مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره سوم (پیاپی ۳۶) پاییز ۱۳۹۷
صفحات ۲۷۷-۲۶۹

Original Article

تاثیر سیلیبین محبوس شده در نانوذرات میسلی بر بیان ژن *mexY* در جدایه های *سودوموناس آئروجینوسا* مقاوم به سیپروفلوکساسین

زهرا احمدی رودبارکی[۱]، نجمه رنجی*[۲]، عارف محمدی پور[۱]، زهرا قاسمی نژاد[۱]

[۱]کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، [۲] استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت.

چکیده

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروجینوسا* یکی از عفونت‌های اصلی بیمارستانی در بیماران با نقص ایمنی است. سیلیبین به عنوان یک داروی گیاهی اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی داشته و اخیرا مطالعات بیشتری بر روی عملکردهای ضدباکتریایی آن متمرکز شده است. هدف از این مطالعه بررسی ویژگی ضدباکتریایی سیلیبین از راه تاثیر بر بیان ژن *mexY* بر روی جدایه‌های *سودوموناس آئروجینوسای* مقاوم به سیپروفلوکساسین بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه شش جدایه *سودوموناس آئروجینوسا* مقاوم به سیپروفلوکساسین در تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی (۱/۲ MIC) (نمونه کنترل) و در ترکیب با سیلیبین محبوس در میسل (نانوذرات) قرار گرفت. ۲٤ ساعت پس از کشت در محیط مولرهینتون، آزمایش MBC انجام شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA ، بیان ژن *mexY* به صورت کمی در سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با سیلیبین بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ترکیب سیلیبین محبوس در میسل با سیپروفلوکساسین (۱/۲ MIC) پس از ۲٤ ساعت می تواند رشد باکتری را تا ۵۰٪ کاهش دهد. همچنین آنالیز qRT-PCR نشان داد که سیلیبین محبوس در میسل، بیان ژن *mexY* را کاهش می دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج ما پیشنهاد می کند که سیلیبین می تواند رشد باکتری را از طریق کاهش تعداد پمپ افلاکس mexXY-oprM در سطح سلول مهار کند.

واژگان کلیدی: سیپروفلوکساسین، نانوذرات، *سودوموناس آئروجینوسا*، سیلیبین، ژن *mexY*

دریافت مقاله: آبان ماه ۹٦ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹٦

مقدمه

سودوموناس آئروجینوسا (*Pseudomonas aeruginosa*) از مهم ترین عوامل بیماریزای فرصت طلب بیمارستانی بوده که موجب عفونت‌های ادراری، پنومونی مزمن در بیماران سیستیک فیبروزیس، عفونت چشم، عفونت گوش و عفونت‌های حاصل از سوختگی با مقاومت آنتی بیوتیکی می گردد (۱).

عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروجینوسا* اغلب به سختی درمان می شوند، که به دلیل وجود مقاومت ذاتی و اکتسابی در این باکتری می باشد، که به عوامل مختلفی مانند نفوذپذیری غشاء خارجی، بتالاکتاماز کروموزومی و مقاومت ذاتی ناشی از بیان پمپ‌های افلاکس چند دارویی وابسته است (۲).

از جمله مهم‌ترین پمپ‌های افلاکس موثر در مقاومت چند دارویی می توان به سیستم پمپ افلاکس mexXY–oprM اشاره نمود (۳) که در سویه‌های مقاوم به دارو در اثر جهش در ژن های تنظیمی چون *NfxB*، *MexR* و *MexZ* افزایش بیان

*) آدرس برای مکاتبه: رشت، پل تالشان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۱۳۳۳٤۲٤۰۸۰ پست الکترونیک: n_ranji@iaurasht.ac.ir

نشان می دهند (٤).

