021/01/10

Corresponding Information:

Soheila Moradi Bidhendi, Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran Email: s.moradibidhendi@yahoo.com



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Ghods Zadeh M, Moradi Bidhendi S, Ashrafi F. Comparative Study of Garlic Extract Effect on the Expression of Genes Involved in Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and the Antibiotic Tobramycin. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (1) :107-120

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Identifying the bacterial cell-to-cell communication led to an understanding of the fact that interdependent functions are not limited to eukaryotic organisms and can also be present in bacteria. The process of cell-to-cell coordination and communication that involves the production of

extracellular and diffuse molecules, followed by the regulation of gene expression, is called quorum sensing (QS) (1). The QS is a process that has changed our view of the life cycle of bacteria, meaning that the bacteria were considered sporadic organisms in the past, and they were believed to ensure their survival

through adaptation to environmental conditions without any communication. However, researchers have now discovered the bacterial cell-to-cell communication, signaling and interaction through the information exchange. Therefore, it is concluded that the presence of a signaling network in bacteria is a complex and necessary aspect in their lives (2).

The study of cell-to-cell communication and its effects on the transcription of the unicellular organism has a variety of practical applications. One of them is the possibility of interfering with cell-to-cell communication systems in pathogenic microbes. The QS is a way for bacterial cell-to-cell signaling and exchange information between two partners; the sender and receiver of a communication molecule benefit from the process (3). In bacteria, the QS system regulates phenotypes covering bioluminescence, the production of exopolysaccharides, virulence, conjugative transfer of plasmids, the production of antibiotics and exoenzymes, the formation of biofilms, and the inhibition of growth. Types of molecules involved in communication include acyl homoserine lactones (AHL), autoinducer2 (AI2), and modified oligopeptides (4).

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic and gram-negative human pathogen. These bacteria develop urinary tract infections, respiratory tract infections, skin inflammation and edema, soft tissue infections, bacteremia, bone and joint infections, stomach and intestinal infections, various systemic infections, especially in patients with severe burns, cancer and AIDS having experienced immunosuppression (5). Disruption of the QS system of *P. aeruginosa* has been shown to eliminate pathogenesis.

Since plants and fungi have had symbiosis with bacteria for millions of years, various mechanisms and substances may have been developed to inhibit the QS system during evolution (6). Garlic is one of the oldest plants whose medicinal effects have long been reported. Garlic has antibacterial effect due to various substances such as alliin, ahoin, allicin and allistain and therefore is consumed against gram-positive and gram-negative bacteria, fungi, parasites and viruses (7).

Since medicinal plants have been used for many years and due to the importance of *P. aeruginosa* as well as the properties of garlic, the present study aimed to investigate the effect of garlic extract on the QS system of this bacterium in order to use this extract in therapeutic process if there is any inhibition of cell-to-cell communication.

Materials and Methods

Sample Collection: In the present descriptive-analytical cross-sectional study, 12 samples of *Pseudomonas* were collected from burn wounds of hospitalized patients. The samples were transferred to the laboratory, cultured on the Blood Agar, Eosin Methylene Blue (EMB) and Mueller Hinton Agar (MHA) culture media and then tested morphologically and biochemically.

Identification of Isolates

Colonies were confirmed using standard biochemical and microbiological tests, including gram staining, oxidase, catalase, motility, citrate, TSI, indole, Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP), urease, oxidation-fermentation (OF), growth at 42°C and pigment formation on Cetrimide Agar medium, and based on the Bergey's manual of determinative bacteriology; all isolates were confirmed as *P. aeruginosa* (8).

DNA Extraction

The genomic DNA of the isolates was extracted using the GTP kit (Gene Transfer Pioneers, Iran). To this end, 1 to 2 mL of bacterial suspension cultured on EMB equivalent to 0.5 McFarland turbidity standard was used for extraction according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA stocks were stored at -20°C. The quantity and quality of the extracted DNA were examined using spectrophotometer (flow meter E6150) and agarose gel electrophoresis, respectively.

PCR Reaction to Detect the Presence of *lasI*, *lasR* and *rpoD* Genes

The PCR reaction was performed on a final volume of 20 µL containing 3 µm of DNA pattern (200 ng), 10 pmol of each primer (1 µL), 1 µL of distilled water, and 10 µm of 2x Master Mix (Amplicon). The PCR temperature program included the initial denaturation at 95°C for 3 minutes and the 35 cycle with the denaturation at 95°C for 30 seconds, the annealing at 55°C for 1 minute and the extension at 72°C for 1 minute and the final extension at 72°C for 10 minutes. Finally, the amplified segments were observed using 1.5% agarose gel electrophoresis and etidium bromide staining. The sequence of primers used is given in Table 1. The PCR reaction was performed using a thermocycler (BioRad-USA).

Table 1. Sequence of primers used in this study

Primers	Sequence	Length	Reference
lasI-F	GCTTCTGCACGGCAAGGA	63bp	(9)
lasI-R	ATGGCGAAACGGCTGAGTT	63bp	
rpoD-F	GGGCTGTCTCGAATACGTTGA	90bp	
rpoD-R	ACCTGCCGGAGGATATTTCC	90bp	
lasR-F	AAGGAAGTGTGCAGTGGTG	68bp	
lasR-R	GAGCAGTTGCAGATAACCGA	68bp	

Preparation of Garlic Extraction

After peeling garlic cloves, 125 g of garlic was crushed using a blender and then mixed with 2 liters of 70% formalin and shaken on the rotator for 48 hours. The resulting mixture was passed through sterile gauze and Whatman filter paper, and the resulting material was centrifuged by a refrigerated centrifuge at 5000 rpm for 30 minutes. Other waste products, such as cellulose and cell shells were removed from the extract and a clear yellowish solution was obtained, distilled for concentration, and stored at 4°C for subsequent testing.

HPLC Test

In this study, HPLC purification was used to purify the compounds in the immunomodulator fraction of garlic extract and to establish a suitable system for further production of immunomodulators in a shorter time for clinical trials and pharmacological examinations. The fractions collected from the filtration were separated by reversed-phase HPLC on TPV10 208 Vydac C8 reversed-phase preparative column (1 * 25 cm). Purification was performed with 0.1% TFA solution in water and 0.09% TFA solution in acetonitrile and with a flow rate of 1 ml/min from 0% to 15% TFA solutions for 60 minutes. Optical density (OD) was read at the wavelengths of 215, 254 and 280 nm.

Determination of the MIC Value using Broth Dilution Method

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for each of the bacteria in the exposure to the garlic extract and the tobramycin antibiotic using the standard method proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The method used a standard 96-well microplate, each containing 100 µL of the Mueller Hinton Broth (MHB) medium. To determine the MIC value, the dilution of garlic extract was started from 2048 µg/mL, and 100 µL were added to the first well and then pipetted into the lower wells, and the concentration dropped to the next wells. Next, 100 µL of bacterial suspension equivalent to 0.5 McFarland turbidity standard was poured into all wells. To determine the MIC value for the tobramycin antibiotic, the dilution was started from 32 µg/mL. In all wells, 100 µL of MHB medium was poured and

subsequently the first well was added by the antibiotic stock and pipetted to the next wells. After that, 100 µL of microbial suspension equivalent to 0.5 McFarland turbidity standard was added to all wells. In addition, two rows of wells were used as positive control (medium + microbial suspension) and negative control (medium + garlic extract/antibiotic). The microplates were incubated at 37°C for 24 hours. After this period, the first well with the observed growth was considered as the MIC value (10, 11).

