Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(122): 79-88

The Effect of Silybin Encapsulated in Nanoparticles on *oprM* Gene Expression in Drug Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*

Aref Mohammadipour[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, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Received: 30 Apr 2017, Accepted:20 Jul 2017

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic nosocomial pathogen that using several classes of antibiotics to treat has been led to the emergence of multiple drug resistance. One of the drug resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* is overexpression of mexXY-oprM efflux pump system. Silybin as main flavonolignan of silymarin extracted from Silybum marianum is a hepatoprotective agent that its anti-bacterial properties was studied, recently. In this study, the effect of combination of silybin and ciprofloxacin on *oprM* gene expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated.

Materials and Methods: In this study, seven ciprofloxacin resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were treated by ciprofloxacin (1/2MIC) only (control sample) and in the combination with silybin-encapsulated micelle (nanoparticles) (test sample). After 24h, RNA extraction and cDNA synthesis were performed in silybin treated and un-treated cells and *oprM* gene expression was quantitatively investigated by realtime PCR method.

Results: Results of this study showed that a silybin encapsulated in nanoparticles (400µg/ml) induces death up to 50% in resistant isolates treated by ciprofloxacin (1/2MIC) during 24h. Also, quantitative Real-Time PCR analysis revealed that silybin encapsulated in nanoparticles decreases the expression of *oprM* gene compared to silybin untreated cells.

Conclusion: It seems that Decrease of *oprM* expression in resistant isolates lead to decrease of mexAB-oprM and mexXY-oprM in cell surface, subsequently decrease of antibiotic withdrawal to extracellular environment and increase of sensitivity to antibiotics.

Keywords: Ciprofloxacin, Nanoparticles, oprM, Pseudomonas aeruginosa, Quantitative Real-Time PCR, Silybin.

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

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۰، شماره ۵ (شماره پیاپی ۱۲۲)، مرداد ۱۳۹۵، ۸۸-۷۹

اثر سیلیبین انکپسوله در نانوذرات بر بیان ژن *oprM* در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو

عارف محمدی پور[۱]، نجمه رنجی[۲*]، لیلا اسدپور[۲]

۱.دانشجوی کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲.استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی است که با استفاده از چندین گروه از آنتی بیوتیک‌ها در درمان باعث ظهور مقاومت چند دارویی شده است. یکی از مکانیسم‌های مقاومت دارویی در سودوموناس آئروژینوزا ،افزایش بیان سیستم افلاکس پمپ MexXY-oprM می‌باشد. سیلیبین به عنوان فلاونولیگنان اصلی سیلیمارین مستخرج از خارمریم، یک محافظت‌کننده کبدی است که اخیراً اثرات ضد باکتریایی آن مطالعه شده است. در این مطالعه، اثر ترکیب سیلیبین و سیپروفلوکساسین بر بیان ژن oprM در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، هفت جدایه سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسین تحت تیمار با سیپروفلوکساسین(1/2MIC) به تنهایی(نمونه کنترل) و در ترکیب با سیلیبین انکپسوله در میسل(نانوذرات) (نمونه تست) قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با سیلیبین صورت گرفت و بیان ژن *oprM* به روشReal-time PCR به صورت کمی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که سیلیبین انکپسوله در نانوذرات (۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در طول ۲۴ ساعت، مرگ را تا ۵۰ درصد در جدایه‌های مقاوم تحت تیمار با سیپروفلوکساسین القاء می‌کند. هم‌چنین آنالیزReal-time PCR کمی آشکار کرد که سیلیبین انکپسوله در نانوذرات، بیان ژن *oprM* را در مقایسه با سلول‌های بدون تیمار با سیلیبین کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد کاهش بیان *oprM* در جدایه‌های مقاوم منجر به کاهش mexAB-oprM و mexXY-oprMدر سطح سلول، متعاقباً کاهش خروج دارو به محیط خارج سلولی و افزایش حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها می‌شود.