MexXY-OprM به عنوان یک پمپ افلاکس مهم از نظر کلینیکی (۳ و ۵) در بیرون راندن آنتی بیوتیک‌هایی چون فلوروکینولون‌ها، آمینوگلایکوزیدها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل به خارج سلول نقش دارد (۲، ٤ و ٦) و در سویه‌های مقاوم با افزایش تولید آن، میزان بیشتری از دارو به خارج از سلول رانده می شود.

مصرف بی رویه داروهای شیمیایی موجب افزایش سویه‌های میکروبی با مقاومت چند دارویی شده است. به همین دلیل محققان زیادی در زمینه شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های جدید به مطالعه گیاهان دارویی با عوارض جانبی کمتر رو آورده اند.

گیاه خارمریم با نام علمی (*Silybum marianum*) از خانواده کاسنی است که حاوی ترکیبات فلاونولیگنانی به نام سیلیمارین می باشد و از سیلیبین، ایزوسیلیبین، سیلیکریستین و سیلی دیانین تشکیل شده است. سیلیمارین اثرات ضدالتهابی و محافظت‌کنندگی کبد داشته و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی مورد استفاده قرار می گیرد (٦ و ۷). همچنین تأثیر سیلیبین در مطالعات مختلف در مهار سرطان‌های سینه، کولون، ریه، پروستات (۷)، مثانه و تخمدان مورد بررسی قرار گرفته و اثر القاکنندگی اپوپتوز توسط این ترکیب به اثبات رسیده است (۸). از سوی دیگر در چندین مطالعه مشاهده شده که این ترکیب باعث کشندگی سویه‌های استاندارد حساس به دارو می شود (۱۱-۹).

با توجه به اینکه حلالیت سیلبیین در آب کم بوده و حلال مناسب آن حلال‌های آلی چون DMSO (۱۲) و اتانول (۱۳) می باشد، در این مطالعه برای بررسی اثر ضدباکتریایی سیلیبین از نانوذرات میسلی به عنوان ناقل این ترکیب دارویی به درون سلول باکتری استفاده شد. با توجه به اینکه در جدایه‌های بالینی *سودوموناس آئروجینوسا* به ویژه در سوختگی‌ها مقاومت به سیپروفلوکساسین در حال افزایش است و مطالعات معدودی در این زمینه انجام شده است. در این پژوهش برای اولین بار تأثیر نانوذرات میسلی حاوی سیلیبین بر جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی شد. همچنین تأثیر این ترکیب بر بیان ژن *mexY* به عنوان یکی از اجزای کمپلکس پمپ افلاکس مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و تعیین هویت جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا: در سال‌های ۹۳ تا ۹۵ با مراجعه به بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های سطح استان گیلان (بیمارستان ولایت، قائم و رازی رشت، آزمایشگاه‌های مهر و رازی لاهیجان، آزمایشگاه‌های رازی و آشتیانی رشت) ٦۷ جدایه *سودوموناس آئروجینوسا* جمع آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط مولرهینتون آگار (Quelab، کانادا) کشت داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری گردیدند. سپس شناسایی باکتری براساس مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، تشکیل رنگدانه سبز رنگ، آزمون اکسیداز، رشد در استریمایدآگار (Quelab، کانادا) و رشد در دمای ٤٢ درجه سلسیوس انجام گرفت (١٤).

ب) حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک: به منظور تعیین الگوی حساسیت دارویی، حساسیت سیپروفلوکساسین (۵ µg) (شرکت HiMedia، هند) به روش استاندارد انتشار از دیسک و طبق معیار استاندارد CLSI انجام گرفت (۱۵). پس از ۱۸-٢٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری شد.

ج) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت مولر هینتون براث (شرکت Quelab، کانادا) برای رسیدن به ۰/۵ مک فارلند کشت داده شدند. سپس رقت‌های متوالی از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (روناک دارو، ایران) همراه با باکتری (با غلظت نیم مک فارلند) در محدوده غلظت µg/ml ۱-۲۰٤۸ در میکروپلیت ۹٦ خانه تهیه گردید و پس از ۱۸ساعت میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد (١٦).

