Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 21(131): 10-20

Investigation the Effect of Micelle Nanoparticles Containing Curcumin on Ciprofloxacin Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and on mexC and mexD Genes Expression

Bozorgmehr Imani Pirsaraei[1], Najmeh Ranji[2*], Leila Asadpour[2]

1. MSc Student, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Received: 13 Jan 2018, Accepted: 4 Mar 2018

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic gram-negative bacterium that is a major cause of nosocomial infections such as severe burns. Curcumin is the main component of turmeric (*Curcuma longa*) that has anti-cancer and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to evaluate antibacterial effect of curcumin in ciprofloxacin resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa through mexC and mexD gene expression.

Materials and Methods: In this descriptive-analytical study, Pseudomonas aeruginosa strains were obtained from hospitals and laboratories in Guilan province. After disc difusion and MIC tests, four ciprofloxacin resistant strains of Pseudomonas aeruginosa were treated by ciprofloxacin (1/2MIC) only (control sample) and in the combination with curcumin encapsulated in micelle nanoparticles (test sample). After 24h, RNA extraction and cDNA synthesis was performed. Then, the expression of mexC and mexD genes was evaluated quantitatively by Real-time PCR method in curcumin treated and un-treated cells

Results: This study showed that combination of ciprofloxacin (1/2 MIC) with curcumin encapsulated in micelle nanoparticles led to approximately 50% of growth inhibition in Pseudomonas aeruginosa. In treated cells with curcumin and ciprofloxacin compared to treated cells with ciprofloxacin alone, mexC and mexD genes were significantly ($p<0.05$) downregulated >0.65 fold in three isolates and >0.1 fold in four isolates, respectively.

Conclusion: Our results suggested that curcumin encapsulated in micelle nanoparticles combined with 1/2 MIC value of ciprofloxacin inhibits the growth of Pseudomonas aeruginosa through reducing mexC and mexD expression.

Keywords: Ciprofloxacin, Curcumin, MexC, MexD, Micelle nanoparticles, Pseudomonas Aeruginosa.

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۱، شماره ۲ (شماره پیاپی۱۳۱)، اردیبهشت ۱۳۹۷، ۲۰-۱۰

بررسی اثر نانوذرات میسلی حاوی کورکومین بر جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین و بر بیان ژن هایmexC و mexD

بزرگمهر ایمانی پیرسرایی[۱]، نجمه رنجی[۲*]، لیلا اسدپور[۲]

۱.دانشجوی کارشناس ارشد، بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی ، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی ، رشت، ایران.
۲.استادیار، گروه زیست شناسی ، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی ، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۳، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و فرصت طلب است که علت اصلی عفونت‌های بیمارستانی مانند سوختگی شدید می‌باشد. کورکومین جزء اصلی گیاه زردچوبه (*Curcuma longa*) است که دارای اثرات ضد سرطانی و ضد التهابی است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضد باکتریایی کورکومین در سودوموناس آئروژینوزا از طریق بیان mexC وmexD بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های استان گیلان تهیه شد. پس از تست آنتی‌بیوگرام و آزمایش MIC، چهار جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین با استفاده از سیپروفلوکساسین به تنهایی (۱/۲MIC) (نمونه کنترل) و در ترکیب با کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی (نمونه تست) تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. سپس بیان ژن‌های mexC و mexD با استفاده از روش Real-Time PCR در سلول‌های تحت تیمار با کورکومین و بدون تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: این مطالعه نشان داد که ترکیب سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) با کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی باعث مهار رشد تقریباً ۵۰ درصدی در سودوموناس آئروژینوزا می‌شود. در سلول‌های تیمار شده با کورکومین و سیپروفلوکساسین در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین به تنهایی، ژن‌هایmexC و mexD به میزان ۰/۶۵> و ۰/۱> به ترتیب در سه جدایه و چهار جدایه کاهش بیان معنی دار ($p <$ ۰/۰۵) داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی همراه با غلظت ۱/۲MIC سیپروفلوکساسین موجب مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا از طریق کاهش بیان ژن‌های mexC و mexD می‌شود.

واژگان کلیدی: سیپروفلوکساسین، کورکومین، mexC، mexD، نانوذرات میسلی، سودوموناس آئروژینوزا.