واژگان کلیدی: سیپروفلوکساسین، نانوذرات، سودوموناس آئروژینوزا، Real-time PCR کمی ،*oprM* ، سیلیبین

***نویسنده مسئول:** ایران، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی

Email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی و از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی است که موجب عفونت‌های مختلفی چون عفونت‌های ادراری، پنومونی مزمن در بیماران سیستیک فیبروزیس و عفونت‌های حاصل از سوختگی با مقاومت آنتی بیوتیکی می‌گردد(۱). حدود ۳۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری است(۱، ۲). که به علت مقاومت ذاتی و اکتسابی سودوموناس آئروژینوزا ایجاد می‌شود(۳). از جمله مهم‌ترین سیستم‌های خروج دارو از سلول، پمپ افلاکس mexAB-oprM و mexXY-oprM هستند(۴). پمپ‌های افلاکس در پمپاژ آنتی بیوتیک‌هایی چون فلوروکوئینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدازها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل به خارج سلول نقش دارد(۵-۷) .این پمپ‌ها مانع دسترسی دارو به سلول هدف می‌شوند. افلاکس پمپ‌ها می‌توانند در طول درمان با بیان بیش از اندازه باعث ایجاد شکست درمانی با آنتی بیوتیک شوند و اگر از مهار کننده‌های مناسب استفاده شود می‌تواند سبب اختلال در عملکرد این پمپ‌ها شود(۳).

امروزه توجه محققان برای درمان عفونت‌های باکتریایی و قارچی مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، به گیاهان دارویی جلب شده است(۸). گیاه خارمریم با نام علمی (*Silybum marianum*) از خانواده کاسنی به عنوان محافظت کننده کبدی از قدیم الایام شناخته شده است. دانه‌های این گیاه حاوی ترکیبات فلاونولیگنانی هستند که اصطلاحاً سیلیمارین نامیده می‌شود و شامل سیلی بین، ایزوسیلی بین، سیلی کریستین و سیلی دیانین می‌باشند. اخیراً اثرات ضد باکتریایی(۹) و ضدسرطانی سیلی مارین و سیلیبین گزارش شده و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در درمان بیماری‌های مختلف از آن استفاده شده است(۱۰). با توجه به افزایش روز افزون مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در عفونت‌های بیمارستانی لازم است تدابیر ویژه‌ای برای درمان این گروه از بیماری‌ها اندیشیده شود. داروهای گیاهی به خاطر نداشتن عوارض جانبی طی سالیان طولانی مصرف، می‌تواند آنها را به عنوان مکمل یا جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی معرفی کند. سیلیبین به عنوان بخش فعال سیلیمارین در حلال‌های آلی نظیر دی متیل سولفوکساید(DMSO)، و اتانول حل می‌شود (۱۱، ۱۲) اما در آب حلالیت کم دارد. از جمله ناقلین مناسب برای رهایش بهتر سیلیبین به درون سلول‌ها ناقلین کوپلیمیری با ساختار کروی (نانوذرات میسلی نسل ۰۴۰۰) می‌باشد که در تحقیقات گذشته‌ی این گروه جهت انتقال ژن به درون سلول‌های یوکاریوتی به صورت *in vivo* و *in vitro* مورد استفاده قرار گرفته است و خصوصیاتی چون پایداری در شرایط محیط، عدم سمیت و زیست تخریب پذیری را برخوردار می‌باشد. در مطالعه با میکروسکوپ اتمی (Atomic Force Microscopy) نشان داده شده که این ناقلین ، نانوذراتی با ابعاد ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند(۱۳) و بررسی‌های سمیت نشان دهنده‌ی برتری آن‌ها نسبت به ناقلین لیپوفکتامین می‌باشد(۱۴). در این مطالعه با استفاده از نانوذرات میسلی، جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین تحت تیمار با سیلیبین قرار گرفت و بیان ژن *oprM* به عنوان یکی از اجزای کمپلکس افلاکس پمپ، در سلول‌های تیمار شده با این دارو و سیپروفلوکساسین نسبت به سلول‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین به تنهایی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تعیین هویت سودوموناس آئروژینوزا