RNA Extraction

In order to investigate the expression of *lasI* gene using *rpoD* reference gene, the RNA of *Pseudomonas* treated with garlic extract and tobramycin antibiotic according to MIC value and also untreated *Pseudomonas* was extracted using Cinna Pure-RNA kit (CinnaGen, Cat. No. PR891620, Iran). Quantus™ Fluorometer (Cat.# E6150) and Promega kit were used to quantify the RNA extracted.

Construction of cDNA

To this end, 1 µg of RNA was mixed with 1 µL of enzyme buffer, 1 µL of DNase enzyme and 0.5 µL of RNase inhibitor, respectively, and then reaching final volume of 10 µL with RNase-free water. The microtubes were incubated at 37°C for 30 min and 1 µL of EDTA 0.5M was added to each. The incubation was performed for 10 min at 65°C to inactivate the DNase enzyme; 0.5 µL of random hexamer and 0.5 µL of Oligo (dT) were added to the microtubes and incubated at 65°C for 5 min. After this time, the microtubes were transferred onto the ice and 13 µL of this MasterMix was added to each. The microtubes were incubated at 25°C for 5 min, at 42°C for 60 min, and at 70°C for 10 min. The resulting single-stranded cDNA was stored at -20°C. The used MasterMix contained 1 µL of dNTP, 4 µL of RT buffer, 2 µL of RT enzyme, 0.5 µL of RNase inhibitor and 5.5 µL of RNase-free water.

Real-time PCR Process

To perform the real-time PCR process, 10 µL of PCR MasterMix, 1 µL of each of the forward and reverse primers (Table 1), 1.5 µL of constructed cDNA and 5.6 µL of water were mixed in a microtube. Samples were placed in the device with a temperature program

including 10 minutes of initial denaturation at 94°C, 15 seconds at 94°C, 25 seconds at 55°C and 35 seconds at 72°C.

Real-time PCR Data Analysis

The real-time PCR data were analyzed by the software available in the one plusABI device using the $-\Delta\Delta CT$ method, and the final number ($2^{-\Delta\Delta CT}$) obtained from various repeats was statistically analyzed using the GenEX software

RESULTS

HPLC test: Evaluation of garlic extract using HPLC method and analysis of the resulting chromatogram showed that the highest compound in the extract is allicin. This study was compared with the internal standard (Figure 1).

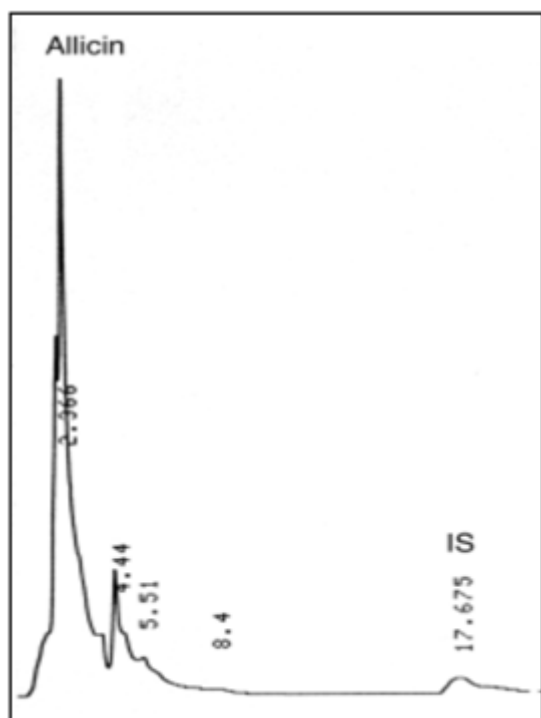


Figure 1- HPLC chromatogram for allicin and internal standard (IS 2.7.4. Polymeric nanoparticles)

MIC Determination

After 24 hours of incubation at 37°C, the sub-MIC value was determined to be 256µg/mL for garlic extract and 16µg/mL for tobramycin.

Investigating the Presence of *lasI*, *lasR* and *rpoD* Genes

The results of PCR molecular analysis for the *lasI*, *lasR* and *rpoD* genes of QS system were obtained on the basis of band observation in the mentioned region on 1% agarose gel. In the present study, all 12 (100%) samples of

P. aeruginosa isolated from clinical samples had these genes (Figures 2 and 3).

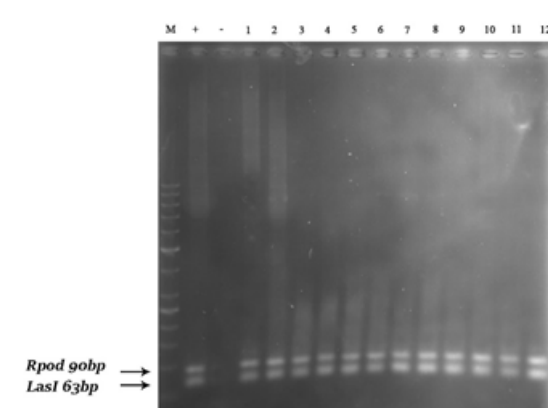


Figure 2. PCR test results for *lasI* and *rpoD* genes on a number of strains; left to right, respectively: 100-bp DNA marker plus, positive (+) control, negative (-) control, samples

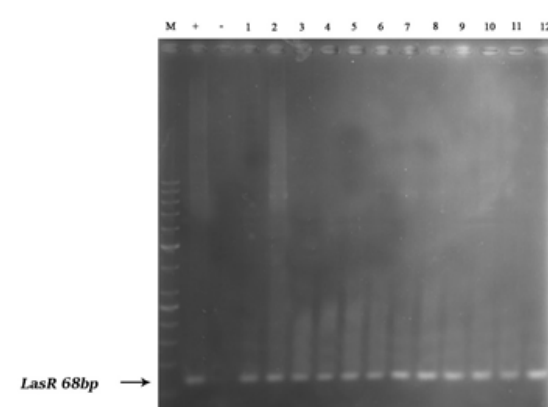


Figure 3- PCR test results for *lasR* gene on a number of strains; left to right, respectively: 100-bp DNA marker plus, positive (+) control, negative (-) control, samples

Analysis of Gene Expression

The real-time PCR technique was used to determine the rate of suppression of gene expression quantitatively in the presence of garlic extract and tobramycin. The real-time PCR process was performed for the *lasI* gene using the *rpoD* reference gene, the results of which are shown in Figures 4 (in the presence of garlic extract) and 5 (in the presence of tobramycin). The results indicated a significant difference in *lasI* gene expression between the two groups untreated and treated with garlic extract. The fold change rate for the *lasI* gene was calculated to be -1.19, indicating that this gene was reduced up to 1.19 times in the group treated with garlic extract compared to the untreated group. The expression of *lasI* gene in the tobramycin-treated group was also significantly reduced. The fold change rate for the *lasI* gene was calculated to be -1.27, indicating that the gene in the tobramycin-treated group decreased up to 1.27 times compared to the untreated group. There was no significant difference between the

effects of garlic extract and tobramycin in terms of their ability to reduce *lasI* gene expression.

