

Quorum-Sensing Signaling System in *Pseudomonas aeruginosa*: A Method to Overcome the Bacteria's antibiotic Resistance By Identifying Dual Inhibitors and Using NSAIDs in Combination with Antibiotic Against Biofilm

Mohammad Besharati¹, Ali ZhianiAsgharzadeh², Vahid Soheili³, Bibi Sedigheh Fazli Bazzaz³,
Majid Rajabian Noghondar¹

1. Department of Biochemistry, Payam Noor University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Student Research Committee, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
3. Department of Food and Drug Control, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/04/22
Accepted: 2017/07/24
Available online: 2017/09/12

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(4): 01-12

Corresponding author:

Mohammad Besharati

Department of Biochemistry,
Payam Noor University of
Mashhad, Mashhad, Iran

Tel: 0989155113258

Email:

Besharat61@yahoo.com

Abstract

Background and Aims: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), are used as analgesic and antipyretic agents. In this study NSAIDs were used to overcome the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to Tobramycin antibiotics. The aim of this study was to find an easy and low-cost method, using NSAIDs and Tobramycin, to deal with the biofilms of *P. aeruginosa*.

Materials and Methods: Following molecular remodeling, NSAIDs were used alongside Tobramycin against PAO1 strain of *P. aeruginosa*. The Plate Reader measured the absorbance of crystal violet solution in ethanol. The Infiltration rate of NSAIDs in biofilms and its absorbance were measured by Tetrazolium salt and Plate Reader, respectively.

Results: After performing the docking techniques, the most suitable conformation of NSAIDs, to inhibit LasR and PqsE proteins, were chosen. Having worked on dual inhibitors, we could find a configuration in which the inhibition coefficient was at its lowest level for both PqsE and LasR. The findings showed a lower rate of biofilm formation by bacteria treated with NSAIDs and Tobramycin.

Conclusions: Based on the constructional similarities in some NSAIDs, like Piroxicam, Meloxicam and Homoserine lactones (AHLs), these drugs can be used as quorum-sensing system inhibitors to inhibit LasR and PqsE protein and hence reduce the *P. aeruginosa* pathogenesis.

KeyWords: *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Tobramycin, Docking, Quorum sensing, NSAIDs

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Besharati M, ZhianiAsgharzadeh A, Soheili V, Fazli Bazzaz BS, Rajabian Noghondar M. Quorum-Sensing Signaling System in *Pseudomonas aeruginosa*: A Method to Overcome the Bacteria's antibiotic Resistance By Identifying Dual Inhibitors and Using NSAIDs in Combination with Antibiotic Against Biofilm. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (4): 01-12



سیستم سیگنالینگ Quorum sensing در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* روشی برای غلبه بر مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری بوسیله یافتن مهارکنندگان دوگانه و استفاده همزمان از NSAIDs و آنتی بیوتیک علیه بیوفیلم

محمد بشارتی^۱، علی ژبانی اصغرزاده^۲، وحید سهیلی^۳، بی بی صدیقه فضلی بزاز^۳، مجید رجبیان نقندرا^۱

۱. گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد، مشهد، ایران

۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۳. گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) به دلیل خواص کاهش دهنده درد، تب و التهاب کاربرد دارند. در این مطالعه NSAIDs برای شکستن مقاومت باکتری به توبرامایسین به کار گرفته شدند. هدف این مطالعه، ارائه یک روش آسان و کم هزینه برای مقابله با بیوفیلم باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، با استفاده از NSAIDs و توبرامایسین می باشد.

مواد و روش کار: پس از انجام مدل سازی مولکولی، NSAIDs در کنار آنتی بیوتیک توبرامایسین برای باکتری *P. aeruginosa* سویه PAO1، استفاده شد. دستگاه Plate Reader جذب محلول کریستال ویوله در اتانول را اندازه گیری کرد. میزان نفوذ NSAIDs در بیوفیلم، توسط نمک تترازولیوم اندازه گیری و جذب آن نیز توسط دستگاه Plate Reader اندازه گیری شد.