د) سنتز سیلیبین محبوس شده در نانومیسل: در این تحقیق نانوذرات میسلی (ترکیب اولئیک اسید و پلی اتیلن‌گلایکول در ابعاد نانو) توسط گروه تحقیقاتی دکتر فرهود نجفی و دکتر مجید

صادقی زاده تهیه شد. به منظور ساخت این نانوذره، اولئویل کلراید و پلی اتیلن گلیکول در حضور تری اتیل آمین و کلروفرم به عنوان حلال در دمای ۲٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤ ساعت سنتز گردید. تری اتیلن آمین هیدروکلراید از فاز ارگانیک فیلتر شد. سپس کلروفرم در دمای ٤۰ درجه سلیسیوس تبخیر گردید. با استفاده از FTIR ساختار شیمیایی نانومیسل آنالیز گردید (۱۷). سپس نانومیسل و سیلیبین (سیگما، آلمان) در دمای بالا به مدت چند ساعت نگهداری و مخلوط شدند. به کمک روش های مختلف نظیر DLS و میکروسکوپ AFM اندازه نانوذرات و efficiency محبوس شدن سیلیبین در نانوذارت بررسی شد.

ه) تیمار جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با سیلیبین محبوس شده در نانوذرات میسلی: برای بررسی اثر ضدباکتریایی سیلیبین، از شش جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین با MIC های مختلف استفاده شد. به این منظور، ٤۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (با غلظت معادل نیم مک فارلند $۱/۵\times۱۰^{۸}$)، سیپروفلوکساسین با غلظت ۱/۲ MIC هر نمونه و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبین با غلظت های (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به چاهک های پلیت ۹٦ خانه اضافه و در گرمخانه ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شد. پس از ۲٤ ساعت به منظور تعیین حداقل غلظت باکتری کشی دارو (Minimum Bactericidal Concentration= MBC) ۲۰ میکرولیتر از هر چاهک به محیط مولر هینتون آگار منتقل و کشت گسترده داده شد و نتایج پس از ۲٤ ساعت بررسی گردید. هر تیمار دارویی حداقل دوبار تکرار گردید (۱۸).

و) استخراج RNA: پس از تعیین بهترین غلظت کشندگی سیلیبین (در ترکیب با سیپروفلوکساسین با غلظت ۱/۲ MIC) که توان کشندگی ۵۰ درصد سلولها را داشت، استخراج RNA از باکتری های تیمار شده با غلظت مؤثر سیپروفلوکساسین و نانو ذرات میسلی حاوی سیلیبین و باکتری های تیمار نشده با سیلیبین (تیمار با همان غلظت سیپروفلوکساسین به عنوان 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 (آمریکا) استفاده شد.

ز) سنتز cDNA و بررسی بیان ژن mexY به روش qRT-PCR به منظور سنتز cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) استفاده شد. به این منظور RNA (۱۰۰ng)، اولیگو dT (۵۰ µM) و آب DEPC به حجم نهایی ۱۳/۵ µl با هم مخلوط شده و در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس در دستگاه ترموسایکلر Analaytik Jena (آلمان) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس بافر 5x first-strand (٤ µl)، dNTPs (۱۰ µM)، RNasin (۲۰ U) و آنزیم M-MLV (۱ µl) به اجزای واکنش اضافه و به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سلیسیوس (برای انجام واکنش) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس (برای غیرفعالسازی آنزیم RT) در دستگاه ترموسایکلر Analaytik Jena (آلمان) قرار داده شد. برای انجام واکنش qRT-PCR، اجزای واکنش شامل SYBR Premix Ex Taq II (۲ µl)، رنگ ROX (۰/٤ µl)، آب استریل (۷ µl) از کیت SYBR Premix Ex (Tli RNase H Plus Taq II) (Takara، ژاپن)، cDNA (۱ µl) و هر پرایمر (۰/۸ µl) زیر هود لامینار کلاس II و در شرایط استریل در میکروتیوب‌های مخصوص مخلوط شدند. واکنش در دستگاه Rotor Gene Q (USA) طبق برنامه زیر انجام شد: یک مرحله واسرشت‌شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ٤۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ ثانیه و ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه. در این مطالعه از ژن *Rpsl* (Ribosomal Protein S12) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده بر اساس مطالعات قبلی و این مطالعه انتخاب و بعد از تأیید ضمنی به کمک نرم افزارGene Runner نسخه 5.1.33 و نرم افزار BLAST، 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.