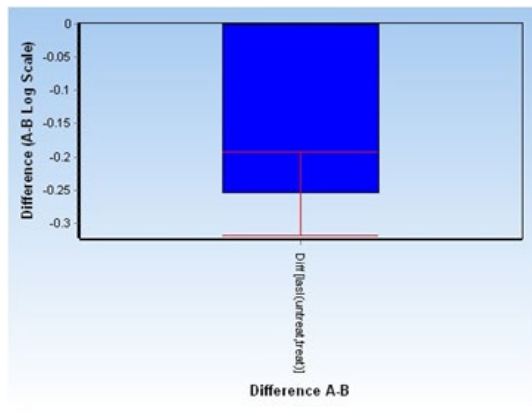


Figure 4. Diagram of $-\Delta\Delta C_T$ in the presence of garlic extract

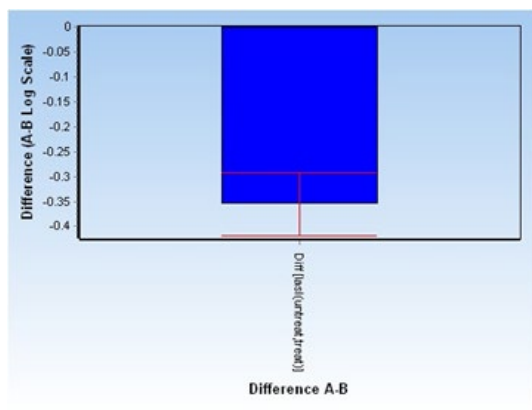


Figure 5. Diagram of $-\Delta\Delta C_T$ in the presence of tobramycin antibiotic

Discussion

The spread of bacterial infections and the development of their antibiotic resistance have prompted researchers to find natural antibacterial compounds. These studies are often performed on various plant compounds, their extracts, and their active compounds (12). The aim of this study was to investigate the effect of garlic extract on *P. aeruginosa* bacteria by evaluating the effect of garlic extract on the expression level of genes affecting bacterial QS system and in comparison with tobramycin antibiotic.

Some garlic compounds include alliin, allicin, organic acids, carbohydrates and vitamins; and the most important properties of garlic are related to allicin (13). The allicin is an essential oil with a bright yellow color and responsible for the specific aroma of garlic. The allicin is also called allicin potential or allicin yield and accounts for the antimicrobial properties of garlic. This compound plays a major part in its antibiotic properties through specific inhibition of acetylcholine A synthase; the inhibition of this enzyme inhibits lipid

biosynthesis and fatty acids and ultimately disrupts the bioavailability of microorganisms (14). One of the important features of allicin is its ability to penetrate and pass through membrane phospholipids, which is why it can freely pass through the membrane and perform its functions (15). In the analysis of garlic extract obtained in the present study using HPLC technique, the allicin was the main ingredient in the extract. Therefore, its antimicrobial effects were expected to be observed on *P. aeruginosa*, but the main objective was to evaluate the mechanism of action of this antimicrobial agent and to investigate the expression of QS-related genes and the biofilm formation in the presence of extract.

The *lasI* and *lasR* genes are inherently present in the genome structure of most pathogenic *P. aeruginosa* bacteria isolated from medical centers and develop QS system, biofilm and drug resistance in these strains. In the *P. aeruginosa* bacteria, the QS system consists of two gene systems, *LasR-LasI* and *RhlR-RhlI*. The *LasI* and *RhlI* genes express acyl-homoserine lactone (acyl-HSL) synthase, while the *LasR* and *RhlR* genes produce transcriptional regulatory proteins, which bind to their specific signals and activate target (virulence) genes (16). The QS system also exists in other species of *Pseudomonas*, but the number and sequence of their structural genes varies. Many genes in *P. aeruginosa* are controlled and expressed by QS, which are involved in pathogenesis, including *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* genes, and controlled genes called *lasB*, *apr*, and *rhlAB* in clinical isolates (17).

Plant compounds have been shown to inhibit biofilm formation in a variety of ways. Herbal extracts with bacteriostatic or bactericidal properties inhibit or reduce bacterial biofilm formation. However, some herbal compounds affect biofilm formation without bacteriostatic or bactericidal effects. Their advantage is the failure of bacteria to resist these compounds. For example, some plant compounds interfere with the QS system, which controls bacterial biofilm (18).

The garlic extract stops the QS system and accelerates the elimination of lung infection caused by *P. aeruginosa*. The garlic extract was used to treat lung infections in rats and it was found that the garlic therapy first stimulated higher levels of inflammation and significantly eliminated the pathogenic bacteria (19). Fulghesu *et al.* (2007) examined different QS inhibitory compounds in *P. aeruginosa*. They tested the inhibitory activity of three macrolide drugs and three lincosamide drugs, resveratrol, garlic extract and N-acetyl cysteine on four strains of *P. aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. All of the compounds tested were able to inhibit QS in the tested strains; only lincomycin and N-acetyl cysteine did not inhibit QS in one of the *Pseudomonas* strains (20).

In another study, the QS inhibition was investigated using a new genetic system. A set of QS inhibitor screening systems was developed that enabled them to identify a number of new natural and synthetic inhibitors. The two active inhibitors identified in this study were garlic extract and 4-nitropyridine-N-oxide (4-NPO). Transcriptome analysis based on gene arrays showed that 4-NPO and garlic extract were specific for QS-controlling virulence genes in *P. aeruginosa*. The two QS inhibitors also significantly reduced the biofilm resistance of *P. aeruginosa* compared to tobramycin (21). The QS inhibition activity was investigated by garlic extract and QS response reduction was observed in QS receptors of *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas chlororaphis* in relation to growth inhibitory effects (22). In addition, the QS inhibition and pathogenesis attenuation of *P. aeruginosa* were investigated under the influence of garlic extract and it has been shown that oral treatment with garlic extract significantly reduces the density of pulmonary bacteria. In vitro experiments also showed that the virulence factors and the formation of QS signals by the bacterium *P. aeruginosa* decreased in the presence of fresh garlic extract (23).

Accordingly, the effect of garlic extract on the QS system of *P. aeruginosa* has been proven frequently, but none of the studies mentioned have expressed the mechanism of this effect and examined the expression of QS genes. In the present study, the expression level of *lasI* gene as one of the important genes in bacterial QS system was determined by real-time PCR technique, the results of which showed that the garlic extract at a concentration of 256 µg/mL (as MIC value) decreases the expression of *lasI* gene. In order to compare decreasing effect of garlic extract on the

expression of these genes with the effect of tobramycin, the expression of *lasI* gene in the presence of this antibiotic was also investigated, which showed a greater decrease compared to the garlic extract, but not significant. Therefore, the promising results are that the active ingredients of garlic can be extracted and used as adjunctive antibiotic therapy or as an independent treatment in infections. This active ingredient was found to be allicin in the present study. It is recommended that the extracted and purified allicin in future research should be applied as an anti-QS and therefore antibacterial agent for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interests



بررسی مقایسه‌ای بین اثر عصاره سیر در بیان ژن‌های دخیل در کروم سنسینگ در باکتری سودوموناس آئروژینوز و آنتی‌بیوتیک توبرامایسین

منصوره قدس‌زاده^۱، سهیلا مرادی بیدهندی^{۲*}، فاطمه اشرفی^۳

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۹

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

موضوع: مواد ضد میکروبی

نویسنده مسئول:

سهیلا مرادی بیدهندی، دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
ایمیل:

S.moradibidhendi@yahoo.com

زمینه و اهداف: بیان اکثر ژن‌های بیماری‌زایی در باکتری سودوموناس آئروژینوزا به وسیله سیستم ژنی به نام سیستم Quorum sensing (QS) کنترل و تنظیم می‌گردد. هدف از این مطالعه، بررسی Quorum quenching عصاره سیر در پیشگیری از بیان ژن‌های دخیل در کروم سنسینگ سودوموناس آئروژینوزا بوده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه، ۱۲ سویه سودوموناس آئروژینوزا از زخم بیماران مبتلا به سوختگی جمع‌آوری گردید و سپس بر روی محیط‌های اختصاصی کشت داده شد و با تست‌های افتراقی تایید گردید. سپس آزمون PCR برای ردیابی ژن‌های *las I* و *las R* انجام گرفت. در نهایت میزان بیان ژن *las I* در حضور عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک توبرامایسین به وسیله Real Time-PCR بررسی شد و ماده موثره سیر به روش HPLC بررسی گردید.

