معرفی یک ساختمان شیمیایی مهارکننده مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه به نیتروفورانتویین

احمدرضا شاهوردی[1*]، فرامرز توسلی[2]

۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- پزشک، محقق، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی‌دارویی، کدپستی ۱٤۱۷٤ ، تلفن: ٦۱۱۲۳۳۳، نمابر: ٦٤٦۱۱۷۸
پست الکترونیک: Shahverdiar@yahoo.com

چکیده

طی این مطالعه مونوترپن پی‌پریتون به عنوان ماده موثر موجود در ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* شناسایی شد که قادر است مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه را نسبت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین مهار نماید. در حضور ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از این مونوترپن MIC تمامی سویه‌های مورد آزمایش تقریباً ۸ برابر کاهش می‌یابد. همچنین اضافه کردن این مونوترپن در طی آزمایش ایجاد جهش با اتیل متان سولفونات از بروز سویه‌های مقاوم به نیتروفورانتویین جلوگیری می‌کند.

گل‌واژگان: نیتروفورانتویین، پی‌پریتون،مقاومت میکروبی، انتروباکتریاسه

مقدمه

گسترش روزافزون مقاومت میکروبی که در اثر مصرف نابجا و ناکافی آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌گردد مشکلات فراوانی را در درمان بیماری‌های عفونی به وجود آورده است. مقاومت میکروبی به صورت اکتسابی یا ذاتی القا می‌گردد. مطالعات اخیر نشان داده است که برخی از ترکیبات شیمیایی قادر هستند به صورت اختصاصی مقاومت باکتری‌ها را به برخی از آنتی بیوتیک‌ها از بین ببرند. از جمله مهمترین این ترکیبات که امروزه در درمان کاربرد دارد اسید کلوولانیک (clavulanic acid) است که باعث کاهش مقاومت باکتری‌های مولد پنی‌سیلیناز به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین می‌گردد و مصرف توام آن با آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین مانند آموکسی‌سیلین جهت درمان عفونت‌های مقاوم به پنی‌سیلین به کارمی‌رود [۱]. از دیگر مواد شیمیایی کشف شده ۷ – هیدروکسی تروپولون است که با مهار آنزیم استیل‌ترانسفراز مقاومت باکتری‌های گرم منفی به آنتی‌بیوتیک‌های گروه آمینوگلیکوزید را به طورچشمگیری کاهش می‌دهد [۲]. دریک مطالعه دیگر حدود ۱۶۰ هزار ماده شیمیایی برای دستیابی به مهارکننده‌های اریترومایسین متیل‌ترانسفراز مورد جستجو قرار گرفتند که نتیجه این مطالعات منجر به معرفی ۹ ترکیب شیمیایی شد که این ترکیبات قادر هستند مقاومت سویه‌های مقاوم استافیلوکوک ارئوس را به ماکرولیدها کاهش دهند [۳]. مطالعاتی نیز در مورد مهارکنندگان efflux pumps که یک مکانیسم عمومی‌مقاومت میکروبی است صورت گرفته است که منجر به معرفی مشتقاتی با ساختمان شیمیایی dimethyl-hydroxypropyl-trimethyllindan گردیده است [٤]. این ترکیبات می‌توانند به طورهمزمان مقاومت باکتری‌ها را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند تتراسیکلین، کلرامفنیکل و یا آنتی‌بیوتیک‌های گروه فلوروکینولون‌ها کاهش دهند.

اخیراً نشان داده‌ایم که ترکیبات فرار گیاه *Mentha longifolia* جمع‌آوری شده از نواحی اطراف اردبیل می‌تواند مقاومت باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه را نسبت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتویین از بین ببرد [٥، ٦]. در مطالعه حاضر ماده موثر موجود در روغن فرارگیاه *M. longifolia*که قادر است مقاومت به نیتروفورانتویین را در باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه مهار نماید جداسازی و شناسایی شده است. این ترکیب یک مونوترپن شناخته شده است که به عنوان اولین ترکیب شیمیایی موثر در این رابطه معرفی می‌شود.

مواد و روش‌ها

روش استخراج

در اواخر تابستان گیاه مورد تحقیق از ارتفاعات۳۱۰۰ متری اطراف شهر اردبیل بین گردنه نمین و حیران جمع‌آوری و در آزمایشگاه فارماکوگنوزی مرکز پژوهش‌های گیاهان دارویی و آب‌های معدنی آذربایجان خشک شد و به طور مرسوم به روش تقطیر با بخار آب با دستگاه کلونجر اسانس‌گیری گردید.