***نویسنده مسئول:** ایران، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

مقدمه

در تقابل بین عفونت و درمان، سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عامل بیماری زای انسانی به خاطر توان بالا در مقابله با هر داروی جدیدی، همیشه پیروز میدان است. با وجود آگاهی از بعضی از مکانیسم های شناخته شده ایجاد کننده مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا، دلایل ناشناخته ای هم وجود دارد که به سرعت باعث ایجاد جمعیت های سودوموناسی مقاوم به داروهای ضدمیکروبی بعد از مواجهه با آن ها می شود. از سوی دیگر، از آن‌جایی‌که این باکتری حدود ۱۰ درصد عفونت های اکتسابی بیمارستانی، عفونت های مزمن ریوی همراه با سیستیک فایبروزیز (۱) و عفونت های منجر به مرگ در موارد با نقص سیستم ایمنی هم‌چون ابتلا به HIV (۲)، سرطان ها و سوختگی ها را شامل می شود (۳)، دارای اهمیت زیادی است(۱). معمولا از داروهای خاصی برای درمان عفونت های سودوموناس آئروژینوزا هم‌چون سیپروفلوکساسین، توبرومایسین، جنتامایسین، سفتازیدایم و ایمی‌پنم استفاده می شود. با این وجود، این باکتری توانسته سطوح مختلف مقاومت به این آنتی بیوتیک ها را به دست آورد. در این بین، با این‌که سیپروفلوکساسین در ابتدا در زمره داروهای بسیار مؤثر ضد سودوموناسی قرار گرفت، اما با توجه به این‌که باکتری به سرعت با مکانیسم های خاصی به آن مقاوم شد، دارای اهمیت و توجه خاصی است(۱). به طوری‌که در چندین مطالعه در سال های اخیر تنها در ایران در نواحی مختلف جغرافیایی، افزایش مقاومت به این دارو در سودوموناس آئروژینوزا بارها گزارش شده است (۷-۴).

مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک ها در سودوموناس‌آئروژینوزا از جمله افزایش بیان ژن های افلاکس پمپ، تغییر ساختار آنزیم‌های هدف در اثر جهش و انتقال افقی ژن‌های بتالاکتامازها شناسایی شده است (۸). پمپ‌های افلاکس موجود در غشای سودوموناس‌آئروژینوزا باعث خروج داروها، رنگ‌ها، شوینده‌ها، حلال‌های آلی و دیگر عوامل خطرساز باکتری از سلول و در نتیجه باعث بقای باکتری می‌شوند (۹). یکی از علل ایجاد مقامت به فلوروکوئینولون ها، افزایش بیان ژن های پمپ افلاکس mexCD-oprJ است که در بعضی جدایه های مقاوم به دارو شناسایی شده است (۱۲-۱۰). جهش در ژن‌های تنظیم کننده بیان این سیستم های پمپ افلاکس (۳) نظیر ژن nfxB (۱۰، ۱۳) باعث افزایش بیان این ژن‌ها (۱۴) و در نتیجه خروج بیشتر دارو از سلول می‌شود، به این ترتیب به غلظت بیشتری از دارو برای افزایش اثربخشی آن‌ها و کشندگی باکتری نیاز می باشد (۱۵).

کورکومین ترکیب فعال ریشه گیاه زردچوبه (*Curcuma Longa*) است (۱۶) که از دیرباز در رژیم غذایی آسیایی ها مورد استفاده قرار گرفته (۱۷) و امروزه اثرات ضدسرطانی، ضد التهابی و ضد میکروبی (علیه ویروس-ها، باکتری ها و قارچ های پاتوژن) (۱۸) آن در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است. با توجه به حلالیت کم این ترکیب فعال گیاهی در محیط های آبی، استفاده از آن به عنوان یک مکمل درمانی با مشکل مواجه شده است. محققان در تلاشند از ناقلین زیست تخریب پذیر و غیر سمی در ابعاد نانو هم‌چون نانوذرات میسلی (۱۹)، لیپوزومی و دندروزوم برای رهایش این ترکیب گیاهی به درون سلول ها بهره برند. در این مطالعه برای افزایش حلالیت کورکومین در محیط کشت باکتری از نانوذرات میسلی استفاده شد که دارای ساختار کروی با قطر ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر، آمفی پاتیک و با بار منفی هستند(۲۰). ناقلین نانو به دلیل اندازه کوچکشان باعث انتقال سریع‌تر و راحت‌تر دارو از غشاهای زیستی شده و استفاده از آن‌ها باعث افزایش پایداری کورکومین می شود (۲۱) و این در حالی است که حدود ۹۰ درصد کورکومین آزاد بعد از ۳۰ دقیقه در محیط کشت فاقد سرم از بین می رود. نانوذرات میسلی به خاطر ساختار اسیدچربشان سازگار با محیط های زیستی بوده و توان زیست تخریب پذیری دارند (۲۰) و از این نظر برای بدن به عنوان یک ناقل نانو آسیب رسان

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

نیستند. با توجه به کاهش اثربخشی آنتی بیوتیک ها به علت مصرف زیاد و خودسرانه، لازم است تمهیداتی جهت اثربخشی این داروها اندیشیده شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثربخشی سیپروفلوکساسین به واسطه کورکومین بر مرگ جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به سیپروفلوکساسین و بررسی بیان ژن های افلاکس پمپ mexC و mecD بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و شناسایی باکتری

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، جدایه‌های مشکوک به سودوموناس‌آئروژینوزا در بازه زمانی ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ از بیمارستان‌های ولایت، آریا، قائم و رازی رشت و آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان تهیه و جهت تعیین هویت سودوموناس آئروژینوزا، رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، بررسی تولید رنگ‌دانه سبز رنگ در محیط کشت مولرهینتون‌آگار، رشد در محیط کشت سیتریماید آگار و رشد در دمای ۴۲ درجه سیلیسیوس صورت گرفت .