یافته‌ها: در بررسی ۱۲ سویه پس از کشت روی محیط‌های اختصاصی و افتراقی نشان داد که هر ۱۲ سویه سودوموناس آئروژینوزا است. نتایج PCR نشان داد که در این بررسی تمام سویه‌ها دارای ژن‌های *las I* و *las R* به میزان ۱۰۰٪ هستند. نتایج Real Time - PCR هم نشان داد که عصاره سیر توانایی کاهش بیان ژن *las I* در سودوموناس آئروژینوزا را دارد. همچنین مشخص شد که آنتی‌بیوتیک توبرامایسین نیز توانایی بیشتری برای کاهش بیان این ژن نسبت به عصاره سیر دارد.

نتیجه‌گیری: این بررسی نشان داد که عصاره سیر می‌تواند بیان ژن *las I* را در سویه‌های جداشده از سودوموناس آئروژینوزا کاهش دهد و شاید بتوان از مواد موثره این عصاره در درمان عفونت‌ها به‌عنوان جایگزین درمان آنتی‌بیوتیکی استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، عصاره سیر، توبرامایسین، کروم سنسینگ

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

شناسایی ارتباط بین سلولی در میان باکتری‌ها، منجر به فهم این واقعیت شد که عملکردهای هماهنگ با یکدیگر، منحصر به ارگانیسم‌های یوکاریوتی نبوده و در باکتری‌ها نیز وجود دارد. به فرآیند هماهنگی و ارتباط بین سلولی که شامل تولید مولکول‌های خارج سلولی و قابل انتشار و در پی آن تنظیم بیان ژن‌ها است، کروم سنسینگ (QS) اطلاق می‌گردد (۱). کروم سنسینگ فرآیندی است که دید ما را نسبت به نحوه زندگی باکتری‌ها تغییر داده است. بدین معنی که در گذشته، باکتری‌ها موجوداتی منفرد به شمار می‌آمدند و اعتقاد بر این بود که بقای خود را از طریق سازگار شدن با شرایط محیطی و بدون برقراری هیچ گونه ارتباطی، تضمین می‌کنند. ولی امروزه محققان به وجود

سیگنالینگ و ارتباط سلول به سلول در باکتری‌ها و میان‌کنش آنها از طریق تبادل اطلاعات با سایر سلول‌ها پی برده‌اند. بنابراین نتیجه حاصل شده از این قرار است که وجود شبکه سیگنالینگ در باکتری‌ها، یک جنبه پیچیده و ضروری در زندگی آنها است (۲).

مطالعه ارتباطات سلول به سلول و اثرات آن روی رونویسی ارگانیسم‌های تک‌سلولی کاربردهای عملی متنوعی دارد. یکی از آنها امکان تداخل با سیستم‌های ارتباطی بین سلولی در میکروبی‌های پاتوژن است. QS راهی برای سیگنال‌دهی بین سلول‌های باکتریایی است و یک تبادل اطلاعات بین دو شریک است، یعنی فرستنده و گیرنده یک مولکول ارتباطی، از فرآیند سود می‌برند (۳). QS در باکتری‌ها

محیط آگار خون دار، محیط EMB، محیط مولر هینتون آگار کشت داده شده و از نظر مورفولوژیک و بیوشیمیایی بررسی شدند.

تایید هویت ایزوله‌ها

به‌منظور تایید کلنی‌ها از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نظیر رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سیترات، TSI، اندول، متیل رد و ووگس پروسکوئر (MR-VP)، اوره‌آز، تست OF (اکسیداسیون-تخمیر)، رشد در ۴۲ درجه سلسیوس و تولید پیگمان در محیط ستریمید آگار استفاده شد و بر اساس کلید شناسایی Bergey، تمام ایزوله‌ها به‌عنوان *سودوموناس آئروژینوز* تایید شدند (۸).

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی ایزوله‌ها با استفاده از کیت GTP (پیشگامان انتقال ژن-ایران) انجام گرفت. به این منظور از یک تا دو میلی‌لیتر باکتری کشت داده شده در محیط کشت EMB که به غلظت نیم مک‌فارلند رسیده بود استفاده شد و مراحل استخراج مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. استوک‌های DNA استخراج شده، در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری (فلورومتر مدل E6150) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شد.

واکنش PCR به‌منظور بررسی حضور ژن‌های *lasR* و *rpoD*

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۳ میکرولیتر DNA الگو (۲۰۰ نانوگرم)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (۱ میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر مستر میکس Amplicon 2x انجام شد. شرایط دمایی PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل با مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در پایان قطعات تکثیر یافته با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad-USA انجام گرفت.

فوتوتیپ‌هایی را تنظیم می‌کند که شامل بیولومینسانس، تولید آگزوپلی‌ساکاریدها، ویرولانس، انتقال پلاسمید کنژوگه، تولید آنتی‌بیوتیک و آگزوانزیم، تشکیل بیوفیلم و ممانعت از رشد است. انواع مولکول‌های ارتباطی شامل آسپیل هموسرین لاکتون (AHL)، مولکول‌های خودالقاکننده نوع دو (AI2) و الیگوپپتیدهای تغییر یافته است (۴).

سودوموناس آئروژینوز یک پاتوزن انسانی فرصت طلب و گرم‌منفی است. این باکتری سبب عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت‌های بافت‌های نرم، باکتری، عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معده و روده‌ها و عفونت‌های سیستمیک گوناگون به‌ویژه در بیماران با سوختگی‌های شدید و بیماران مبتلا به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده است، می‌شود (۵). در *سودوموناس آئروژینوز* نشان داده شده است که اختلال در سیستم QS آن، بیماری‌زایی را از بین می‌برد.

از آنجا که گیاهان و قارچ‌ها طی میلیون‌ها سال، از زندگی همزیستی با باکتری‌ها برخوردار بوده‌اند، احتمالاً طی تکامل، مکانیسم‌ها و مواد مختلفی به‌منظور مهار کروم سنسینگ، در آنها ایجاد شده است (۶). سیر یکی از قدیمی‌ترین گیاهانی است که از دیرباز اثرات دارویی آن گزارش داده شد. اثر ضد باکتری سیر به دلیل مواد مختلفی مانند آلتین، اهوئین، آلیسین و آلیستائین است و به همین دلیل بر ضد باکتری‌های گرم‌مثبت و نیز باکتری‌های گرم منفی، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها به کار می‌رود (۷).

از آنجایی که سال‌های زیادی است که از گیاهان دارویی استفاده می‌شود و با توجه به اهمیت *سودوموناس آئروژینوز* و نیز خواص سیر، در پژوهش حاضر تلاش خواهد شد تا تأثیر عصاره سیر بر روی کروم سنسینگ باکتری مذکور بررسی شود تا در صورت مشاهده مهار ارتباط سلولی، از این عصاره در درمان استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

به‌منظور انجام این مطالعه توصیفی-تحلیلی (Cross-Sectional)، تعداد ۱۲ نمونه *سودوموناس* از نمونه‌های زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان جمع‌آوری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها روی

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی	طول قطعه	رفرنس
lasI-F	GCTTCTGCACGGCAAGGA	۶۳ bp	(۹)
lasI-R	ATGGCGAAACGGCTGAGTT		
rpoD-F	GGGCTGTCTCGAATACGTTGA		

نام پرایمر	توالی	طول قطعه	رفرنس
rpoD-R	ACCTGCCGGAGGATATTTCC	۹۰ bp	
lasR-F	AAGGAAGTGTTCAGTGGTG	۶۸ bp	
lasR-R	GAGCAGTTGCAGATAACCGA		

عصاره‌گیری از سیر

بود، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در تمام چاهک‌ها ریخته شد. برای تعیین MIC آنتی‌بیوتیک توبرامایسین رقت سازی از ۳۲ $\mu\text{g/ml}$ شروع شد. در تمام چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون ریخته و سپس از استوک آنتی‌بیوتیک به چاهک اول اضافه و در چاهک‌های بعدی پیتاژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک‌فارلند به همه چاهک‌ها اضافه شد. همچنین از دو ردیف چاهک به‌عنوان کنترل مثبت (محیط و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی تست (محیط + عصاره سیر/ آنتی‌بیوتیک) استفاده شد. میکروپلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از گذشت مدت زمان طی شده، اولین خانه ای که در آن رشد دیده شد به‌عنوان حداقل غلظت مهارتی رشد در نظر گرفته شد (۱۰، ۱۱).