روش شناسایی ماده موثره اسانس گیاه *M. longilfolia*

برای شناسایی ماده موثره اسانس گیاه *M. longifolia* از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده گردید که فاز ثابت آن سیلیکاژل 60 F_{254} بود که به قطر ۱/۵ میلی‌متر روی شیشه لایه گذاری می‌گردد. بعد از لکه گذاری بصورت خطی از حلال تولوئن – اتیل استات به نسبت ۹۳ به ۷ حجمی/ حجمی جهت انجام کروماتوگرافی استفاده گردید [۷]. رنگ‌آمیزی قسمتی از پلیت کروماتوگرافی در حالی که قسمت دیگر آن پوشیده شده است با استفاده از معرف وانیلین در اسید سولفوریک صورت می‌پذیرد. بعد از ظهور قسمت غیر پوشیده در درجه حرارت

۱۱۰ درجه سانتی‌گراد باندهایی ظاهر و آنگاه با توجه به باندهای ظاهر شده نوارهای سیلیکاژل مجاور این باندهای رنگی با اسپاتول تراشیده می‌شوند و توسط اتانل ۹۰ درصد استخراج می‌گردند. بعد از تغلیظ این نمونه‌ها از آنها دیسک تهیه گردید. در مرحله بعد روی محیط‌های مولرهینتون واجد ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیتروفورانتوین و بدون نیتروفورانتوین سویه انتروباکتر کلاسه مقاوم به نیتروفورانتوین کشت داده می‌شود. دیسک‌های تهیه شده از برش‌های کروماتوگرافی روی پلیت‌های فوق‌الذکر قرار داده شده و نتیجه آزمایش بعد از یک شب گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی می‌گردد [٦].

تجربه و شناسایی ترکیبات فرار گیاه *M . longifolia* با استفاده از گاز کروماتوگرافی و دستگاه طیف سنجی جرمی

دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Termoquest2000 متصل به طیف سنج جرمیTermoquest2000Fingandmatt متصل شده به تله Quarter pole و با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت مورد استفاده قرار گرفت. ستون مورد استفاده دستگاه گاز کروماتوگرافی ستون DB-1 بود که یک ستون غیرقطبی/ قطبی است. ستون استفاده شده به طول ۳۰ متر، به قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۱ میکرون بود. حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم دقیقه اعمال و سپس حرارت با سرعت ۲/۵ درجه در دقیقه تا ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. حرارت محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ترانسفرلاین ۲٦۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. شناسایی ترکیب‌ها با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه Wiley در کامپیوتر GC/MS صورت گرفت. همچنین در شناسایی ترکیب‌ها از شاخص‌های بازداری آنها در GC که با تزریق هیدروکربورهای نرمال (C7-C35) تحت شرایط یکسان با تزریق نمونه اسانس کمک گرفته شد.

بررسی تغییرات حداقل دوز مهارکننده رشد (MIC) باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه در حضور مقادیر مختلف از پی‌پریتون

جهت اندازه‌گیری حداقل دوز مهارکننده آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین از روش رقت‌سازی محیط جامد استفاده گردید. در این ارتباط محیط‌های کشت جامد متعددی با غلظت‌های مختلف از نیتروفورانتوین ساخته می‌شود، سپس میکروارگانیسم‌های مورد نظر که عبارت بودند از اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیا، انتروباکتر کلاسه، انتروباکترآیروژنوزا، پرتئوس میرابلیس، پرتئوس ولگاریس، سراشیا مارسسنس و سیتروباکتر فروندی به صورت نقطه ای روی این محیط کشت می‌شوند. میزان تلقیح هر باکتری 10^3 الی 10^4 باکتری درهر نقطه‌گذاری می‌باشد آنگاه بعد از یک شب گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نتایج تفسیر می‌گردد. حداقل غلظتی از نیتروفورانتوین که باعث جلوگیری از رشد هر سویه مورد آزمایش شده باشد به عنوان MIC محسوب می‌گردد [۸]. تغییرات MIC سویه‌های مورد آزمایش در حضور مونوترپن پی‌پریتون به همین شیوه قابل اندازه‌گیری است با این تفاوت که به محیط کشت مولرهینون حاوی ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیتروفورانتوین ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مونوترپن پی پریتون اضافه می‌گردد.