۶۷ جدایه سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های سطح استان گیلان (بیمارستان ولایت، قائم و رازی و آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان، آزمایشگاه‌های رازی، آشتیانی) جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط مولرهینتون آگار (شرکت Quelab،کانادا) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس شناسایی باکتری براساس مورفولوژی کلنی، تشکیل رنگدانه سبز رنگ، مثبت بودن تست اکسیداز، مشاهده میکروسکوپی،

عدم تخمیر قندها ،تجزیه اوره، استفاده از منبع کربن در محیط سیتریماید (شرکت Quelab،کانادا) و رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد بر روی آگار مغذی انجام گرفت. و تعداد ۶۹ سویه به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شدند(۸).

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک

مقاومت آنتی بیوتیکی با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق انتشار دیسک (Disk diffusion) و طبق استاندارد CLSI 2013 به صورت زیر انجام گرفت(۹). آزمایش ضدمیکروبی توسط روش انتشار دیسک بر روی محیط مولر هینتون آگار(MHA) شرکت Qlab کشت داده شد. دیسک سیپروفلوکساسین(۵ µg) (شرکت HiMedia، هند) بر روی محیط مورد نظر قرار داده شد. بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، فعالیت ضدمیکروبی ازطریق اندازه‌گیری هاله ممانعت از رشد اطراف هر دیسک تعیین گردید.

تعیین حداقل میزان مهارکنندگی آنتی بیوتیک

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC، Minimum Inhibitory Concentration) از آنتی بیوتیک تزریقی سیپروفلوکساسین (200mg/20ml) (شرکت روناک دارو، تهران) به روش براث دایلویشن استفاده شد. به این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (با غلظت معادل نیم مک فارلند^{8}۱۰×۱/۵) تهیه و به همراه رقت‌های متوالی سیپروفلوکساسین (در محدوده غلظت mg/ml ۱- ۲۰۴۸) در لوله شیشه‌ای استریل قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت میزان MIC تعیین گردید.

تهیه سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی

در این تحقیق نانو ذرات میسلی (ترکیب اولئیک اسید و پلی اتیلن گلایکول در ابعاد نانو) توسط گروه تحقیقاتی دکتر فرهود نجفی و دکتر مجید صادقی زاده تهیه شده و ازنظر آزمایش‌های استاندارد بررسی گردید(۱۵). سپس پودر سیلیبین (Sigma aldrich، آلمان) و نانومیسل با نسبت ۱ به ۶ مخلوط و در magnetic stirrer در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. بعد از انکپسوله شدن سیلیبین در نانومیسل، محلول حاصل از فیلتر ۰/۲۲ نانومتر عبور داده شد.

تیمار جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی

برای انتخاب بهترین و مناسب‌ترین غلظت سیلیبین، غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی به همراه غلظت 1/2MICای سیپروفلوکساسین (که قدرت مهار رشد باکتری را نداشت) بر جدایه‌های مقاوم در میکروپلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تأثیر داده شد. علت استفاده از غلظت 1/2MICای سیپروفلوکساسین این بود که غلظت معادل MICای دارو اثر مهار کنندگی کامل رشد باکتری داشته و برای مهار رشد حداکثر ۵۰ درصدی باکتری‌ها لازم بود از یک غلظت پایین‌تر از MIC (1/2MIC) استفاده شود. برای تأیید کشندگی حداکثر ۵۰ درصد باکتری‌ها توسط سیلیبین، مقدار ۲۰ µl/ml از تیمار هر چاهک به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل و کشت داده شد. نتایج بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نمونه‌های تیمار شده با سیلیبین در مقایسه با جدایه‌های تیمار نشده با این دارو (تیمار شده با سیپوفلوکساسین به تنهایی)، بررسی گردید.

استخراج RNA

بعد از تعیین بهترین غلظت کشندگی سیلیبین (در ترکیب با سیپروفلوکساسین با غلظت 1/2 MIC) که توان کشندگی ۵۰ درصد سلول‌ها را داشت، از باکتری‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین (1/2 MIC) و نانو ذرات میسلی حاوی سیلیبین (نمونه تست) و باکتری‌های تیمار نشده با سیلیبین (تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (1/2 MIC) (نمونه کنترل)) به کمک کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما، ایران) استخراج RNA

صورت گرفت. برای تعیین غلظت RNAی استخراج شده از نانودراپ 2000c (آمریکا) استفاده شد.