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک

با استفاده از دیسک سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) (HiMedia، هند) مقاومت جدایه های سودوموناس آئروژینوزا به این دارو به روش آنتی بیوگرام و طبق استاندارد CLSI۲۰۱۳ سنجیده شد. قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس اندازه گیری شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) در جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساین، از روش براث دایلوشن استفاده شد. رقت باکتری به میزان ۰/۵ مک فارلند تهیه و به همراه رقت‌های مختلف سیپروفلوکساسین (۱-۲۰۴۸میکروگرم در میلی لیتر) (شرکت روناک دارو، ایران) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از گذشت ۱۸ تا ۲۴ ساعت از انکوباسیون، اولین لوله‌ای که کدورت قابل مشاهده‌ای نداشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

روش انکپسوله کردن کورکومین در نانوذرات میسلی

در این تحقیق از نانوذرات میسلی (ترکیب اولئیک اسید و پلی اتیلن‌گلایکول) تهیه شده توسط تیم تحقیقاتی دکتر فرهود نجفی و دکتر مجید صادقی زاده استفاده شد. برای سنتز این نانوذرات، اولئویل کلراید و پلی اتیلن گلایکول در حضور تری اتیل آمین و کلروفرم (به عنوان حلال) در دمای ۲۴ درجه سیلیسیوس قرار گرفتند. بعد از گذشت ۴ ساعت، تری اتیلن آمین هیدروکلراید از فاز ارگانیک فیلتر شد و سپس کلروفرم در دمای ۴۰ درجه سیلیسیوس در دستگاه وکیوم تبخیر گردید. در ادامه نانوذرات میسلی و کورکومین استخراج شده از گیاه زردچوبه توسط تیم تحقیقاتی دکتر نجفی در شرایط مناسب مخلوط و در دمای اتاق نگهداری شد.

تیمار جدایه ها با سیپروفلوکساسین و کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی

جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین تحت تیمار با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی و سیپروفلوکساسین با غلظت ۱/۲MIC (که قدرت مهار رشد باکتری را نداشت) در میکروپلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس قرار گرفتند. علت استفاده از غلظت ۱/۲MIC سیپروفلوکساسین این بود که غلظت معادل MIC دارو اثر مهارکنندگی کامل رشد باکتری را داشته و برای مهار رشد نیمی از باکتری ها لازم بود از یک غلظت پایین تر از MIC (۱/۲MIC) استفاده شود(۲۲). قابل ذکر است جهت بررسی بیان ژن در هر موجودی لازم است حداکثر نیمی از سلول ها بعد از تیمار با دارو زنده بمانند تا بتوان استخراج RNA و دیگر آزمایشات مولکولی را بر روی آن ها انجام داد. بعد از ۲۴ ساعت، مقدار ۲۰ میکرولیتر از مخلوط موجود در هر چاهک (حاوی باکتری های تحت تیمار

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

با سیپروفلوکساسین و/یا کورکومین) به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل و کشت کامل داده شد. هدف از این آزمون، بررسی چشمی میزان مرگ و رشد جدایه ها تحت تیمار با داروها و تعیین بهترین غلظت کشندگی به واسطه کورکومین و سیپروفلوکساسین (کشندگی تقریباً نیمی از سلول ها) بود. هر آزمون حداقل دوبار تکرار گردید.

استخراج RNA از جدایه های تیمار شده با دارو

استخراج RNA از جدایه‌های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) و غلظت مؤثر نانو ذرات میسلی حاوی کورکومین (با توان کشندگی تقریبا نیمی از سلول ها) (نمونه تست) و جدایه‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC)(نمونه کنترل) به کمک کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما، ایران) صورت گرفت. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده از نانودراپ 2000c (امریکا) استفاده شد.