ح) آزمون آماری: نتایج بیان ژن به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است. از آزمون *t*-test برای مقایسه اختلاف بین دو گروه استفاده شد.

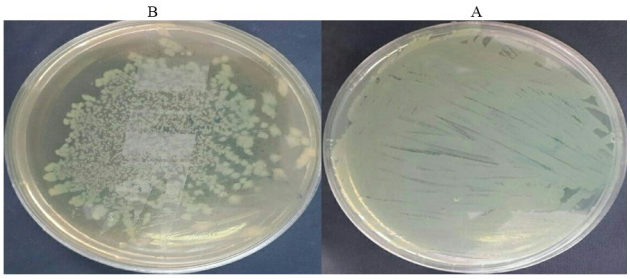
جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده.

نام ژن	شماره ثبت (accession No.)	توالی پرایمر	طول محصول PCR	منبع
***MexY*-F**	NP_250708.1	5'- CCGCTACAACGGCTATCCCT-3'	246 bp	(۱۹)
***MexY*-R**		5'- AGCGGGATCGACCAGCTTTC-3'		
***Rpsl*-F**	NC_002516.2	5'- GCTGCAAAACTGCCCGCAAC-3'	249bp	این مطالعه
***Rpsl*-R**		5'- CCCGAGGTGTCCAGCGAACC-3'		

یافته‌ها

در این مطالعه ٦٧ جدایه *سودوموناس آئروجینوسا* از بیمارستان ها و آزمایشگاه های رشت و لاهیجان جداسازی شد. نتایج انتشار از دیسک و بررسی MIC به ترتیب نشان داد که ۲۰ جدایه (۳۰٪~) و ۲٦ جدایه (۳۹٪~) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. در ادامه شش جدایه مقاوم به سیپروفلوکساسین با دامنه های مختلف MIC در تیمار با سیپروفلوکساسین و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبین قرار گرفتند. دلیل استفاده از این جدایه‌ها ارزیابی اثر مهاری سیلیبین بر جدایه ها با هر میزان از مقاومت دارویی (MIC) بود. نتایج نشان داد که غلظت ۱/۲MIC سیپروفلوکساسین (که موجب رشد باکتری می شد) در صورت ترکیب با نانوذرات (به صورت ذرات کروی در ابعاد ۱۰ تا ۲۵۰ نانومتر(۲۰) و وزن مولکولی ٦٨٣ دالتون) سیلیبین قادر به کاهش رشد باکتری مقاوم به دارو بود. اثر کشندگی سیپروفلوکساسین با غلظت ۱/۲MIC بر سویه‌های مقاوم در این مطالعه در تیمار با غلظت ٤٠٠ µg/ml نانوذرات میسلی حاوی سیلیبین به مدت ٢٤ ساعت افزایش یافت؛ به‌طوری که در مقایسه با نمونه تیمار شده با سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) که توان کشندگی نداشت، در نمونه های تیمار شده با سیپروفلوکساسین (۱/۲MIC) و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبین (٤٠٠ µg/ml) رشد کمتر از ۵۰٪ مشاهده گردید (شکل ۱).