سنتز cDNA و بررسی بیان ژن *oprM* به روش Real-time PCR کمی

در این مطالعه جهت سنتز cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) استفاده شد. به این منظور RNA ، اولیگوdT و آب RNase free با هم مخلوط شده، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار داده شد. سپس آنزیم و دیگر اجزای واکنش به مخلوط اضافه شده و در دمای ۴۲°C (برای انجام واکنش) به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۷۰°C به مدت ۱۰دقیقه (برای غیرفعال‌سازی آنزیم RT) در دستگاه ترموسایکلر Analaytik Jena قرار داده شد. در ادامه تفاوت سطح بیان ژن *oprM*، 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) بررسی شد. واکنش در دستگاه Rotor Gene Q (USA) طبق برنامه زیر انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. پرایمرهای مورد استفاده توسط شرکت Bioneer کره جنوبی سنتز گردید(جدول ۱). آنالیز بیان ژن در نمونه‌های تیمار شده 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	رفرنس
oprM	F	5'- GATCCCCGACTACCAGCGCCCCG -3'		
oprM	R	5'- ATGCGGTACTGCGCCCGGAAGGC -3'	228 bp	(۱۶)
Rpsl	F	5'- GCTGCAAAACTGCCCGCAAC-3'		
Rpsl	R	5'- CCCGAGGTGTCCAGCGAACC-3'	249bp	این مطالعه

آزمون آماری

نتایج بیان ژن به صورت میانگین$\pm SD$ نشان داده شده است. از آزمون t-test برای مقایسه اختلاف بین دو گروه استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی میزان مقاومت جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا

در این مطالعه ۶۷ جدایه سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شد. نتایج انتشار از دیسک و MIC به ترتیب نشان داد که ۲۱ مورد (۳۱ ٪~) و ۲۹ مورد (۴۳ ٪~) جدایه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (جدول۲).

جدول ۲. قطر هاله عدم رشد و تعیین MIC در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا بر اساس روش رفرانس CLSI

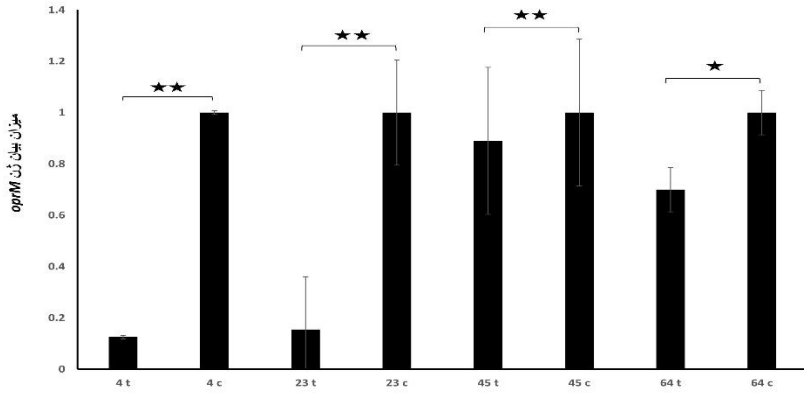
سیپروفلوکساسین	قطر هاله (mm)			تعداد جدایه ها (درصد)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
انتشار از دیسک	≥۲۱	۲۰-۱۶	≤۱۵	٪۶۵/۶۷ (۴۴)	٪۲/۹۸ (۲)	٪۳۱/۳۴ (۲۱)
MIC	≤۱	۲	≥۴	٪۵۲/۲۳ (۳۵)	٪ ۴/۴۷ (۳)	٪۴۳/۲۸ (۲۹)

تیمار جدایه ها با سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی و سیپروفلوکساسین