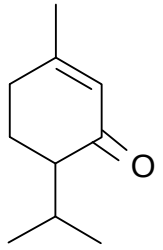
جهش‌زایی و تاثیر مونوترپن پی‌پریتون برروی ظهور سویه های مقاوم انتروباکتریاسه

حدود 10^8 سلول از سویه‌های جدا شده کلبسیلا و انتروباکتر حساس به نیتروفورانتوین در معرض ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات به مدت ۵ دقیقه قرار می‌گیرد، بعد از سانتریفوژ دو بار با آب مقطر

استریل حاوی ۰/۹ درصد وزنی حجمی‌کلرید سدیم شستشو می‌گردد [۹]. سلول‌های باقی مانده مجدداً در نرمال سالین سوسپانسیون شده و روی محیط‌های کشت حاوی ۷۰ و ۱۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیتروفورانتویین به تنهایی و در حضور ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پی‌پریتون منتقل می‌گردد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد کلنی روی محیط‌های کشت شمارش می‌گردد. مضافاً مجدداً تاثیر مونوترپن پی‌پریتون برروی مهار مقاومت سویه‌های جهش یافته مقاوم با انتقال ۶۰ کلن مقاوم روی محیط‌های فوق‌الذکر بررسی می‌گردد.

نتایج

در کروماتوگرافی لایه نازک ترکیبات فرار گیاه *M. longifolia* با حلال تولوئن – اتیل استات ۹۳ به ۷ حجمی/ حجمی‌حدود ۱۰ ترکیب قابل تشخیص بود. آزمایش بیولوژیک ترکیبات جدا شده روی صفحه TLC نشان داد که ماده‌ای با R_f حدود ۰/۳۵ که لکه مربوط به آن پس از رنگ آمیزی بامعرف وانیلین اسید سولفوریک به رنگ نارنجی در می‌آید قادر است مقاومت باکتری انتروباکتر کلاسه مقاوم را نسبت به نیتروفورانتوین از بین ببرد. مشخصات TLC این ماده با توجه به منابع و همچنین حداکثر میزان جذب نوری ماده جدا شده در اتانل که معادل ۲۳۲/۵ بود با مونوترپن پی‌پریتون (شکل شماره ۱) مطابقت داشت [۷].



شکل شماره ۱- ساختمان شیمیای پی‌پریتون

λ max این مونوترپن ۲۳۲/۵ و R_f آن در سیستم حلال فوق الذکر ۰/۳۵ و رنگ آن بعد از ظهور با معرف وانیلین در سولفوریک اسید نارنجی می‌باشد [۱۰،۷]. معهذا جهت اطمینان مراحل فوق الذکر در حضور مونوترپن استاندارد پی پریتون که از شرکت Charabot در فرانسه اهدا شده بود تکرار ونتایج مشابه به دست آمد. بررسی GC/Mass گیاه فوق‌الذکر نیز نشان دهنده وجود مقادیر قابل توجهی از این مونوترپن در ترکیب درصد مواد فرار موجود در اسانس آن می‌باشد (جدول شماره ۱).

این مونوترپن علاوه بر *M longifolia* به خصوص واریته Chlorodictya Rech. F که در ایران با پونه سرخ‌آبادی نام گذاری شده است [۱۱] در گیاهان دیگری مانند *Achillea biebersteinii* و *Artemisia judaida* نیز وجود دارد [۱۲،۱۳]. لذا پیش‌بینی می‌گردد علاوه بر ترکیبات فرار گیاه *M. longifolia* اسانس دو گیاه فوق الذکر نیز واجد اثر مهارکنندگی مقاومت به نیتروفورانتویین در باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه باشند.