به منظور بررسی بیان ژن و استخراج RNA، لازم بود نیمی از باکتری‌های در تیمار با سیپروفلوکساسین و نانوذرات میسلی حاوی سیلیبین زنده باشند. به همین دلیل غلظتی از دارو که توانایی کشتن نیمی از سلول‌ها را داشت به منظور ادامه کار انتخاب گردید. پس از تیمار نمونه ها با نانوذرات سیلیبین (٤٠٠ µg/ml) و سیپروفلوکساسین (۱/۲ MIC) بعد از استخراج

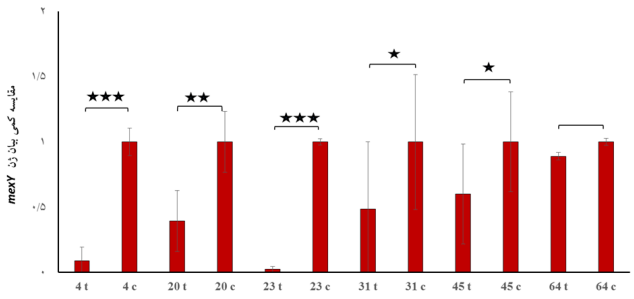


شکل ۱: تیمار دارویی *سودوموناس آئروجینوسا* با MIC ٦٤µg/ml. A: نمونه تیمارشده با سیپروفلوکساسین (۳۲ µg/ml) با رشد کامل در محیط کشت و B: نمونه تیمار شده با سیپروفلوکساسین (µg/ml ۳۲) و نانوذرات حاوی سیلیبین (٤٠٠ µg/ml) با کاهش رشد در محیط

RNA (با غلظت نهایی ۱۰۰ نانوگرم)، بررسی بیان ژن *mexY* نسبت به نمونه کنترل (درتیمار با غلظت ۱/۲MIC سیپروفلوکساسین) صورت گرفت. مطابق نمودار ۱ کاهش بیان *mexY* در همه نمونه‌های تیمارشده نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد.

بحث

امروزه باکتری‌های با مقاومت چند دارویی از مشکلات مهم



نمودار ۱: میزان بیان ژن *MexY* در نمونه های ٤، ۲۰، ۲۳، ۳۱، ٤٥ و ٦٤ تحت‌تیمار با سیپروفلوکساسین و نانوذرات حاوی سیلیبین (t) در مقایسه با نمونه های تحت تیمار با سیپروفلوکساسین به تنهایی (c). از ژن *Rpsl* برای نرمال سازی نتایج استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. تفاوت معنی‌دار بین نتایج آزمون و کنترل به صورت $^{*}P<0.05$ و $^{**}P<0.01$ و $^{***}P<0.001$ نشان داده شده است.

درمانی است. با وجود تولید داروهای جدید ضدباکتریایی، همچنان مقاومت به طیف گسترده ای از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث اختلال در درمان عفونت‌ها می شود. استفاده ناصحیح و خودسرانه آنتی بیوتیک‌ها باعث ایجاد سویه‌های با مقاومت چنددارویی و عدم اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌های نسل اول به خصوص در مراکز درمانی شده است. به طوریکه برای درمان این عفونت ها، آنتی‌بیوتیک‌های نسل دوم و سوم به کار گرفته شد که عوارض جانبی بیشتری نسبت به نسل اولی‌ها داشتند (۲۱). *سودوموناس آئروجینوسا* یک باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی است که عامل بسیاری از عفونت‌ها به خصوص در افراد با نقص سیستم ایمنی (پس از شیمی درمانی در سرطان)، افراد با از دست دادن لایه محافظ اپی‌تلیال (سوختگی‌های شدید)، سیستیک فیبروسیس و ایدز (HIV) می‌باشد (۲۲).

در این مطالعه ٦٧ سویه *سودوموناس آئروجینوسا* از چندین بیمارستان و آزمایشگاه در رشت و لاهیجان جداسازی شد که به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در این مطالعه اثر ضدباکتریایی ترکیب گیاهی سیلیبین به همراه آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین باعث کاهش بیان ژن *mexY* در جدایه‌های بالینی مقاوم به آن گردید. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها، فلوروکینولون‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌های رایج دردرمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروجینوسا* می باشند که بصورت روزافزون مقاومت به این داروها در *سودوموناس آئروجینوسا* در حال افزایش است.