بهترین غلظت کشندگی ۵۰ درصدی سلول‌ها توسط سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی در ترکیب با غلظت 1/2MIC سیپروفلوکساسین، µg/ml ۴۰۰ بعد از ۲۴ ساعت در ۷ جدایه تعیین شد. بهترین غلظت در این گروه از آزمایش‌ها، غلظتی است که توان کشندگی حدود ۵۰ درصد سلول‌ها را داشته باشد تا با مابقی سلول‌ها که زنده مانده‌اند بتوان مطالعات مولکولی را به‌پیش برد. برای تأیید کشندگی ۵۰ درصدی از تست MBC استفاده شد که در همه جدایه های تحت تیمار غلظت µg/ml ۴۰۰ سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی توانست باعث کاهش رشد جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین شود. در حالی که در جدایه‌های مقاوم تحت تیمار با سیپروفلوکساسین (1/2MIC) به تنهایی، عدم رشد مشاهده نشد.

کاهش بیان ژن *oprM* بعد از تیمار جدایه‌ها با سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی

برای مقایسه تأثیر سیلیبین بر بیان ژن *oprM* ، بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن به صورت کمی در ۴ جدایه دو گروه سلولی تیمار شده با سیپروفلوکساسین(1/2MIC) به تنهایی و در ترکیب با غلظت مناسب سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی (µg/ml ۴۰۰) بررسی شد. میزان بیان ژن *oprM* در هر ۴ جدایه تیمار شده با سیلیبین انکپسوله در نانوذرات نسبت به جدایه‌های کنترل کاهش نشان داد (نمودار ۱).



نمودار ۱.میزان بیان ژن *oprM* در نمونه‌های۴، ۲۳، ۴۵ و ۶۴ تحت تیمار با سیپروفلوکساسین و نانو ذرات حاوی سیلیبین(t) در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی (c). از ژن *Rpsl* برای نرمال‌سازی نتایج استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± *SD* ارائه شده است. تفاوت معنی دار بین نتایج تست و کنترل به صورت$P<0.05$* و $P<0.01$ و $P<0.001$*** نشان داده شده است.**

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی است که قابلیت کسب مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها را به طور ذاتی و اکتسابی دارد(۱۷). فلوروکوئینولون‌ها یک کلاس مهم از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری هستند(۱۸) که به علت مصرف بی رویه آن‌ها در درمان، مقاومت به آن‌ها در حال افزایش است(۱۹). با توجه به این‌که این باکتری فرصت‌طلب باعث مشکلات عدیده‌ای در افراد با نقص سیستم ایمنی نظیر سوختگی‌های شدید، سرطان‌ها و سیستیک فایبروزیز می‌شود(۴)، لازم است راهکارهای مناسبی جهت درمان این گروه از عفونت‌ها در مراکز درمانی اندیشیده و به کار برده شود. امروزه مطالعه درزمینه‌ی مقاومت باکتری‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک یکی از موضوعات مهم در تحقیقات پزشکی –درمانی محسوب می‌شود. افزایش مقاومت‌های دارویی، باعث شده محققان به دنبال داروهای گیاهی جایگزین یا مکمل اثر آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار رشد این عوامل بیماری‌زا باشند. در مطالعه Karaman و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر سینرژیک کورکومین (ترکیب فعال گیاه زردچوبه) با ایمی پنم و توبرامایسین بر مهار تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا گزارش گردید(۲۰). در مطالعه Radji و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات ضدمیکروبی عصاره چای سبز (Camellia sinensis) بر جدایه‌های کلینیکی مقاوم به داروی استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شد(۲۱). در سال ۲۰۰۸ در مطالعه Al-Rubiay و همکاران اثرات ضدباکتریایی گیاه حنا بر روی جندین گونه باکتریایی از جمله سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شد(۲۲). در مطالعه کاظمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ با تأثیر عصاره گیاه بابونه (*Chamaemelum nobile*) بر جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در شیراز، اثرات ضد باکتریایی این گیاه گزارش شد(۲۳). در مطالعه سیدعلی پور و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاه *Ballota platyloma* بر چندین گونه باکتریایی بررسی بیش‌ترین تأثیر آن بر استافیلوکوکوس اورئوس و کم‌ترین میزان تاثیر آن بر سودوموناس مشاهده گردید(۲۴). در مطالعه‌ی حاضر نیز اثر مهاری سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی در ترکیب با سیپروفلوکساسین در جدایه‌های کلینیکی مقاوم به این آنتی‌بیوتیک نشان داده شد.