سنتز cDNA و بررسی بیان ژن mexC و mexD به روش کمی Real-Time PCR

در این مطالعه سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) صورت گرفت. به این منظور RNA، اولیگو dT و آب RNase free با هم مخلوط شده، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سیلیسیوس قرار داده شد. سپس آنزیم و دیگر اجزای واکنش به مخلوط اضافه شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سیلیسیوس (برای انجام واکنش) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سیلیسیوس (برای غیرفعالسازی آنزیم RT) در دستگاه ترموسایکلر Analaytik Jena قرار داده شد. در ادامه، مقایسه سطح بیان ژن های mexC و mexD، در دو گروه سلولی قبل و پس از تیمار دارویی به کمک روش Real-Time PCR کمی و با استفاده از ژن Rpsl (به عنوان ژن مرجع) به کمک کیت SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara، ژاپن) در دستگاه ABI StepOne (امریکا) بررسی شد. برنامه دمایی واکنش Q-PCR به قرار ذیل بود: مرحله واسرشت شده ابتدایی (۹۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه) و ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه. پرایمرهای مورد استفاده (جدول ۱) توسط شرکت Bioneer کره جنوبی سنتز گردید. آنالیز بیان ژن ها در نمونه های تست و کنترل به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR
mexC	F	5'-AGCCAGCAGGACTTCGATACC-3'	۳۷۴ bp
mexC	R	5'-ACGTCGGCGAACTGCAAC-3'	
mexD	F	5'-GGAGTTCGGCCAGGTAGTGCTG-3'	۲۳۶ bp
mexD	R	5'-ACTGCATGTCCTCGGGGAAGAA-3'	
Rpsl	F	5'- GCTGCAAAACTGCCCGCAAC-3'	۲۴۹bp
Rpsl	R	5'- CCCGAGGTGTCCAGCGAACC-3'	

آزمون آماری

نتایج بیان ژن به‌صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است. از آزمون تی تست برای مقایسه اختلاف بین دو گروه تست و کنترل استفاده شد. همه محاسبات آماری به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ صورت گرفت. مقدار $p < ۰/۰۵$ به عنوان معنی‌دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

یافته‌ها

در این مطالعه توصیفی تحلیلی، ۶۹ جدایه سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد که از نمونه های سوختگی، ادراری، ترشحات تنفسی، نکروز بافتی، خون، گوش و غیره (موارد با موضع عفونت تعیین نشده) به دست آمد.

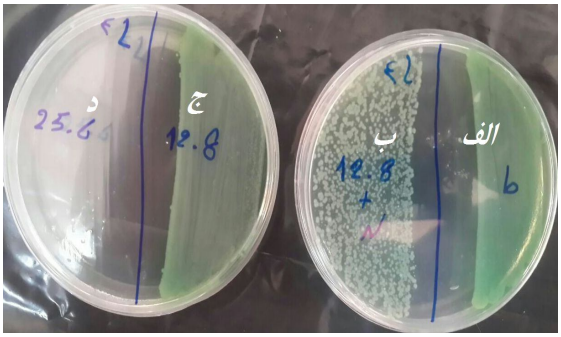
مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار از دیسک ۳۳/۳۳ درصد بود. نتایج MIC سیپروفلوکساسین نشان داد که ۲۶نمونه (۳۷/۶۸ درصد) مقاوم به دارو بودند و این تفاوت میزان مقاومت در دو روش تعیین حساسیت به دارو، به خاطر دقت بالاتر روش MIC است. میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در جدایه ها به روش براث دایلوشن (MIC) بین ۳۲ تا۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد.

تیمار جدایه‌های مقاوم با کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی و سیپروفلوکساسین

چهار جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با رقت های مختلف سیپروفلوکساسین و نانوذرات میسلی حاوی کورکومین قرار گرفتند. برای تأیید کشندگی ۵۰ درصدی داروی ترکیبی، بعد از ۲۴ ساعت جدایه های تیمار شده در محیط کشت آگار کشت کامل داده شدند.

نتایج کشت کامل در آگار نشان داد که غلظت ۱/۲MIC سیپروفلوکساسین (که توان مهار رشد باکتری را نداشت) در حضور کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی، قادر به کاهش حدوداً۵۰ درصدی تشکیل کلونی های باکتریایی بود (شکل ۱).

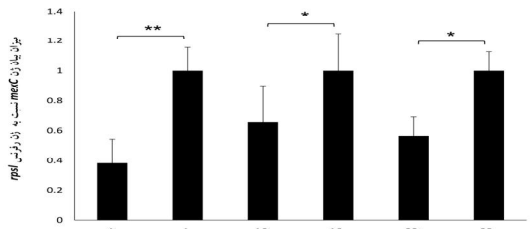
غلظت مؤثر کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی برای افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین در این مطالعه، ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد.



شکل ۱. کشت نمونه ٤ تیمار شده با سیپروفلوکساسین و کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی. الف) باکتری بدون تیمار با دارو، ب) تحت تیمار با غلظت ٤۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی و غلظت۱/۲ MIC سیپروفلوکساسین (کاهش حدوداً ۵۰ درصدی تشکیل کلونی)، ج) تحت تیمار با غلظت۱/۲ MIC سیپروفلوکساسین (رشد مشابه با باکتری بدون تیمار)، د) تحت تیمار با غلظت MIC سیپروفلوکساسین (عدم تشکیل کلونی به خاطر توان کشندگی بالای این غلظت دارو).