یافته ها: پس از داکینگ، بهترین کونفورماسیون هرکدام از NSAIDs برای مهار پروتئین های LasR و PqsE انتخاب شد. با توجه به اینکه انجام کار روی مهارکننده دوگانه بود، توانستیم به شکلی دست پیدا کنیم، که ثابت مهار برای LasR و PqsE همزمان در پائین ترین حالت قرار گیرد. نتایج نشان داد که تشکیل بیوفیلم باکتری در مجاورت NSAID و آنتی بیوتیک توبرامایسین کمتر بود.

نتیجه گیری: با توجه به شباهت ساختمانی NSAID هایی مانند پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک با لاکتون های هموسرین N (AHLs) این داروها، با مهار پروتئین های LasR و PqsE می توانند به عنوان مهارکنندگان سیستم Quorum-sensing به کار روند و مانع از بیماری زایی باکتری گردند.

کلمات کلیدی: باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، بیوفیلم، توبرامایسین، داکینگ، کوئوروم سنسینگ، NSAIDs

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۲
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۲
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱
موضوع:
باکتری شناسی پزشکی
IJMM 1396; 11(4): 01-12
نویسنده مسئول:

محمد بشارتی
گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور
مشهد، مشهد، ایران
تلفن: ۰۹۸۹۱۵۵۱۱۳۲۵۸

پست الکترونیک:
Besharat61@yahoo.com

مقدمه

درصد بالایی از عفونت های انسانی ناشی از این حقیقت است، که میکروارگانیزم های موجود در بیوفیلم به از بین رفتن توسط عوامل ضد میکروبی مقاوم اند (۳). در نهایت شناخت بیوفیلم ها در عفونت های مزمن می تواند در انتخاب درمان مناسب به ما کمک نماید.

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) یک پاتوژن فرصت طلب است. این باکتری شایع ترین باکتری گرم منفی است

بیوفیلم ها زمانی که میکروارگانیزم ها گرد هم می آیند و به سطوح می چسبند، تشکیل می شوند (۱) و به عنوان عامل نگه دارنده تجمع میکروبی پیچیده روی سطوح جاندار و بی جان هستند. این اکوسیستم مینیاتوری محیط امنی برای اعضای این جامعه فراهم می آورد، و آن ها را از دسترس مکانیسم های دفاعی و پاسخ های سیستم ایمنی میزبان، فاگوسیتوز و درمان های آنتی بیوتیکی دورنگه می دارد (۲).

ویرولانس سودوموناس، تحت QS انجام می‌شود (۱۰). PqsE باینکه در تولید PQS نقشی ندارد، ولی نشان داده شده است، که بدون وجود این پروتئین یا مهار آن اصلاً این مسیر سیگنالینگ عمل نخواهد کرد، هرچند مکانیسم عملکرد آن مشخص نشده است (۴).

آمینواسیدی گفته شده، ایجادکننده خصوصیات بیولوژیکی پروتئین نیست. این خصوصیات از ساختار سه‌بعدی ناشی می‌شوند (۱۱). امروزه بخش قابل توجهی از بیوانفورماتیک به ابداع ابزار الکترونیکی برای یافتن رابطه بین توالی و ساختار سه‌بعدی اختصاص یافته است (این زمینه تخصصی، بیوانفورماتیک ساختاری نامیده می‌شود) (۱۱). توبرامایسین در آزمایشگاه، بسیاری از سویه‌های استافیلوکوک‌ها و کلی‌فرم‌ها و سایر باکتری‌های گرم منفی را مهار می‌کند. این آنتی‌بیوتیک تا حدودی طیف ضد باکتریایی جنتامایسین را با چند استثناء داراست (۱۲).

NSAIDs (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs) در گروه‌های مختلف شیمیایی طبقه‌بندی می‌شوند. این تنوع شیمیایی عامل ایجاد دامنه گسترده ویژگی‌های فارماکوکینتیک است (۱۳). با توجه به شباهت ساختمانی بین لیگاندها و مهارکنندگان پروتئین‌های LasR و PqsE با NSAIDs، در این مطالعه اثرات مهارکنندگی چند داروی گوناگون متعلق به دسته NSAIDs بر روی پروتئین‌های LasR و PqsE ابتدا به کمک نرم‌افزارها و مدل‌های کامپیوتری و پس از انتخاب داروهای با بهترین اثر مهارکنندگی بر روی هر دو پروتئین، در محیط آزمایشگاه بررسی گردید. امید است، که نتایج این پژوهش بتواند روش ارزان‌قیمت و قابل‌دسترسی در درمان بیماری‌های عفونی مرتبط با سویه‌های ایجادکننده بیوفیلیم *P.aeruginosa* به‌ویژه در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروز ایجاد نماید.