در مطالعه Lee و همکارن در سال ۲۰۰۳ اثرات ضدباکتریایی سیلیبین بر چندین گونه باکتریایی از جمله E.coli بررسی شد(۲۵). هم‌چنین در مطالعه Jung و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر ضدباکتریایی سیلیبین به صورت سینرژیک با N',N دی سیکلوهگزیل کربودیماید (DCCD) در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد(۲۶). هم‌چنین در مطالعه Lee و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر ضدباکتریایی سیلیبین به صورت سینرژیک با آمپی سیلین و جنتامایسین در جدایه‌های استاندارد حساس باکتری‌های دهانی گزارش شد(۹). در مطالعه حاضر استفاده همزمان از سیلیبین و سیپروفلوکساسین باعث افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم به این دارو گردید. با توجه به اینکه سیپروفلوکساسین (با غلظت 1/2 MIC) به تنهایی قادر به مهار رشد جدایه‌های مورد مطالعه نبود و در ترکیب با سیلیبین تأثیر همان غلظت سیپروفلوکساسین بر مهار رشد جدایه‌ها افزایش یافت، فرض شد که سیلیبین از طریق کاهش پمپاژ سیپروفلوکساسین به خارج سلول باعث افزایش اثربخشی آن بر جدایه‌های مقاوم شده است. در مطالعه Lianes و همکاران در سال ۲۰۰۴بر روی ۱۲ جدایه کلینیکی مقاوم به داروی سودوموناس آئروژینوزا افزایش بیان ژنهای پمپ افلاکس از جمله *oprM* در چندین جدایه به روش Real time-PCR تأیید گردید(۲۷). هم‌چنین در مطالعه Pourakbari و همکاران در سال ۲۰۱۶ در چندین جدایه کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا در ایران افزایش بیان ژن‌های oprM، mexA و mexB مشاهده شد(۲۸). در مطالعه Laohavaleeson و همکاران در سال ۲۰۰۸ افزایش بیان سیستم افلاکس MexXY-OprM را در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی گزارش شد(۲۹). بنابراین انتظار می‌رود در بعضی از جدایه‌های مقاوم به دارو افزایش بیان ژن‌های سیستم افلاکس پمپ رخ دهد. در این مطالعه برای اولین بار از نانورذرات