در مطالعه رنجبر (Ranjbar) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در بیمارستان بقیه الله تهران، میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ٦٥٪ بود (۲۳). در مطالعه فاضلی (Fazeli) و همکاران در سال ۱۳۹۰ در اصفهان از بین ۹۸ جدایه *سودوموناس آئروجینوسا* ۳۳ جدایه به سیپروفلوکساسین (٣٤٪) مقاوم بودند (٢٤). در مطالعه میهنی (Mihani) و همکاران در سال ۱۳۸٦ سویه های جداشده از بیماران سوختگی در بیمارستان طالقانی اهواز به سیپروفلوکساسین ٦٧٪ مقاوم بودند (۲۵).

در مطالعه حاضر از ٦٧ جدایه *سودوموناس آئروجینوسا* ۳۹٪~ جدایه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. با توجه به نتایج این آزمایش و دیگر مطالعات مقاومت به سیپروفلوکساسین در نواحی مختلف ایران و جهان در حال افزایش است و لازم است به منظور جلوگیری از رشد سویه‌های مقاوم، راهکارهای درمانی نوین جایگزین شود.

مصرف سیلیمارین به عنوان یک گیاه دارویی، حتی با غلظت زیاد نیز به خوبی قابل تحمل است. تجویز روزانه سیلیبین با دوز mg/kg ۲۰۰ به موش صحرایی به طور معنی‌داری، موجب مهار مسمومیت کلیوی ناشی از تجویز سیسپلاتین شد. ترزیق وریدی سیلیمارین mg/kg ۵۰-۲۰ به کودکان مسموم شده به قارچ سمی هیچگونه عوارض جانبی ایجاد نکرد.

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۵ در مورد اثر ضدباکتریایی سیلیبین علیه جدایه‌های استاندارد *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*S. epidermidis*) گزارش شد. در مطالعه دیگر در جدایه‌های استاندارد و حساس به آنتی بیوتیک *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) و *کلبسیلا نمونیه* (*K. pneumoniae*)، خاصیت میکروب کشی سیلیبین با غلظت µg/ml ۲۹۰۰-۱۵۰۰ مشاهده شد. در حالی که در مطالعه حاضر اثر کشندگی سیلیبین با غلظت کمتر از غلظت مطالعه ابراهیم (Ibrahim) و همکاران، در جدایه‌های بالینی مقاوم به دارو بررسی شد و افزایش رسانش سیلیبین محبوس در نانوذرات میسلی به سلول نسبت به سیلیبین بدون ناقل (در مطالعه یاد شده) مشاهده شد.

بنابراین همانند اثر نانوذرات میسلی در رسانش بیشتر دارو به سلول‌های یوکاریوتی، در این مطالعه افزایش رسانش دارو به واسطه این ناقل به سلول‌های باکتریایی نیز تأیید گردید. از سوی دیگر در این مطالعه نشان داده شد که سیلیبین به همراه سیپروفلوکساسین قادر به کاهش رشد جدایه‌های *سودوموناس آئروجینوسا* مقاوم به همان غلظت سیپروفلوکساسین به تنهایی بود. این نتیجه می تواند تأثیر سیلیبین را بر مسیرهای مهار کننده فعالیت سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم نشان دهد. در مطالعات مختلف در جدایه‌های مقاوم به فلوروکینولون‌ها

افزایش بیان پمپ‌های افلاکس به ویژه mexXY-oprM مشاهده شده است (۵، ٦ و ٢٦).