استخراج RNA

به‌منظور بررسی بیان ژن *lasI* با استفاده از ژن مرجع *rpoD* (به‌عنوان یک Housekeeping gene که دارای بیان دائمی و پایدار در سویه‌های باکتریایی داشته و کدکننده فاکتور سیگما در آنزیم RNA-پلیمراز است (۱۲))، ابتدا از سودوموناس‌های تیمار شده با عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک توبرامایسین بر طبق MIC و همچنین از سودوموناس‌های تیمار نشده، استخراج RNA با استفاده از کیت سیناژن-ایران (PR891620) صورت گرفت. برای بررسی کمی RNA استخراج شده از دستگاه فلورومتر مدل E6150 و کیت promega استفاده شد.

سنتز cDNA

مقدار ۱ μg از RNA به ترتیب با ۱ μL بافر آنزیم، ۱ μL آنزیم DNase و ۵ μL RNase inhibitor مخلوط و سپس با آب عاری از RNase به حجم ۱۰ μL رسانده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس ۱ μL از ۰.۵M EDTA به هر یک اضافه شد. انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به‌منظور غیرفعال شدن آنزیم DNase انجام شد. ۵ μL از ۰.۵ Random hexamer و ۵ μL از ۰.۵ Oligo dT به

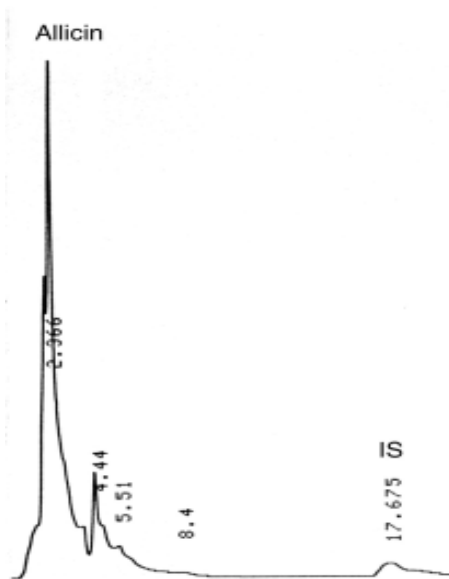
پس از جداسازی پوست از حبه‌های سیر، ۱۲۵ گرم سیر با استفاده از مخلوط کن خردشده و سپس با ۲ لیتر فرمالین ۷۰ درصد مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت روی روتاتور، شیک شد. مخلوط حاصل از تنطیف استریل و صافی واتمن عبور داده شد و ماده حاصله در سانتریفیوژ یخچال‌دار و با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بدین ترتیب سایر مواد زاید و ناخواسته از جمله مواد سلولزی، پوسته‌های سلولی، از عصاره حذف گردید و محلولی شفاف و زرد رنگ به‌دست آمد که به‌منظور تغلیظ شدن، تقطیر شده و برای استفاده‌های بعدی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

آزمون HPLC

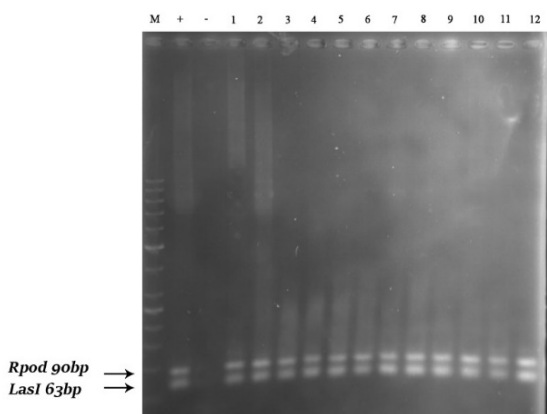
در این تحقیق از تخلیص به روش HPLC به هدف خالص‌سازی ترکیبات موجود در فراکشن ایمونومدولاتور سیر و ایجاد سیستم مناسب جهت تولید بیشتر ماده ایمونومدولاتور در زمان کوتاه تر جهت کارآزمایی‌های بالینی و بررسی‌های فارماکولوژیکی استفاده شد. فراکشن جمع آوری شده از فیلتراسیون به کمک کروماتوگرافی فاز معکوس HPLC روی ستون سمی-پاراتیو TPV10 208 Vydac (1*25 cm) که یک ستون فاز معکوس C8 است، از یکدیگر جدا شدند. خالص‌سازی با کمک محلول ۰/۱ درصد TFA در آب و محلول ۰/۰۹ درصد TFA در استونیتریل و با سرعت جریان ۱ mL/min از صفر درصد محلول TFA تا ۱۵ درصد به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. شدت جذب در طول موج‌های ۲۱۵، ۲۵۴ و ۲۸۰ نانومتر بررسی شد.

تعیین MIC با روش برات دایلوشن

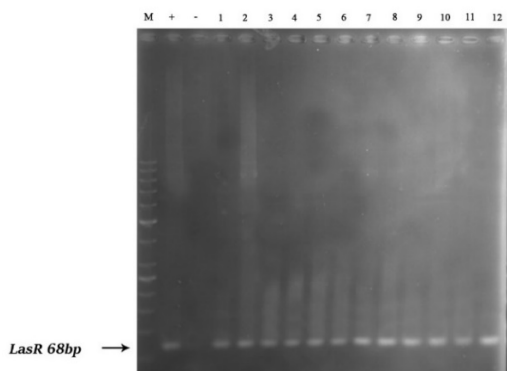
با استفاده از روش استاندارد پیشنهادی توسط کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI)، حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) برای هر یک از باکتری‌های در تماس با عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک توبرامایسین بدست آورده شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۲ ردیف که هر کدام حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات استریل بود، استفاده گردید. سپس برای تعیین MIC عصاره سیر رقت سازی از ۲۰۴۸ $\mu\text{g/ml}$ شروع شد. ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک اول اضافه و سپس در چاهک‌های پایین پیتاژ شد و غلظت، چاهک به چاهک پایین آمد. سپس از سوسپانسیون باکتری که به غلظت ۰/۵ مک‌فارلند رسیده



شکل ۱. کروماتوگرام HPLC مربوط به آلیسین و استاندارد داخلی (IS)



شکل ۲. نتیجه آزمایش PCR برای ژن‌های *lasI* و *rpoD* بر روی تعدادی از سویه‌ها، به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ bp DNA plus marker، + کنترل مثبت، - کنترل منفی، نمونه‌ها.



شکل ۳. نتیجه آزمایش PCR برای ژن *lasR* بر روی تعدادی از سویه‌ها، به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ bp DNA plus marker، + کنترل مثبت، - کنترل منفی، نمونه‌ها.

میکروتیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، میکروتیوب‌ها به روی یخ منتقل شده و به هر کدام ۱۳ μL از این مخلوط مسترمیکس اضافه شد. میکروتیوب‌ها ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سلسیوس و ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. cDNA تک‌رشته‌ای حاصل، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. مسترمیکس مورد استفاده حاوی ۱ μL از dNTP، ۴ μL از RT buffer، ۲ μL از RT enzyme، ۰/۵ μL از RNase inhibitor و ۵/۵ μL از آب عاری از Rnase بود.