میسلی حاوی سیلیبین جهت بررسی اثر کشندگی بر جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد و غلظت مناسب کشندگی ۵۰ درصدی جدایه‌ها ، ۴۰۰ $\mu g/ml$ تعیین شد که به همراه آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین باعث کاهش بیان ژن *oprM* در۴ جدایه شد. در مطالعه Negi و همکاران در سال ۲۰۱۴ مشخص شد که کورکومین به عنوان یک ترکیب گیاهی مستخرج از زردچوبه قادر به کاهش MIC ی سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم بود. در این مطالعه اثر یک مهار کننده پمپ‌های افلاکس(EPI) به نام فنیل آلانین آرژنیل بتا نفتیل آمید (PAβN) به همراه کورکومین بر روی جدایه‌های مقاوم به دارو بررسی شد و مشخص شد که کورکومین نیز قادر است اثر مشابه با این دارو داشته باشد و از این لحاظ کورکومین به عنوان یک مهار کننده پمپ‌های افلاکس در سودوموناس آئروژینوزا عمل می‌کند(۳۰). در مطالعه Lomovskaya و همکاران در سال ۲۰۰۱ یک مهار کننده پمپ افلاکس به نام MC-207,110 در جدایه‌های مقاوم به لووفلوکساسین باعث کاهش بیان ژن‌های سیستم افلاکس پمپ و در نتیجه افزایش ۶۴ برابری حساسیت به لووفلوکساسین شد(۳۱). مهار کننده‌های پمپ‌های افلاکس(EPI) قادر به کاهش میزان خروج سوبستراهای پمپ افلاکس از سلول هستند. در مطالعه Ohene-Agyei و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی چندین ترکیب گیاهی چون Plumbagin (از گیاه Plumbago indica)و mangiferin (یکی از ترکیبات انبه) تأثیر آن ها به عنوان EPI در E.coli مشخص شد(۳۲). بر اساس مطالعات پیشین و نتایج مطالعه حاضر قابل تصور است که یکی از مکانیسم‌های فعالیت ضدباکتریایی سیلیبین از طریق کاهش بیان ژن *oprM* و در نتیجه کاهش تعداد پمپ‌های افلاکس فعال در سطح سلول باشد. به طوری که کاهش سطح این افلاکس پمپ در کاهش خروج آنتی‌بیوتیک از سلول نقش داشته و به این ترتیب باعث شود غلظت پایین‌تری از آنتی‌بیوتیک قادر به کشندگی سلول باشد. از سوی دیگر با توجه به این‌که سیلیبین یک ترکیب غیر قابل حل در آب بوده و حلال‌های آلی اثر کشندگی بر سلول‌ها دارند، لذا جهت کاهش عوارض این حلال‌ها، از نانوذرات میسلی در این مطالعه استفاده شد که باعث افزایش حلالیت سیلیبین در آب و محیط‌های زیستی می‌شود. استفاده از نانوذرات با ابعاد ۱۰ ۱۰۰ نانومتر باعث افزایش کارآیی دارو حین رسانش به سلول و در نتیجه افزایش اثربخشی آن بر سلول می‌شود. به طوری که غلظت پایین‌تری از سیلیبین در زمان کم‌تر قادر به کشندگی باکتری خواهد بود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که سیلیبین انکپسوله در نانوذرات میسلی قادر است اثر کشندگی سیپروفلوکساسین را در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به این دارو افزایش دهد. مکانیسم عمل سیلیبین در افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین، از طریق کاهش بیان ژن‌های دخیل در پمپ افلاکس ازجمله oprM و درنتیجه کاهش خروج سیپروفلوکساسین از سلول و محبوس شدن غلظت بیشتری از آنتی‌بیوتیک در سلول است.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی می‌باشد .نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به خاطر همکاری، نهایت تشکر را دارند. هم‌چنین از جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده، جناب آقای دکتر فرهود نجفی و جناب آقای دکتر علی ناظمی کمال تشکر را داریم.

منابع

1.Jones RN, Stilwell MG, Rhomberg PR, Sader HS. Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2007). Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009;65:4-331(3). Epub 2009/10/14.

2.Gailiene G, Pavilonis A, Kareiviene V. The peculiarities of Pseudomonas aeruginosa resistance to antibiotics and prevalence of serogroups. Medicina. 2007;43(1):36-42. Epub 2007/02/14.

3.Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2003;51(1):9-11. Epub 2002/12/21.

4.Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of mexZ gene in ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates in Guilan province. URMIA MEDICAL JOURNAL. 2017;27(10):902-13.

5.Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa. Frontiers in microbiology. 2012;3:408. Epub 2012/12/13.

6.Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al. Pseudomonas aeruginosa may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(10):3531-6. Epub 2007/08/08.

7.Pan YP, Xu YH, Wang ZX ,Fang YP, Shen JL. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. Archives of microbiology. 2016;198(6):565-71. Epub 2016/04/10.

8.Golpour H, Ranji N, Sharami SH. Investigation of Antifungal effect of curcumin encapsulated in micelle nanoparticles on the expression of CDR1 gene in fluconazole resistant isolates of Candida albicans. Journal of Microbial World. 2017.–:

9.Lee YS, Jang KA, Cha JD. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. Journal of biomedicine & biotechnology. 2012;2012:618081. Epub 2011/09/24.