مواد و روش‌ها

مدل‌سازی مولکولی

در این مطالعه پژوهشی که از شهریور ۱۳۹۴ تا بهمن ۱۳۹۴ انجام شد، تمام محاسبات با چندین نرم‌افزار شامل ViewerLite 4.2 (available at <http://viewerlite.software.informer.com>) ChemBioOffice Ultra 8.0 (accessible at http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/) HyperChem 7.0 (presented at ChemBioOffice)

که در عفونت‌های بیمارستانی یافت می‌شود، و مسئول پنومونی، بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری، و عفونت‌های خونی، زخم‌های جراحی، التهاب حاد ملتحمه، اوتیت مدیای حاد، اندوکاردیت و درماتیت است (۴). عفونت ایجاد شده، توسط *P.aeruginosa* بیشتر شامل تولید بازه گسترده‌ای از فاکتورهای سمی مرتبط با سلول و عوامل خارج سلولی می‌باشد (۵). عوامل سمی خارج سلولی که توسط *P.aeruginosa* تولید می‌شوند، عبارت‌اند از: پیوسیانین، الاستاز، رامنولپیدها، آلکالین پروتئاز، لکتین‌ها، اگزوتوکسین A و HCN. تولید این فاکتورهای سمی تحت کنترل (QS) quorum-sensing می‌باشد (۶). *P.aeruginosa* همچنین قادر است، بر فشارهای ایجاد شده به‌وسیله آنتی‌بیوتیک‌های محدودکننده رشد غلبه نماید. بنابراین در این مورد نیاز به درمان‌های آنتی‌میکروبیال جدید احساس می‌شود (۴).

دو مسیر کوئروم سنسینگ مرتبط اما متمایز در *P.aeruginosa* شناسایی شده‌اند. هر دو این سیستم‌ها به لحاظ ژنتیکی شبیه هستند، و شامل پروتئین‌های فعال‌کننده رونویسی کدگذاری ژن‌ها (lasR, rhIR) و هم‌چنین ژن‌های مسئول تولید مولکول‌های سیگنالینگ هموسرین لاکتون‌های N-آسیله می‌باشد (lasI, rhI) (۷). علاوه بر 3-oxo-c₁₂-HSL و C₄-HSL یک سیگنال درون‌سلولی سوم توسط *P.aeruginosa* تولید می‌شود. این سیگنال 2-Heptyl-3hydroxyquinoline است، و Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) نامیده می‌شود (۷). تولید PQS به‌صورت مثبت توسط کوئروم سنسینگ las تنظیم می‌شود، و زیست‌فعالی PQS به حضور RhIR بستگی دارد. جالب توجه است، که علاوه برافزایش تولید الاستاز LasB، PQS نیز برای القای بروز rhII که سنتز C₄-HSL را کدگذاری می‌کند نشان داده شده است. این مشاهدات منجر به این نتیجه می‌شوند، که PQS به‌عنوان سیگنال اتصال‌دهنده، بین سیستم‌های کوئروم سنسینگ las, rhI عمل می‌کند (۸).

QS از طریق هموسرین لاکتون بهترین مشخصه سیستم ارتباط سلول-سلول در باکتری است. Acyl- (AHLs) homoserine lactones معمولاً منسوب به مولکول‌های خود تحریک‌کننده نوع یک (AI 1) هستند (۸). سایر سیستم‌های QS باکتریایی شامل سیگنال Quinolone در *P.aeruginosa* است (2-Heptyl-3hydroxyquinoline) (۹). مدارک زیادی در دست است که تشکیل بیوفیلیم و آزادسازی بسیاری از فاکتورهای