مطالعات تکمیلی گیاه شناسی روی نمونه جمع‌آوری شده در این تحقیق که توسط خانم دکتر فریده عطار استادیار موزه مرکزی گیاهشناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران انجام پذیرفته است نشان می‌دهد که نام دقیق واریته این گیاه *Mentha longifolia (L.)*Hudson *var.chorodictya* Rech.F. می‌باشد که با شماره TUH-۲۷۹۳۱ در موزه گیاه‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران نگهداری می‌گردد. جدول شماره ۱ همچنین درصد و ترکیب یازده ماده عمده شناسایی شده در ترکیب فرار گیاه پونه سرخ آبادی جمع‌آوری شده در این تحقیق را با درصد و ترکیبات سه نمونه گیاهی دیگراز استان‌های شمالی کشور که توسط دکتر باقر رضایی و همکاران ایشان در موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع انجام پذیرفته است مقایسه می‌نماید [۱۱]. همانطوری‌که در جدول شماره ۱ ملاحظه

جدول شماره ۱- مقایسه ترکیبات عمده شناسایی شده و در صد آنها در نمونه پونه سرخ آبادی جمع‌آوری شده در این مطالعه و سه نمونه دیگر که در کشور توسط دکتر باقر رضایی و همکاران ایشان گزارش شده است [۱۱]

ردیف	نام ترکیب	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه اردبیل
۱	α–Pinene	۰/۲۱	۰/٦٦	۰/٥٧	۳/۹۹
۲	β–pinene	۰/۷٤	۰/۰٥	۰/۰۳	٥/۱٦
۳	β–myrcene	۰/۰۱	۲/۰٦	۱/٥۹	۲۳/۳٤
٤	dl-Limonene	–	–	–	۷/۲۷
٥	p-Menthone	۱/٤۹	–	۰/۲۸	۳/۷٥
٦	Fenchyl alcohol	–	–	–	٤/٤٦
۷	Pulegone	–	–	–	٤/۹۲
۸	Piperitone	۸/٤۰	۰/۰۳	٤۳/۹٦	۱٦/۱۹
۹	Piperitenone	۰/٦۲	۰/۰۷	۲/۹٤	۱۸/۰۷
۱۰	Piperiton oxide	۳۳/۹۱	۱۹/۹۹	۰/۳۳	٥/۳۹
۱۱	Isopiperitone	۱۱/۹۸	٥۷/۹٦	۰/۹٥	–

می‌گردد ترکیبات فرار گیاه پونه سرخ آبادی جمع‌آوری شده از اطراف اردبیل نسبت به سایر نمونه‌های گزارش شده حاوی ۱٦ درصد piperitone و مقادیر بالاتری از مونوترپن های β–myrcene وpiperitenone می‌باشد در حالی‌که مونوترپن isopiperitone در ترکیبات فرار این نمونه گیاهی یافت نگردید.

میزان تغییر MIC سویه های مقاوم انتروباکتریاسه در حضور پی‌پریتون

MIC سویه های مقاوم به نیتروفورانتوین از خانواده انتروباکتریاسه در غیاب و در حضور پی‌پریتون در جدول شماره ۲ آورده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد افزودن ۱ mg از این مونوترین به ازا ۱ میلی‌لیتر محیط کشت می‌تواند

جدول شماره ۲- میزان کاهش MIC سویه‌های متفاوت انتروباکتریاسه مقاوم به نیتروفورانتوین در حضور پی‌پریتون

سویه میکروبی	MIC (µg/ml)	غلظت پی‌پریتون (mg/ml)			
		۰/٤mg	۰/٦mg	۰/۸ mg	۱ mg
سیتروباکتر فروندی(*Citrobacter freundii*)	۷٥	>۳۰	>۳۰	۳۰	۲٥
انتروباکترآیروژنوزا (*Enterobacter aerogene*)	۲۲٥	>۳۰	>۳۰	۳۰	۲٥
انتروباکتر کلاسه (*Enterobacter cloacae*)	۲۷٥	>۳۰	۲٥	۲۰	۱٥
اشرشیا کلی (*Escherichia coli*)	۱٥۰	>۳۰	۲٥	۲۰	۱٥
کلبسیلا پنومونیا (*Klebsiella pneumoniae*)	۲۷٥	>۳۰	۳۰	۲٥	۲۰
پروتئوس میرابلیس (*Proteus mirabilis*)	۱۲٥	>۳۰	۲٥	۱٥	۱۰
پروتئوس ولگاریس (*Proteus vulgaris*)	۱۲٥	>۳۰	>۳۰	۳۰	۲٥
سراشیا مارسسنس (*Serratia marcesens*)	۳۰۰	>۳۰	۲٥	۲۰	۱٥

MIC سویه‌های مورد آزمایش را که عموماً با توجه به MIC آنها از مقاوم ترین سویه‌های میکروبی بودند به میزان ۸ برابر کاهش دهد. شایان ذکر است که کاهش MIC بیش از ٤ برابر اثر مهاری روی مقاومت محسوب شده در حالی که کاهش کمتر از ٤ برابر اثر سینرژیسم محسوب می‌گردد [١٤]. همچنین قابل توجه است که سویه‌های مورد آزمایش روی محیط‌های کشتی که فقط حاوی مونوترپن پی‌پریتون به میزان ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد رشد می‌نماید و این میزان از مونوترپن در روش آزمایش محیط کشت جامد برای تعیین MIC اثر مهاری روی رشد باکتری‌ها نداشت.