کاهش بیان ژن های mexC و mexD بعد از تیمار جدایه ها با کورکومین و سیپروفلوکساسین

مقایسه بیان ژن های mexC و mexD در جدایه های تحت تیمار با ترکیب کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی (۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) نسبت به جدایه های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی (۱/۲MIC) به روش کمی Real-Time PCR صورت گرفت. نتایج کاهش معنی دار بیان ژن mexC را در سه جدایه (نمودار۱) و کاهش معنی دار بیان ژن mexD را در چهار جدایه (نمودار۲) نشان داد.

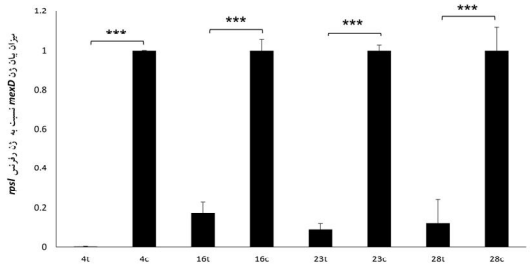


نمودار ۱. میزان بیان ژن mexC در نمونه های٤، ١٦ و ٢٣ تحت تیمار ترکیبی سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) و کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی (٤۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) (t)

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

در مقایسه با نمونه های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (1/2MIC) به تنهایی (c). از ژن Rpsl برای نرمال سازی نتایج استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. تفاوت معنی دار بین نتایج تست (t) و کنترل (c) به صورت $p < ۰/۰۵$* و $p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$*** نشان داده شده است.**



نمودار ۲. میزان بیان ژن mexD در نمونه های٤، ١٦، ۲۳ و ۲۸ تحت تیمار ترکیبی سیپروفلوکساسین (1/2MIC) و کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی (٤۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) (t) در مقایسه با نمونه های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (1/2MIC) به تنهایی (c). از ژن Rpsl برای نرمال سازی نتایج استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. تفاوت معنی دار بین نتایج تست (t) و کنترل (c) به صورت $p < ۰/۰۵$* و $p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$*** نشان داده شده است.**

بحث

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی، یکی از علل مهم مرگ و میر در مبتلایان به ضعف سیستم ایمنی هم‌چون HIV (۲)، سیستیک فیبروزیس و سوختگی ها می باشد(۳). یکی از معضلات مهم در درمان عفونت‌های سودوموناسی، توان بالای این باکتری در کسب مقاومت به داروهای جدید است (۱) که برای غلبه بر این شکل لازم است از راهکارهای جایگزین مناسب استفاده شود. در این مطالعه مشخص شد که کورکومین انکپسوله در نانوذرات میسلی قادر به افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین در مرگ جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین بود.

در مطالعه‌ای که توسط نهایی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تبریز انجام شد، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین ۲۲ درصد گزارش گردید (۲۳). در مطالعه تقوایی و همکاران در اراک در سال‌های ۹۰-۸۹ در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت به سیپروفلوکساسین ۱۵/۷ درصد گزارش شد (۶). در حالی‌که در مطالعه حاضر از ۶۹ جدایه سودوموناس آئروژینوزا به دست آمده از نمونه های مختلف بیمارستانی ۳۷/۶۸ درصد موارد مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. بر اساس نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر به نظر می‌رسد در نواحی مختلف کشور و در سال‌های مختلف میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، متفاوت اما در حال افزایش می‌باشد. هم‌چنین در مطالعه نیکوکار و همکاران در سال ۲۰۱۳ در گیلان بر روی نمونه های سوختگی میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۶۳/۳ درصد مشاهده شد (۷). با توجه به این‌که نیکوکار و همکاران میزان مقاومت به دارو را تنها بر روی نمونه های سوختگی بررسی کردند، به دلیل داشتن سیستم ایمنی ضعیف تر در این موارد، شرایط رشد باکتری های مقاوم به دارو مناسب تر بوده و از این‌رو توزیع مقاومت در این گروه نسبت دیگر نمونه ها در مطالعه نیکوکار بالاتر می باشد. در حالی‌که مطالعه حاضر بر روی نمونه های سوختگی و دیگر موارد عفونی بیمارستانی صورت گرفته است. با توجه به سرعت بالای این باکتری بیماریزا در کسب مقاومت لازم است محققین به دنبال یافتن داروهای جایگزین مناسب جهت درمان این نوع عفونت فرصت طلب بیمارستانی باشند تا هزینه های درمان و مراقبت از بیماران کاهش یابد.