واکنش Real Time PCR

همانطور انجام واکنش Real time PCR، مقادیر ۱۰ μL از مسترمیکس PCR، ۱ μL از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس (جدول ۱)، ۱/۵ μL از cDNA سنتز شده و ۵/۶ μL آب در میکروتیوب مخلوط شدند. نمونه‌ها در دستگاه با برنامه دمایی شامل ۱۰ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱۵ ثانیه دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۲۵ ثانیه دمای ۵۵ درجه سلسیوس و ۳۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، قرار داده شدند.

آنالیز داده‌های Real-Time

داده‌های Real Time PCR به کمک نرم‌افزار موجود در دستگاه one ABI plus به روش $-\Delta\Delta\text{C}_T$ آنالیز شد و عدد نهایی ($2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$) حاصل از تکرارهای مختلف به کمک نرم افزار genEX تجزیه و تحلیل آماری شدند.

یافته‌ها

آزمون HPLC

ارزیابی عصاره تهیه شده از سیر با استفاده از روش HPLC و بررسی کروماتوگرام حاصل، نشان دهنده آن بود که بیشترین ترکیب موجود در عصاره، آلیسین است. این بررسی با مقایسه با استاندارد داخلی صورت گرفت (شکل ۱).

تعیین MIC: پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت از زمان انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس میزان sub MIC برای عصاره سیر ۱۶ $\mu\text{g}/\text{mL}$ و برای آنتی‌بیوتیک تویرامایسین ۱۶ $\mu\text{g}/\text{mL}$ تعیین شد.

بررسی حضور ژن‌های *lasI* و *lasR* و *rpoD* نتایج آنالیز مولکولی PCR برای ژن‌های کروموسنسینگ *lasI* و *lasR* و *rpoD* بر اساس مشاهده باند در ناحیه مذکور بر روی ژل آگاروز ۱٪ بود. در مطالعه حاضر از مجموع تعداد ۱۲ نمونه سودوموناس آئروژینوز/ جدا شده از نمونه‌های بالینی، تعداد ۱۲ عدد (۱۰۰٪) واجد ژن‌های مذکور بودند (شکل ۲ و ۳).

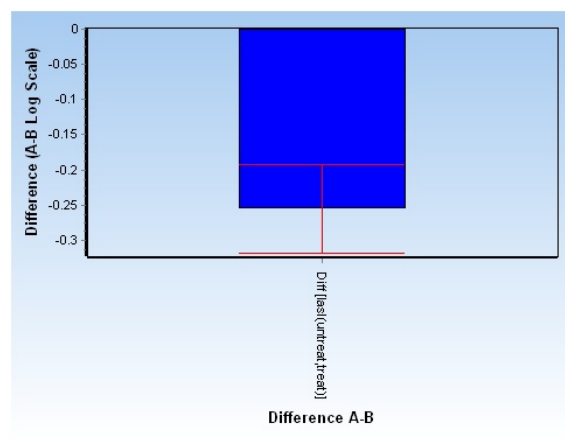
بحث

گسترش آلودگی‌های باکتریایی و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آنها، موجب شده تا تلاش برای یافتن ترکیبات ضدباکتریایی طبیعی، موضوعی جذاب برای پژوهشگران باشد. این مطالعات اغلب روی ترکیبات گیاهی مختلف، عصاره‌های آنها و ترکیبات موثره موجود در آنها صورت می‌گیرد (۱۳). در تحقیق حاضر تلاش شد تا اثر عصاره سیر بر روی باکتری سودوموناس *آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گیرد. این بررسی از طریق ارزیابی اثر عصاره سیر بر میزان بیان ژن‌های موثر بر کروم سنسینگ باکتری و مقایسه آن با اثر آنتی‌بیوتیک توبرامایسین صورت گرفت.

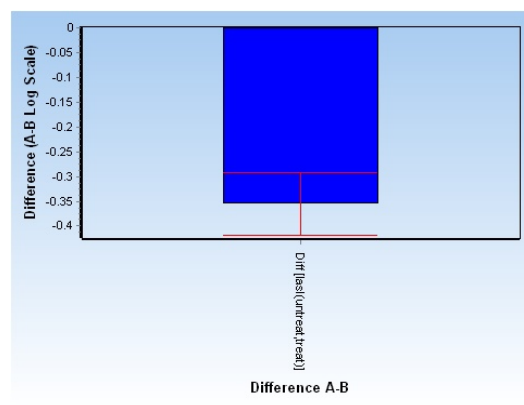
از ترکیبات سیر، آلتین، آلیسین، اسیدهای آلی، کربوهیدرات و ویتامین‌ها را می‌توان نام برد که مهم‌ترین خواص سیر مربوط به آلیسین است (۱۴). آلیسین یک ترکیب روغنی با رنگ زرد روشن است که عطر خاص سیر را به وجود می‌آورد. به آلیسین روغن سیر هم گفته می‌شود که خواص ضد میکروبی سیر مربوط به همین ترکیب است. این ترکیب بخش عمده‌ای از خواص آنتی‌بیوتیکی خود را از طریق مهار اختصاصی آنزیم استیل کولین A سنتتاز، ایفا می‌کند؛ به طوری که با مهار این آنزیم، موجب مهار بیوسنتز لیپید و اسیدهای چرب شده و در نهایت باعث اختلال در قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها می‌شود (۱۵). یکی از خصوصیات مهم آلیسین قابلیت نفوذپذیری و عبور از فسفولیپیدهای غشا است که به همین دلیل می‌تواند آزادانه از غشا عبور کرده و وظایف خود را انجام دهد (۱۶). در بررسی عصاره سیر به دست آمده در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک HPLC، ماده اصلی موجود در عصاره، آلیسین بود. بنابراین انتظار می‌رفت که اثرات ضد میکروبی آن بر روی سودوموناس *آئروژینوزا* مشاهده گردد. اما هدف اصلی ارزیابی مکانیسم این اثر ضد میکروبی و بررسی بیان ژن‌های مرتبط با کروم سنسینگ و تشکیل بیوفیلم در حضور عصاره بود.

ژن‌های *lasI* و *lasR* ژن‌هایی هستند که در ساختمان ژنوم اکثر باکتری‌های سودوموناس *آئروژینوزا* بیماری‌زای ایزوله شده از مراکز درمانی به طور ذاتی وجود داشته و باعث ایجاد کروم سنسینگ، بیوفیلم و مقاومت دارویی در این سویه‌ها می‌شوند. در باکتری سودوموناس *آئروژینوزا*، سیستم QS از دو سیستم ژنی *LasR-LasI* و *RhlR-RhlI* تشکیل شده است، ژن‌های *LasI* و *RhlI* بیان‌کننده دو آنزیم acyl-homoserine lactone (acyl-HSL) سنتتاز هستند، در حالی که ژن‌های *LasR* و *RhlR* تولیدکننده پروتئین‌های تنظیم کننده رونویسی هستند که با

بررسی بیان ژن: برای تعیین میزان سرکوب بیان ژن در حضور عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک توبرامایسین به صورت کمی، از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. واکنش Real Time PCR برای ژن *lasI* و با استفاده از ژن مرجع *rpoD* انجام شد. نتایج این واکنش در شکل‌های ۴ (در حضور عصاره سیر) و ۵ (در حضور آنتی‌بیوتیک توبرامایسین) نشان داده شده است. نتایج بیانگر معنادار بودن اختلاف بیان ژن *lasI* در بین دو گروه تیمار شده با عصاره سیر و تیمار نشده است. میزان Fold Change برای ژن *lasI* برابر ۱/۱۹- محاسبه شد که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده با عصاره سیر نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۱۹ برابر کاهش یافته است. بیان ژن *lasI* در گروه تیمار شده با توبرامایسین نیز به طور معناداری کاهش پیدا کرده بود. میزان Fold Change برای ژن *lasI* برابر ۱/۲۷- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده با توبرامایسین نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۲۷ برابر کاهش یافته است. میان اثر عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک توبرامایسین از نظر توانایی آنها در کاهش بیان *lasI* تفاوت معناداری مشاهده نشد.