استخراج و لیگاند در جایگاه فعال داکینگ شد. برای یافتن بهترین حالت و بهترین اتصال پروتئین و لیگاند، در نرم افزار AutoDock از گزینه ژنتیک الگوریتم استفاده شد. با استفاده از این فرمان، لیگاند جدید (NSAIDs) در جایگاه فعال پروتئین قرار داده شد. در این پروژه ۵۰ تکرار برای هر نوبت داکینگ در نظر گرفته شد، تا بهترین اتصال شناسایی شود. جوابها به صورت فایل DLG ذخیره شدند. سپس با استفاده از فرمانهای لینوکسی که در سایت AutoDock موجود است، این فایل را به پسوند PDB برگردانده و در محیط ویندوز، پس از جداسازی بهترین نتیجه داکینگ با استفاده از نرم افزار Swiss pdb viewer ابتدا لیگاند و پروتئین باهم ادغام شد، و سپس با نرم افزار ViewrLite کوفاکتورها و H باندها را دوباره اضافه کردیم. این کار برای تمام NSAIDs مورد مطالعه انجام شد، و بهترین نتیجه به دست آمده از داکینگ هر مولکول با یکدیگر مقایسه شد. سپس وارد فاز آزمایشگاهی برای اثبات نظریه تئوری شدیم. غلظت 10^4 از باکتری *P.aeruginosa* (حداقل غلظت مورد نیاز از باکتری) سویه PAO1 تهیه شد.

تعیین Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ماده دارویی (NSAIDs) برای باکتری *P.aeruginosa* سویه PAO1

منظور از MIC حداقل غلظتی از ماده‌های دارویی مورد استفاده است که می‌تواند، رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند. برای این منظور، $20 \mu\text{L}$ از غلظت 10^4cfu/mL کشت تازه تهیه شده میکروب *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type, Nottingham) با $180 \mu\text{L}$ از 8 غلظت مختلف پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک (جدول ۲)، در محیط کشت مولر مایع غنی شده با گلوکز (با نسبت ۱ به ۹) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد.

(MOE AutoDockTools 1.5.4 <http://www.hyper.com>) (۱۴)، (۱۵) و Swiss PDB viewer 3.7 (۱۶)، انجام گردید. برای تشخیص فعالیت مهارتی NSAIDs علیه LasR و PqsE سه ترکیب شامل پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک انتخاب شدند. ابتدا هر یک از مولکول‌های مورد مطالعه توسط نرم افزار ChemBioOffice Ultra 8.0 کشیده و رسم شدند و بهینه‌سازی انرژی (minimized-energy) توسط نرم افزار HyperChem 7.0 انجام شد. سپس ساختار سه بعدی هر یک از پروتئین‌های LasR و PqsE از سایت Protein Data Bank (PDB) استخراج گردید (جدول ۱).

جدول ۱: کد پروتئین‌های دخیل (در سیستم کوئروم سنسینگ) در سایت PDB

| پروتئین | کد |
|---------|------|
| LasR | ۲UVO |
| PqsE | ۲QOJ |

توالی‌های تکراری و سوپسترای موجود در جایگاه فعال هر پروتئین (در پروتئین LasR سوپسترا هموسرین لاکتون و در پروتئین PqsE سوپسترا یک مولکول شبه بنزوات بوده است) و همچنین مولکول‌های آب در مدل پروتئینی که می‌توانند، با لیگاند جدید برهمکنش داده و نتایج غلط سبب شوند، حذف گردید.

برهمکنش پروتئین و لیگاند

پیش از شروع به کار برنامه AutoDock، مولکول‌های پروتئین با اضافه کردن اتم‌های هیدروژن به آن اصلاح گردید. پس از آماده کردن پروتئین‌ها و لیگاندهای مورد نظر، پروتئین و لیگاند را در نرم افزار AutoDock در محیط سیستم عامل لینوکس کپی کرده و پروتئین را ویرایش کردیم. سپس لیگاند را باز کرده و به صورت flexible در نظر گرفتیم، تا بتواند بر مبنای برهمکنش‌ها بچرخد. جایگاه فعال پروتئین و اسیدهای آمینه آن را، برای برهمکنش پروتئین (LasR و PqsE) و لیگاند (NSAIDs)،