اثر مونوترپن پی‌پریتون بر ظهور سویه‌های مقاوم

نتیجه این مطالعه در جدول شماره ۳ آمده است. در طول عملیات جهش‌زایی به روش شیمیایی ۳۰۳ کلنی انتروباکتر و ۲۰۸ کلنی کلبسیلا مقاوم جدا گردید. در حالی که در شرایط جهش‌زایی به کار رفته در این تحقیق که در یک مرحله انجام شد سویه‌های با مقاومت بالای ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست نیامد. وجود پی‌پریتون باعث گردید که از بروز سویه‌های مقاوم در عملیات جهش‌زایی با ماده شیمیایی اتیل متان سولفونات کاملاً جلوگیری گردد.

در آزمایش دیگر که نتایج آن در جدول شماره ٤ آمده است مشخص گردید که پی‌پریتون قادر است مقاومت کلون‌های جدید مقاوم را نیز در برابر نیتروفورانتویین از بین ببرد در حالی‌که کلون‌های منتقل شده کماکان در انتقال مجدد نسبت به نیتروفورانتویین و مونوترپن به تنهایی مقاوم می‌باشند و این دو ماده به تنهایی اثر مهاری روی رشد موتان‌ها نداشتند. البته از ٦٠ موتان منتقل شده

جدول شماره ۳- تعداد موتان‌های مقاوم نیتروفورانتویین در حضور دارو و همچنین تاثیر پی‌پریتون روی ایجاد موتان‌های مقاوم انتروباکتر و کلبسیلا

سویه‌های حساس نیتروفورانتویین	تعداد کلنی‌های مقاوم روی محیط کشت حاوی نیتروفورانتویین	
	۷۰ mg/ml	۱۴۰ mg/ml
انتروباکتر کلاسه (*Enterobacter cloacae*)		
در غیاب پی‌پریتون	۳۰۳	۰
در حضور پی‌پریتون	۰	۰
کلبسیلا پنومونیا (*Klebsiella pneumoniae*)		
در غیاب پی‌پریتون	۲۰۸	۰
در حضور پی‌پریتون	۰	۰

جدول شماره ۴- تاثیر پی‌پریتون بر ۶۰ سویه موتان ایجاد شده بعد انتقال مجدد روی محیط های کشت واجد پی‌پریتون و نیتروفورانتویین و محیط‌های کشت حاوی پی‌پریتون و نیتروفورانتویین به تنهایی

نوع موتان	تعداد کلنی ایجاد شده روی محیط کشت جامد حاوی		
	پی‌پریتون تنها (۱ mg/ml)	نیتروفورانتویین (۷۰ µg/ml)	پی‌پریتون + نیتروفورانتویین
Enterobacter Sp.	٦٠	٦٠	۱
Klebsiella Sp.	٦٠	٦٠	۲ کلنی با رشد ضعیف

انتروباکتر یک و یا در مورد باکتری کلبسیلا دو موتان با رشد ضعیف دیده شدند که احتمالاً در جهش‌زایی اتفاقی ممکن است با مکانیسم‌های مولکولی دیگر نسبت به نیتروفورانتوین مقاومت ایجاد شده باشد معهذا موارد نادر دیده شده که با فرکانس حدود ۱/۶۰ مشاهده گردیده می‌تواند موضوع جالبی برای تحقیق در آینده باشد.