شکل ۴. نمودار $\Delta\Delta C_T$ در حضور عصاره سیر



شکل ۵. نمودار تغییرات $\Delta\Delta C_T$ در حضور آنتی‌بیوتیک توبرامایسین

NPO برای ژن‌های ویروانس کنترل کننده کروم سنسینگ در سودوموناس آئروژینوز اختصاصیت دارند. همچنین این دو مهارکننده کروم سنسینگ مقاومت بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوز را نسبت به توبرامایسین به‌طور قابل توجهی کاهش دادند (۲۲). فعالیت مهار کروم سنسینگ توسط عصاره سیر بررسی شد و کاهش پاسخ به کروم سنسینگ در گیرنده‌های کروم سنسینگ اش‌ریشیا کلی، آگروباکتریوم تومفاسینس، کروموباکتریوم ویولاسوم، سودوموناس پوتیدا و سودوموناس کلرورافیس در ارتباط با اثرات مهارکننده رشد، مشاهده شده است (۲۳). همچنین مهار کروم سنسینگ و تضعیف بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوز تحت تاثیر سیر بررسی و نشان داده شده است که درمان خوراکی با سیر مقدار باکتری‌های ریوی را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. آزمایشات *in vitro* نیز نشان داد که فاکتورهای ویروانس و تولید سیگنال‌های کروم سنسینگ باکتری سودوموناس آئروژینوز در حضور عصاره سیر تازه کاهش پیدا می‌کند (۲۴).

Bjarnsholt و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که عصاره سیر کروم سنسینگ را متوقف کرده و حذف عفونت ریوی سودوموناس آئروژینوز را سرعت می‌بخشد. آنها از عصاره سیر برای درمان عفونت ریوی موش استفاده کرده و نشان دادند که درمان با سیر ابتدا درجات التهاب بالاتری را تحریک می‌کند و سپس به‌طور قابل توجهی باکتری‌های عفونی را حذف می‌کند (۲۰).

Harjai و همکاران در سال ۲۰۱۰ مهار کروم سنسینگ و تضعیف بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوز را تحت تاثیر سیر بررسی کردند. آنها از سیر به‌عنوان یک عامل پروفیلاکتیک *in vivo* در مدل موشی استفاده کردند. درمان خوراکی با سیر مقدار باکتری‌های ریوی را به‌طور قابل توجهی کاهش داد. آزمایشات *in vitro* نیز نشان داد که فاکتورهای ویروانس و تولید سیگنال‌های کروم سنسینگ باکتری سودوموناس آئروژینوز در حضور عصاره سیر تازه کاهش پیدا می‌کند (۲۴).

Annapoorani و همکاران در سال ۲۰۱۲، با مطالعه بر روی مهارکننده‌های گیرنده پروتئین‌های *lasR* و *rhlR* سودوموناس آئروژینوز نشان دادند که پنج ترکیب شناسایی شده chlorogenic acid, mangiferin, rosmarinic acid, naringin, amarin و گیاهان دارویی طبیعی وجود دارند دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد کروم سنسینگ روی سویه‌های سودوموناس آئروژینوز هستند. به‌طوری‌که در میان پنج ترکیبی که مورد مطالعه قرار گرفت، به جز mangiferin، چهار ترکیب دیگر بازدارندگی خوبی در تولید پروتاز،

اتصال به سیگنال اختصاصی خود سبب فعال‌سازی ژن‌های هدف (بیماری‌زا) می‌شوند (۱۷). سیستم QS در دیگر گونه‌های سودوموناس نیز وجود دارد، اما تعداد و توالی ژن‌های تشکیل‌دهنده آنها متفاوت است. ژن‌های زیادی در سودوموناس آئروژینوز توسط کروم سنسینگ کنترل و بیان می‌شوند که در بیماری‌زایی نیز نقش دارند؛ در اینباره می‌توان به ژن‌های *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* و ژن‌های کنترل‌شده‌ای به نام‌های *apr*, *lasB* و *rhlAB* در ایزوله‌های بالینی اشاره کرد (۱۸).

نشان داده شده است که ترکیبات گیاهی از راه‌های مختلفی می‌توانند بیوفیلیم را مهار کنند، گیاهانی که عصاره آنها برای باکتری‌ها خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارد باعث مهار یا کاهش تشکیل بیوفیلیم باکتریایی می‌شوند. اما برخی از ترکیبات گیاهی بدون کشتن یا مهار رشد باکتری روی بیوفیلیم تأثیر می‌گذارند. مزیت این ترکیبات این است که باکتری‌ها به آنها مقاوم نمی‌شوند. به‌عنوان مثال برخی از ترکیبات گیاهی با سیستم کروم سنسینگ که بیوفیلیم باکتریایی را کنترل می‌کند، تداخل ایجاد می‌کنند (۱۹).

عصاره سیر کروم سنسینگ را متوقف کرده و حذف عفونت ریوی سودوموناس آئروژینوز را سرعت می‌بخشد. عصاره سیر برای درمان عفونت ریوی موش استفاده شد و نشان داده شد که درمان با سیر ابتدا درجات التهاب بالاتری را تحریک می‌کند و به‌طور قابل توجهی باکتری‌های عفونی را حذف می‌کند (۲۰). Fulghesu و همکاران (۲۰۰۷) ترکیبات مختلف مهارکننده کروم سنسینگ سودوموناس آئروژینوز را مورد بررسی قرار دادند. آنها فعالیت مهاری سه داروی ماکرولید و سه داروی لینکوزامید، رسوراتول، عصاره سیر و N-استیل‌سیستئین را بر روی چهار سویه سودوموناس آئروژینوز که از بیماران فیبروز کیستی جدا شده بودند، بررسی کردند. تمام ترکیبات مورد آزمایش توانستند کروم سنسینگ را در سویه‌های مورد آزمایش مهار کنند، تنها لینکومایسین و N-استیل‌سیستئین روی یکی از سویه‌های سودوموناس اثر مهار کروم سنسینگ نداشتند (۲۱).

در مطالعه دیگری، مهار کروم سنسینگ با استفاده از یک سیستم ژنتیکی جدید بررسی شد. مجموعه‌ای از سیستم‌های غربالگری مهارکننده کروم سنسینگ ایجاد شدند که آنها را قادر می‌کرد تعدادی از مهارکننده‌های جدید طبیعی و سنتتیک را شناسایی کنند. دو مهارکننده فعال که در این مطالعه مشخص شدند، عصاره سیر و ۴-نیترو پیریمیدین‌ان‌اکسید (4-NPO) بودند. آنالیز ترانسکریپتوم بر اساس آرایه ژنی نشان داد که عصاره سیر 4-

نگرفته است. در مطالعه حاضر میزان بیان ژن *lasI* به عنوان یکی از ژن های مهم در کروم سنسینگ باکتری، به وسیله تکنیک Real time PCR بررسی شد و مشاهده گردید که در غلظت حدود ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر عصاره سیر یعنی غلظت پایین MIC اثر داشته و بیان ژن *lasI* را کاهش می دهد. همچنین به منظور مقایسه اثر کاهشی عصاره سیر بر بیان این ژن ها و اثر آنتی بیوتیک توبرامایسین، بیان ژن *lasI* در حضور این آنتی بیوتیک نیز بررسی شد که کاهش بیشتری را نسبت به عصاره سیر نشان داد اما این تفاوت به میزان زیادی نبود. بنابراین نتایج حاصل نویدبخش این است که می توان مواد موثره سیر را جداسازی نمود و به عنوان درمان کمکی آنتی بیوتیکی و یا به صورت درمان مستقل در عفونت ها مورد مصرف قرار داد. این ماده موثره در تحقیق حاضر آلیسین تشخیص داده شد که امید می رود در تحقیقات آینده با استخراج و خالص سازی آن و با انجام تحقیقات بیشتر، از آلیسین به عنوان ماده ضد کروم سنسینگ و در نتیجه ضد باکتریایی برای درمان عفونت های سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردد.