در چندین مطالعه تأثیر ترکیبات گیاهی بر افزایش حساسیت به دارو در جدایه‌های مقاوم از طریق کاهش بیان پمپ‌های افلاکس نشان داده شده است. در مطالعه ریو (Riou) و همکاران در سال ۲۰۱٦ اثر مهاری یک ترکیب گیاهی به نام آیبرین بر روی باکتری *سودوموناس آئروجینوسا*، کاهش بیان ژن‌های خانواده Mex را نشان داد. در مطالعه نگی (Negi) و همکاران در سال ۲۰۱٤ بر روی ۳۰ جدایه *سودوموناس آئروجینوسا*، مشخص شد که کورکومین (ترکیب فعال زردچوبه) قادر به کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه همچون جنتامایسین و سیپروفلوکساسین در ۳۰٪ جدایه‌ها می باشد. در این مطالعه اثر یک مهار کننده پمپ‌های افلاکس 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 بر بعضی جدایه‌های مقاوم که PAβN اثر کاهش MIC نداشت مؤثرهستند و موجب مهار بیان پمپ‌های افلاکس می شود (۲۷). در مطالعه لوموسکایا (Lomovskaya) و همکاران در سال ۲۰۰۱ یک مهار کننده پمپ افلاکس به نام MC-207 ،110 در جدایه‌های حساس به لووفلوکساسین باعث افزایش ۸ برابری حساسیت به این دارو و در جدایه‌های مقاوم باعث افزایش ٦٤ برابری حساسیت به لووفلوکساسین شد (۲۸).

در مطالعه حاضر نیز کاهش بیان *mexY* در جدایه‌های در تیمار با سیلیبین باعث افزایش اثربخشی سیپروفلوکساین گردید که نشان دهنده تأثیر این ترکیب گیاهی در مهار رشد باکتری می باشد. بنابراین تصور بر این است که سیلیبین احتمالاً از راه کاهش بیان این سیستم پمپ‌های افلاکس ، موجب کاهش خروج سیپروفلوکساسین از سلول و محبوس شدن آن در سلول و افزایش اثربخشی این آنتی‌بیوتیک بر کشندگی باکتری شود.

نتیجه گیری

با توجه به افزایش مقاومت عفونت‌های بیمارستانی به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، لازم است راهکارهای مناسبی برای غلبه بر این مشکل بیمارستانی اندیشیده شود. در این مطالعه مشاهده شد که سیلیبین قادر به افزایش اثربخشی سیپروفلوکساسین در جدایه‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک بود. بنابراین به نظر می رسد این ترکیب گیاهی در آینده بتواند در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک ماده مؤثر مورد استفاده قرار گیرد و باعث کاهش مقاومت‌های دارویی در عوامل بیماری‌زا شود. همچنین استفاده از نانوذرات میسلی به عنوان ناقلین سازگار با بدن می تواند موجب رسانش بیشتر ترکیبات گیاهی از جمله سیلیبین به درون سلول‌های مختلف شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و ریاست محترم انجمن علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل تامین هزینه‌های طرح کمال تشکر و امتنان را دارند.

References

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). Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 65(3): 331-334.

2. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(1): 9-11.

3. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2012; 3: 408.

4. Ranji N, Rahbar Takrami S. Role of *mexZ* gene in ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Guilan province. J Urmia Univ Med Sci. 2017; 27(10): 902-913.

5. Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, Bajolet O, Marty N, Grattard F, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Husson M.O, Couetdic G, Plésiat P. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(10): 3531-3536.

6. Poole K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Curr Pharm Biotechnol. 2002; 3(2): 77-98.

7. Ting H, Deep G, Agarwal R. Molecular mechanisms of silibinin-mediated cancer chemoprevention with major emphasis on prostate cancer. AAPS J. 2013; 15(3): 707-716.

8. Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. Anticancer Res. 2006; 26(6B): 4457-4498.

9. Lee YS, Jang KA, Cha JD. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. J Biomed Biotechnol. 2012; 618081.

10. Jung HJ, Lee DG. Synergistic antibacterial effect between silybin and N, N'- dicyclohexyl carbodiimide in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Microbiol. 2008; 46(4): 462-467.