بحث

پی‌پریتون به عنوان یک مونوترپن جز موادی است که مصرف خوراکی آن محدودیت دارد و سمیت کبدی ناشی از مصرف مقادیر کم آن می‌تواند برای انسان مخاطره‌انگیز باشد. پژوهش حاضر تنها نتایج مطالعات In vitro این اثر بوده و طبیعتاً سنجش ارزش درمانی آن درIn vivo نیازمند مطالعات بیشتر است. همچنین این اثر جدید پی‌پریتون با توجه به اینکه هنوز مکانیسم اثر دقیق داروهای گروه فورانتوین و مکانیسم مقاومت ذاتی انتروباکترها نسبت به آن مشخص نشده است می‌تواند به عنوان یک عامل تداخل کننده با مکانیسم مقاومت در بررسی‌های مولکولی مرتبط به کار رود بخصوص که اخیراً در یک پایان‌نامه نشان داده‌ایم که تداخل این مواد با عملکرد نیتروفورانتوین می‌تواند ناشی از جلوگیری از احیا آنتی‌بیوتیک توسط آنزیم نیتروردوکتاز و یا سایر آنزیم‌های تخریب کننده نیتروفورانتوین باشد [۱۵].

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر طباطبایی یزدی مدیر گروه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران به خاطر استفاده از امکانات آزمایشگاه ایشان و از جناب آقای دکتر عباس شفیعی ریاست دانشکده و جناب آقای عبدی به لحاظ مساعدت‌های ایشان در بخش GC-MS تشکر می‌گردد. همچنین از زحمات جناب آقای دکتر باقری رئیس مرکز پژوهش‌های گیاهان دارویی و آبهای معدنی آذربایجان و از سرکار خانم دکتر فریده عطار و استاد محترم جناب آقای دکتر احمد قهرمان استادان موزه گیاه شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران به خاطر شناسایی دقیق واریته نمونه گیاهی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. Wright GD. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chemistry Biology*. 2000; 7**:** R127–R132.

2. Allen NE, Alborn, Jr. WE, Hobbs, Jr. JN and Kirst, HA. 7-Hydroxytropolone: An inhibitor of aminoglycoside-2″-O-adenyl-transferase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1982; 22: 824-31.

3. Clancy J, Schmieder BJ, Petitpas JW, Manousos M, Williams JA, Faiella JA, Girard AE, Mcguirk PR. Assays to detect and characterize synthetic agents that inhibit the ErmC methyltransferase. *J. Antibiot.* 1995; 48: 1273-9.

4. Hirata T, Wakatabe R, Nielsen J, Satoh T, Nihira S, Yamaguchi A. Screening of an inhibitor of the tetracycline efflux pump in a tetracycline-resistant clinical-isolate of Staphylococcus aureus 743. *Biol. Pharm. Bull.* 1998; 21: 678-81.

5. Shahverdi AR and Tavassoli F. First description on the nitrofurantion potentiation activity. *Daru*, 2002; 10:2,90.

۶. شاهوردی احمدرضا، باقری منصور و توسلی فرامرز. گزارش اثر مهارکنندگی مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین در ترکیبات گیاه

۱۱. رضایی محمدباقر، جایمند کامکار و جمزاد زیبا. بررسی و مقایسه اسانس پونه سرخ‌آبادی *Mentha longifolia(*L.*)* Hudson *var. chlorodictya* Rech.F. *متعلق به سه* منطقه مختلف. *پژوهش و سازندگی*، ۱۳۷۹، ش ٤٨، ص ٦٠.

12. Jaimand K, Rezaee MB. Comparative study of the essential oils of three Achillea species from Iran. *J Eessent oil Res.* 2001; 13: 354-6.

13. Charchari S. The essential oil of *Artemisia judaida* L. from Algeria. *J. Eessent oil Res.* 2002; 14: 16-7.

14. Greenwood D. *Antimicrobial chemo-therapy*, 4th edition, Oxford University Press; 2000; pp: 118-25.

۱۵. کاکاوند مرجان. تداخل برش‌های کروماتوگرافی I و II برروی انتروباکترهای حساس و سویه‌های موتان حاصل از آن، پایان‌نامه دوره دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران, ۱۳۸۱.

Mentha longifolia، *فصلنامه گیاهان دارویی*، ۱۳۸۱، شماره٤ صفحات ٤٠ ـ ٣٥.

7. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis*: *A Thin layer Chromatography Atlas* (2nd edn). Springer-Verlag: Berlin Heidellberg .1996; pp: 166-79.

8. Approved Standard NCCLS Document M7-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Second Edition.1990; 10**:** No. 8, NCCLS, Villanova, PA.

9. Markham PN, Neyfakh AA. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 2673-4.

10. *The Merck Index; An Encyclopedia of chemicals, Drugs, and biologicals*, 13th edition, Merck&Co. Inc. Whitehouse station, NJ, 2001.