تعارض در منافع

میان نویسندگان هیچ گونه تعارضی در منافع گزارش نشد.

الاستاز و همولیزین نشان دادند. علاوه بر این، تمام پنج ترکیب به طور بالقوه رفتارهای مرتبط با بیوفیلم را در سودوموناس آئروژینوزا مهار کردند. فعالیت وابسته به دوز ترکیبات انتخاب شده روی رشد و فعالیت ضد کروم سنسینگ در غلظت های مختلف مشاهده شد. در بررسی میزان الاستاز *LasB*، به جز *mangiferin*، بقیه ترکیبات کاهش قابل توجهی در تولید الاستاز *lasB* داشتند (۲۵).

O'Loughlin و همکاران در سال ۲۰۱۳، طی مطالعه مهارکنندگی کروم سنسینگ و تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که ترکیباتی مثل meta-bromo-thiolactone، توانایی جلوگیری از تولید دو عامل بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا یعنی پیوسیانین و بیوفیلم دارد و همچنین این مواد از تولید *LasR* و *RhlR* هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در *in vivo* جلوگیری می کنند (۱۰).

نتیجه گیری

با توجه به آنچه که بیان شد، اثر عصاره سیر بر کروم سنسینگ در سودوموناس آئروژینوزا بارها اثبات شده است اما هیچ یک از تحقیقاتی که به آنها اشاره شد، مکانیسم این اثر را بیان نکرده و بیان ژن های کروم سنسینگ را مورد بررسی قرار نداده اند. از سوی دیگر ارتباط میان بیان ژن *lasI* به عنوان یک ژن مهم در پدیده کروم سنسینگ، در تشکیل بیوفیلم نیز به خوبی بررسی شده است اما اثر عصاره سیر بر بیان این ژن مورد مطالعه قرار

Referance

1. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319-46. [DOI:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001] [PMID]
2. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology.* 2016;14(9):576. [DOI:10.1038/nrmicro.2016.89] [PMID] [PMCID]
3. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current opinion in microbiology.* 2014;18:96-104. [DOI:10.1016/j.mib.2014.02.008] [PMID]
4. Trappetti C, Oggioni MR. Biofilm Formation Under In Vitro Conditions. *Streptococcus Pneumoniae: Elsevier;* 2015. p. 245-55. [DOI:10.1016/B978-0-12-410530-0.00013-2]
5. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates.* 2015;21:41-59. [DOI:10.1016/j.drug.2015.08.002] [PMID]
6. Brackman G, Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current pharmaceutical design.* 2015;21(1):5-11. [DOI:10.2174/1381612820666140905114627] [PMID]
7. Truchado P, Larrosa M, Castro-Ibáñez I, Allende A. Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors. *Trends in Food Science & Technology.* 2015;43(2):189-204. [DOI:10.1016/j.tifs.2015.02.009]
8. Bergey DH, Hendricks D, Holt JG, Sneath PH. *Bergey's Manual of systematic bacteriology.* Vol. 2: Williams & Wilkins; 1984.
9. Bratu S, Gupta J, Quale J. Expression of the *las* and *rhl* quorum-sensing systems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* does not correlate with efflux pump expression or antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*

- 2006;58(6):1250-3. [[DOI:10.1093/jac/dkl407](https://doi.org/10.1093/jac/dkl407)] [[PMID](#)]
10. O'Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack MF, Bassler BL. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(44):17981-6. [[DOI:10.1073/pnas.1316981110](https://doi.org/10.1073/pnas.1316981110)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
 11. Zhou Y, Kong Y, Kundu S, Cirillo JD, Liang H. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *Journal of nanobiotechnology*. 2012;10(1):19. [[DOI:10.1186/1477-3155-10-19](https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-19)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
 12. Narusaka M, Shiraiishi T, Iwabuchi M, Narusaka Y. rpoD gene expression as an indicator of bacterial pathogens in host plants. *Journal of General Plant Pathology*. 2011;77(2):75-80. [[DOI:10.1007/s10327-011-0298-x](https://doi.org/10.1007/s10327-011-0298-x)]
 13. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(5):371-87. [[DOI:10.1038/nrd3975](https://doi.org/10.1038/nrd3975)] [[PMID](#)]
 14. Reiter J, Hübbers AM, Albrecht F, Leichert LIO, Slusarenko AJ. Allicin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 2020;310(1):151359. [[DOI:10.1016/j.ijmm.2019.151359](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151359)] [[PMID](#)]
 15. Dwivedi VP, Bhattacharya D, Singh M, Bhaskar A, Kumar S, Fatima S, et al. Allicin enhances antimicrobial activity of macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of ethnopharmacology*. 2019;243:111634. [[DOI:10.1016/j.jep.2018.12.008](https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.008)] [[PMID](#)]
 16. Choo S, Chin VK, Wong EH, Madhavan P, Tay ST, Yong PVC, et al. antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications. *Folia Microbiologica*. 2020:1-15. [[DOI:10.1007/s12223-020-00786-5](https://doi.org/10.1007/s12223-020-00786-5)] [[PMID](#)]
 17. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology*. 2003;185(7):2066-79. [[DOI:10.1128/JB.185.7.2066-2079.2003](https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2066-2079.2003)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
 18. Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *Journal of bacteriology*. 2002;184(4):1132-9. [[DOI:10.1128/jb.184.4.1132-1139.2002](https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1132-1139.2002)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
 19. Bazargani MM, Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food control*. 2016;61:156-64. [[DOI:10.1016/j.foodcont.2015.09.036](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036)]
 20. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*. 2005;151(12):3873-80. [[DOI:10.1099/mic.0.27955-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.27955-0)] [[PMID](#)]
 21. Fulghesu L, Giallorenzo C, Savoia D. Evaluation of different compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of chemotherapy*. 2007;19(4):388-90. [[DOI:10.1179/joc.2007.19.4.388](https://doi.org/10.1179/joc.2007.19.4.388)] [[PMID](#)]
 22. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kôte M, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of bacteriology*. 2005;187(5):1799-814. [[DOI:10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
 23. Bodini S, Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Letters in applied microbiology*. 2009;49(5):551-5. [[DOI:10.1111/j.1472-765X.2009.02704.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02704.x)] [[PMID](#)]
 24. Harjai K, Kumar R, Singh S. Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2010;58(2):161-8. [[DOI:10.1111/j.1574-695X.2009.00614.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00614.x)] [[PMID](#)]
 25. Annapoorani A, Umamageswaran V, Parameswari R, Pandian SK, Ravi AV. Computational discovery of putative quorum sensing inhibitors against LasR and RhlR receptor proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of computer-aided molecular design*. 2012;26(9):1067-77. [[DOI:10.1007/s10822-012-9599-1](https://doi.org/10.1007/s10822-012-9599-1)] [[PMID](#)]