10.Zadeh MM, Ranji N, Motamed N. Deregulation of miR-21 and miR-155 and their putative targets after silibinin treatment in T47D breast cancer cells. Iranian journal of basic medical sciences. 2015;18(12):1209-14. Epub 2016/02/16.

11.Ebert B, Seidel A, Lampen A. Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2007;96(2):227-36. Epub 2006/11/02.

12.Tan JM, Karthivashan G, Gani SA, Fakurazi S, Hussein MZ. In vitro drug release characteristic and cytotoxic activity of silibinin-loaded single walled carbon nanotubes functionalized with biocompatible polymers. Chemistry Central journal. 2016;10:81. Epub 2016/12/29.

13.Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, et al. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. Progress in Biological Sciences. 2015;5(2):143-58.

14.Ranji n. Padeganeh A, Sadeghizadeh D, Sadeghizadeh M. 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.

15.Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, et al. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. International journal of nanomedicine. 2014;9:403-17. Epub 2014/02/18.

16.Dumas JL, van Delden C, Perron K, Kohler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in Pseudomonas aeruginosa by quantitative real-time-PCR. FEMS microbiology letters. 2006;254(2):217-2 ۵

Epub 2006/02/01.

17.Rahnamay Roodposhti F, Ranji N, Asadpour L. Mutations of GyrA Gene in Fluoroquinolone Resistant Isolates of Pseudomonas aeruginosa in Guilan Province. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2016;26(139):84-92.

18.Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: epidemiology and treatment options. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2005;25(10):1353-64.

19.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.

20.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. Epub 2013/02/09. Pseudomonas aeruginosa Suslarinda Imipenem, Tobramisin ve Curcuminin Biyofilm Olusumu Uzerine Etkisi.

21.Radji M, Agustama RA, Elya B, Tjampakasari CR. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa .Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2013;3(8):663-7; discussion 6. Epub 2013/08/02.

22.Al-Rubiay KK, Jaber NN, Al-Mhaawe BH, Alrubaiy LK. Antimicrobial efficacy of henna extracts. Oman medical journal. 2008;23(4):253-6. Epub 2008/10/01.

23.Kazemian H, Ghafourian S, Heidari H, Amiri P, Yamchi JK, Shavalipour A, et al. Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of Chamaemelum nobile against Pseudomonas aeruginosa. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 201 6-432(4)48:5 .Epub 2015/08/28.

24.Seyedalipour B, Hasani A, Ebrahimzadeh MA, Mohseni M. Identification of the Chemical Composition of Essential Oil and Evaluation of Antibacterial Activity of Methanolic Extracts from the Aerial Parts of Ballota Platyloma Rech. f. Arak Medical University Journal. 2016;18(11):34-43.

25.Lee DG, Kim HK, Park Y, Park SC, Woo ER, Jeong HG, et al. Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from Silybum marianum. Archives of pharmacal research. 2003;26(8):59- 600-7Epub 2003/09/12.

26.Jung HJ, Lee DG. Synergistic antibacterial effect between silybin and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide in clinical Pseudomonas aeruginosa isolates. Journal of microbiology. 2008;46(4):462-7. Epub 2008/09/02.

27.Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of Pseudomonas aeruginosa overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(5):1797-802. Epub 2004/04/24.

28.Pourakbari B ,Yaslianifard S, Yaslianifard S, Mahmoudi S, Keshavarz-Valian S, Mamishi S. Evaluation of efflux pumps gene expression in resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in an Iranian referral hospital. Iranian journal of microbiology. 2016;8(4):249-56. Epub 20118/07/02.

29.Laohavaleeson S, Lolans K, Quinn JP, Kuti JL, Nicolau DP. Expression of the MexXY-OprM efflux system in Pseudomonas aeruginosa with discordant cefepime/ceftazidime susceptibility profiles. Infection and drug resistance. 2008;1:51-5. Epub 2008.۰۱/۰۱/

30.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. Epub 2. 06/12/014

31.Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(1):105-16. Epub 2000/12/20.

32.Ohene-Agyei T, Mowla R, Rahman T, Venter H. Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. MicrobiologyOpen. 2014;3(6):885-96. Epub 2014/09/17.