افزایش مقاومت‌های دارویی باعث شده محققان به دنبال داروهای گیاهی جایگزین و یا مکمل اثر آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار رشد این عوامل بیماری‌زا باشند. در مطالعه شاهیان و همکاران در سال ۱۳۹۳ تاثیر ضدباکتریایی عصاره انار بر چندین باکتری از جمله سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد (۲۴). در مطالعه رمضانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ اثر

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

ضدباکتریایی بنفشه معطر بر ۳ باکتری پاتوژن شامل استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد و بیشترین تأثیر آن بر استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین اثر آن بر سودوموناس آئروژینوزا مشاهده گردید(۲۵) در مطالعه روشنی و همکاران در سال ۱۳۹۵ مشخص شد که عصاره های متانولی و استونی گزنه و آویشن شیرازی روی جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو اثر کشندگی دارند (۲۶). در مطالعه حاضر نیز مشابه با مطالعات دیگر محققان، اثر ترکیب گیاهی از زردچوبه بر جدایه های سودوموناس آئروژینوزا و اثر ضدباکتریایی آن مشاهده شد.

در مطالعه کارامان و همکاران در سال ۲۰۱۳، اثر سینرژیک کورکومین (ترکیب فعال گیاه زردچوبه) با ایمی پنم و توبرامایسین بر مهار تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا بررسی و تأیید گردید (۲۷). در مطالعه‌ی حاضر اثر مهاری کورکومین محبوس شده در نانوذرات میسلی در ترکیب با سیپروفلوکساسین در جدایه های بالینی مقاوم به این آنتی‌بیوتیک مشاهده شد و اثر سینرژیک آن با سیپروفلوکساسین نشان داده شد. در این مطالعه مشخص شد که ترکیب فعال زردچوبه (کورکومین محبوس شده در نانوذرات میسلی) قادر است باکتری ها را در دوز پایین تر از MIC سیپروفلوکساسین که باکتری توان رشد کامل داشت، از طریق تغییراتی در سلول باعث مرگ سلول ها شود. در مطالعه گارسیا-گومز و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی سه جدایه حساس و مقاوم به فلوکونازول طی ۴۸ ساعت، کشندگی ۵۰ درصدی در دو جدایه با غلظت های مختلف تایید شد، اما در یک سویه حساس ATCC 24433 درصد کشندگی کورکومین با غلظت ۵۰ میکرومول به حدود ۴۰ درصد از سلول‌ها رسید(۲۸). در حالی‌که در مطالعه حاضر، اثر کشندگی تقریبا ۵۰ درصدی جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین در زمان کمتر (طی ۲۴ ساعت) تأیید شد. علت این امر استفاده از دوز بالاتر کورکومین و هم‌چنین استفاده از نانوذرات میسلی جهت افزایش رهایش کورکومین به سلول بود. کورکومین به تنهایی حلالیت کمی در محیط های زیستی داشته و حلال های آلی آن (هم‌چون الکل و DMSO) برای سلول کشنده می باشد (۲۱). از این‌رو در مطالعات اخیر از نانوذرات مختلف جهت رهایش بهتر ترکیبات گیاهی چون کورکومین به درون سلول ها استفاده می شود که با افزایش تأثیر داروی گیاهی بر سلول ها همراه می باشد. در این مطالعه از نانوذرات میسلی با خاصیت زیست تخریب پذیری، کوچک بودن اندازه بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر، عدم سمیت و رهایش مناسب دارو به درون سلول ها استفاده شد (۲۹). افزایش رهایش دارو توسط این نانوذرات باعث مهارکنندگی رشد بیشتر و کشندگی بیشتر باکتری ها در زمان کمتر می شود.

در مطالعه تیاگی و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی چند سویه باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*)) و گرم منفی (اشرشیا کولی و سودوموناس آئروژینوزا) مشخص شد که اثر باکتری کشی کورکومین از طریق آسیب به غشاء می باشد (۱۶). تئو و همکاران در در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ با بررسی اثر کورکومین بر استافیلوکوک اورئوس اثرات ضدباکتریایی آن را از طریق اغتشاش در غشاء و دیواره سلولی، افزایش حساسیت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و مهار سایتوکینز و تکثیر سلولی نشان دادند(۳۰). در مطالعه نگی و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر یک مهار کننده پمپ های افلاکس (فنیل آلانین آرژنیل بتا نفتیل آمید (PAβN)) به همراه کورکومین بر روی جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو بررسی شد و نشان داده شد که کورکومین قادر است اثری مشابه با این دارو داشته باشد. بنابراین اظهار شد که کورکومین ممکن است به عنوان یک مهار کننده پمپ های افلاکس در سودوموناس آئروژینوزا عمل کند(۳۱). در مطالعه شارما و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به آزول مشخص شد