11. Lee DG, Kim HK, Park Y, Park SC, Woo ER, Jeong HG, Hahm KS. Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*. Arch Pharm Res. 2003; 26(8): 597-600.

12. 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. Toxicol Sci. 2007; 96(2): 227-236.

13. 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. Chem Cent J. 2016; 10: 81.

14. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, Quentin C. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2072-2078.

15. Cockerill F, Patel J, Alder J, Bradford P, Dudley M, Eliopoulos G, Hardy D, Heght D, Hindler J, Powell M, Swenson J, Thomson R, Traczewskey M, Turnidge J, Weinstein M, Zimmer B. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement; M100-S23: Clinical & Laboratory Standards Institute; 2013.

16. Lomholt JA, Kilian M. Ciprofloxacin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from keratitis. Br J Ophthalmol. 2003; 87(10): 1238-1240.

17. Tahmasebi Birgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, Najafi F, Babaei E. Dendrosomal curcumin nanoformulation down-regulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. Int J Nanomedicine. 2014; 9: 403-417.

18. 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 Chem. 2014; 148: 453-460.

19. Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H, Nishino T, Shimizu E.. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 2005; 243(1): 125-131.

20. Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, Nazem Sh, Farhangi B, Motahari P,Sadeghizadeh M. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. P Bio Sci. 2015; 5(2): 143-158.

21. Livermore DM, British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug D, Development. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(9): 1941-1944.

22. Moskowitz SM, Ernst RK. The role of *Pseudomonas* lipopolysaccharide in cystic fibrosis airway infection. Subcell Biochem. 2010; 53: 241-253.

23. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, Farshad Sh, Arjomandzadegan M. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Acta Med Iran. 2011; 49(10): 675-679.

24. Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16(10): e15722.

25. Mihani F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of bla_{IMP} and bla_{VIM} genes by PCR. Iran J Med Microbiol. 2007; 1(1): 23-31.

26. Geyik MF, Aldemir M, Hosoglu S, Tacyildiz HI. Epidemiology of burn unit infections in children. Am J Infect Control. 2003; 31(6): 342-346.

27. 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*. J Clin Diagn Res. 2014; 8(10): DC04-7.

28. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(1): 105-116.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 3, September 2018

Original Article

The effect of silybin-encapsulated micelle nanoparticles on *mexY* expression in ciprofloxacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Zahra Ahmadi Roudbaraki[1], Najmeh Ranji[2], Aref Mohammadipour[1], Zahra Ghasemnegad[1]

[1]M.Sc., Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is a major nosocomial infection in immunocompromised patients. Silybin as an herbal drug has anti-inflammatory and anti-cancer effects and recently further studies have been focused on its antibacterial functions. The aim of this study was to investigate the antibacterial effect of silybin on *mexY* gene expression in ciprofloxacin (CP)-resistant isolates of *P. aeruginosa*.

Materials & Methods: In this study, six ciprofloxacin- resistant isolates of *P. aeruginosa* were both treated by ciprofloxacin (1/2 MIC) only as a control sample and in combination with silybin-encapsulated micelles (nanoparticles) as the test sample. MBC test was performed 24 h after culture in Mueller-Hinton agar. After RNA extraction and cDNA synthesis, *mexY* expression was quantitatively investigated in silybin- treated and untreated cells.

Results: Our findings showed that a combined silybin-encapsulated micelles and ciprofloxacin (1/2 MIC) treatment reduces the bacterial growth up to 50% after 24h. Also Q-RT-PCR analysis revealed that silybin-encapsulated micelles decrease *mexY* expression.

Conclusion: Our results suggest that silybin could inhibit bacterial growth by decreasing mexXY-oprM efflux pump count on the cell surface.

Keywords: Ciprofloxacin, Nanoparticles, *Pseudomonas aeruginosa*, Silybin, *mexY* gene.

Correspondence to: Najmeh Ranji

Tel: +98 133424080

E-mail: n_ranji@iaurasht.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(3): 269-277.