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

که کورکومین باعث کاهش خروج رودامین 6G به واسطه پمپ افلاکسABC می‌گردد، اما تأثیری بر خروج متوترکسات از طریق پمپ افلاکس خانواده MFS ندارد (۱۹). در مطالعه خواجه و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی جدایه های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به آزول تحت تیمار با گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba*) مشخص شد که بیان ژن‌های افلاکس پمپ CDR1 و CDR2 تحت تیمار با عصاره این گیاه کاهش می‌یابد (۲۰). بنابراین انتظار می رود داروهای گیاهی چون کورکومین وخوشاریزه از طریق تغییر در بیان ژن های افلاکس پمپ بتوانند باعث حبس آنتی بیوتیک در سلول شوند. در مطالعه حاضر تأثیر کورکومین محبوس شده در نانوذرات میسلی برکشندگی سلول از طریق تغییر در بیان ژن‌های mexC و mexD (دخیل در سیستم افلاکس پمپ mexCD-oprJ) برای اولین بار در دنیا بررسی شد. در مطالعه لی و همکاران در سال ۲۰۰۰ مشخص شد که افزایش بیان mexCD-oprJ در ایجاد مقاومت به فلوروکوئینولون ها در سودوموناس آئروژینوزا نقش دارد (۳۲). در مطالعه پورسل و همکاران جهش در nfxB باعث افزایش بیان mexCD-oprJ شد که در ایجاد مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها از جمله فلوروکوئینولون ها، بتالاکتام ها و آمینوگلایکوزیدها نقش دارد (۱۰). بنابراین افزایش بیان ژن‌های مربوط به سیستم افلاکس پمپ mexCD-oprJ از علل ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک هایی چون سیپروفلوکساسین در سلول می باشد. در این مطالعه کاهش بیان این دو ژن mexC و mexD نشان می دهد که کورکومین توانسته در سلول های تحت تیمار با اثر بر بیان این ژن ها باعث کاهش بیان آن ها شود. این امر باعث کاهش تعداد پمپ های افلاکس در سطح سلول، کاهش خروج سیپروفلوکساسین از سلول های تحت تیمار و افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین محبوس شده در سلول شده است. به طوری‌که دوز **۱/۲MIC** با این‌که در سلول های تحت تیمار به تنهایی قادر به مهار رشد نبود، اما در سلول هایی که تیمار ترکیبی با کورکومین را داشتند در اثر کاهش پمپ های افلاکس سطح سلول و افزایش میزان سیپروفلوکساسین محبوس شده درون سلول، اثر مهارکنندگی رشد با همین دوز (**۱/۲MIC**) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک هایی چون سیپروفلوکساسین در عفونت‌های بیمارستانی از جمله سودوموناس آئروژینوزا لازم است از داروهای جایگزین مناسب و با عوارض جانبی کمتر بهره گرفته شود. در این مطالعه مشخص شد که کورکومین به عنوان یک داروی مکمل می تواند اثر سینرژیک با سیپروفلوکساسین داشته باشد. به نظر می رسد یکی از اثرات کورکومین بر جدایه های مقاوم به سیپروفلوکساسین، کاهش بیان ژن‌های افلاکس پمپ mexC وmexD است که به این طریق منجر به محبوس شدن میزان بیشتری از داروی سیپروفلوکساسین در سلول و افزایش اثربخشی آن می شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت نمودند کمال تشکر و سپاس‌گزاری را می نمایند.

منابع

1.Su HC, Ramkissoon K, Doolittle J, Clark M, Khatun J, Secrest A, et al. The development of ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa involves multiple response stages and multiple proteins. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(11):4626-35.

2.Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes. Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research. 2010;10(4):441-51.

3.Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of mexZ gene in ciprofloxacin resistance in Pseudomonas

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

aeruginosa isolates in Guilan province. URMIA MEDICAL JOURNAL. 2017;27(10):902-13.
4.Kalantar E, Taherzadeh S, Ghadimi T, Soheili F, Salimizand H, Hedayatnejad A. Pseudomonas aeruginosa, an emerging pathogen among burn patients in Kurdistan Province, Iran. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2012;43(3):712-7.
5.Fazeli N, Momtaz H. Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolated From Iranian Hospital Infections. Iranian Red Crescent medical journal. 2014;16(10):e15722.
6.Taghvaee R, Shojapour M, Sadeghi A, Pourbabaie AA. The Study of Antibiotic Resistance Pattern and the Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Medical Centers in Arak City, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2013;7(4):36-41.
7.Nikokar I, Tishayar A, Flakiyan Z, Alijani K, Rehana-Banisaeed S, Hossinpour M, et al. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among Pseudomonas aeruginosa, isolated from burn patients in Guilan, Iran. Iranian journal of microbiology. 2013;5(1):36-41.
8.Hakimi F, Ranji N, Faezi Ghasemi M. Mutations in nalC gene in ciprofloxacin resistant strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from hospitals and laboratories of Guilan province in 2014-2015 years. Arak Medical University Journal. 2016;19(7):12-21.
9.Nehme D, Poole K. Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of Pseudomonas aeruginosa: component interactions defined by the study of pump mutant suppressors. Journal of bacteriology. 2007;189(17):6118-27.
10.Purssell A, Poole K. Functional characterization of the NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of Pseudomonas aeruginosa. Microbiology. 2013; 159(Pt 10):2058-73.
11.Martinez-Ramos I, Mulet X, Moya B, Barbier M, Oliver A, Alberti S. Overexpression of MexCD-OprJ reduces Pseudomonas aeruginosa virulence by increasing its susceptibility to complement-mediated killing. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014; 58(4):2426-9.
12.Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, Plesiat P. Resistance and virulence of Pseudomonas aeruginosa clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008; 52(7):2455-62.
13. Stickland HG, Davenport PW, Lilley KS, Griffin JL, Welch M.Mutation of nfxB causes global changes in the physiology and metabolism of Pseudomonas aeruginosa. J Proteome Res. 201; 9(6):2957-67.
14. Morita Y, Sobel ML, Poole K. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product . Journal of bacteriology. 2006;188(5):1847-55.
15.Ahmadi Roudbaraki Z, Ranji N, Soltani Tehrani B. Deregulation of Mexb Gene in Ciprofloxacin Resistant Isolates of Pseudomonas Aeruginosa Treated with Silibinin-Encapsulated in Nanoparticles. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2017;19(11):42-9.
16.Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. PloS one. 2015;10(3):e0121313.
17.Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. Current pharmaceutical design. 2009;15(18):2087-94.
18.Bejari A, Ranji N, Soltani Tehrani B. Antifungal property of Curcumin encapsulated in micelle nanoparticles against fluconazole resistant isolates of Candida albicans with downregulation of MDR1 gene. Journal of Microbial World. 2017.
19.Lee WH, Bebawy M, Loo CY, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Fabrication of Curcumin Micellar Nanoparticles with Enhanced Anti-Cancer Activity. Journal of biomedical nanotechnology. 2015;11(6):1093-105.
20.Alizadeh AM, Sadeghizadeh M, Najafi F, Ardestani SK, Erfani-Moghadam V, Khaniki M,

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:38 +0430 on Saturday May 19th 2018

et al. Encapsulation of curcumin in diblock copolymer micelles for cancer therapy. BioMed research international. 2015;2015:824746.
21.Ranji N, Sadeghizadeh M, padeganeh A. Investigation of free and dendrosomal curcumin effects on apoptosis induction in stem cells and cancer cell lines. Pathobiology Research. 2011;14(2):37-49.
22.Packiavathy IA, Priya S, Pandian SK, Ravi AV. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from Curcuma longa. Food chemistry. 2014;148:453-60.
23.Nahaei M, Bohloli Khiavi R, Asgarzadeh M, Hasani A, Sadeghi J, Akbari Dibavar M. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of Pseudomonas Aeruginosa Strains Isolated from In-Patients of Sina Hospital-Tabriz. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2007;7(1):90-8.
24.Hassanshahian M, Mohsenipour Z. The Antimicrobial Effects of the Alcoholic Extracts of Pomegranate (Punica Granatum) on the Planktonic Forms and Biofilm Structures of Six Pathogenic Bacteria. Journal of Babol University Of Medical Sciences. 2015;17(1):77-84.
25.Ramezani M, Zarrinkamar F, Bagheri M, Rajabnia R. Study of Environment Temperature Effect on the Antibacterial Activity of Water Extract of Different Organs of Viola Odorata in the Different Stages of Growth. Journal of Babol University Of Medical Sciences. 2012;14(2):16-21.
26.Roshani M, Heidary M, Goudarzi H, Hashemi A, Eslami G, Yousefi N. Investigating the Antibacterial Effect of Methanoland Acetone Extracts of Urtica Dioica and Zataria Multifloraagainst Metallo Beta-lactamase Producing Pseudomonas aeruDecember 5, 2015 ginosa. Journal of ilam university of medical sciences. 2016;24(3):70-8.
27.Karaman M, Firinci F, Arikan Ayyildiz Z, Bahar IH. [Effects of Imipenem, Tobramycin and Curcumin on Biofilm Formation of Pseudomonas aeruginosa Strains]. Mikrobiyoloji bulteni. 2013;47(1):192-4.
28.Garcia-Gomes AS, Curvelo JA, Soares RM, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of Candida albicans showing a MDR phenotype. Medical mycology. 2012;50(1):26-32.
29.ranji n. Investigation of Survivin and hTERT gene expression in gastric adenocarcinoma cell line (AGS) treated by nano Curcumin. Journal of Cellular and Molecular Researches. 2014;27(2):233-41.
30.Teow SY, Liew K, Ali SA, Khoo AS, Peh SC. Antibacterial Action of Curcumin against Staphylococcus aureus: A Brief Review. Journal of tropical medicine. 2016;2016:2853045.
31.Negi N, Prakash P, Gupta ML, Mohapatra TM. Possible Role of Curcumin as an Efflux Pump Inhibitor in Multi Drug Resistant Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. 2014;8(10):DC04-7.
32.Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, et al. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. Journal of bacteriology. 2000;182(11):3142-50.

Archive of SID

www.SID.ir