جدول ۲: غلظت‌های مختلف پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک جهت تعیین MIC

| | | | | | | | | |
|------------|----------|-----------|------------|------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
| پیروکسیکام | ۱mg/mL | ۰.۵mg/mL | ۰.۲۵mg/mL | ۰.۱۲۵mg/mL | ۰.۰۶۲۵mg/mL | ۰.۰۳۱mg/mL | ۰.۰۱۵mg/mL | ۰.۰۰۷۵mg/mL |
| ملوکسیکام | ۰.۹mg/mL | ۰.۴۵mg/mL | ۰.۲۲۵mg/mL | ۰.۱۱۲mg/mL | ۰.۰۵۶mg/mL | ۰.۰۲۸۱۲۵mg/mL | ۰.۰۱۴mg/mL | ۰.۰۰۷mg/mL |
| کتورولاک | ۲۰mg/mL | ۱۰mg/mL | ۵mg/mL | ۲.۵mg/mL | ۱.۲۵mg/mL | ۰.۶۲۵mg/mL | ۰.۳۱۲۵mg/mL | ۰.۱۵۵mg/mL |

(TTC) (5mg/mL) استفاده شد. برای این منظور پس از پایان انکوباسیون، $20 \mu\text{L}$ نمک تترازولیوم به چاهک‌ها اضافه شد، و

این پلیت‌ها در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 20 ساعت انکوبه شد. سپس جهت تعیین MIC از نمک تترازولیوم

رنگ آمیزی و سپس مازاد این رنگ توسط شستشو با نرمال سالین استریل (سه مرتبه) حذف و در معرض هوا خشک شد. اکنون آنالیز کمی بیوفیلم ها با افزودن $100 \mu\text{L}$ اتانول ۹۶ درصد به داخل هر چاهک (به مدت ۱۵ دقیقه) صورت گرفت.

به عبارت دیگر، پس از انجام این کار جذب کریستال ویوله موجود در محلول اتانول به عنوان معیاری از میزان بیوفیلم تشکیل شده، به کمک دستگاه Plate Reader (مدل Bio Tek Synergy H4 Hybrid Reader ساخت کشور آلمان) در طول موج 590 نانومتر خوانده شد، و در صورت بالا بودن میزان جذب کریستال ویوله (بیشتر از ۲) تمام چاهک ها به میزان $1/2$ با الکل ۹۶ درصد رقیق شد (نتایج این آزمایش و میزان جذب کریستال ویوله در بخش یافته ها بیان خواهد شد).

اندازه گیری میزان نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم

این مرحله به کمک نمک تترازولیوم (TTC) انجام شد. روش انجام کار مانند مرحله گذشته (در معرض قرار دادن بیوفیلم در ۱۲ ساعت پایانی کشت توسط NSAIDs) می باشد، با این تفاوت که در انتهای ۴۸ ساعت انکوبه شدن پلیت ها و پس از سه بار شستشوی چاهک ها با نرمال سالین استریل دوباره چاهک ها با $175 \mu\text{L}$ محیط کشت (مشابه ۱۲ ساعت پایانی) به همراه $40 \mu\text{L}$ ۲۵ توبرامایسین پر شده، و به آن $40 \mu\text{L}$ نمک تترازولیوم (TTC) با غلظت 5mg/mL اضافه شد، و به مدت ۵ ساعت در دمای 37°C درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از این مدت میزان رنگ قرمز که معیاری از زنده ماندن میکروب های داخل بیوفیلم می باشد (و همچنین میزانی از نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم)، به کمک دستگاه Plate Reader در طول موج 450 نانومتر اندازه گیری و مشخص شد. در این مرحله نیز در صورت بالا بودن جذب خوانده شده، تمام چاهک ها به میزان $1/2$ با الکل ۹۶ درصد رقیق شدند. (لازم به ذکر است، که برای هر کدام از NSAIDs سه چاهک در نظر گرفته شده است). آزمایش بالا که از نمک تترازولیوم برای تعیین میزان نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم استفاده شد، در دو مرحله (همراه با توبرامایسین و بدون توبرامایسین) انجام پذیرفت.

یافته ها

جایگاه فعال پروتئین

پیش از حذف لیگاند جایگاه فعال شناسایی شد، و در انتها توانستیم، لیگاند جدید را در این جایگاه جایگزین کنیم. برای

پس از ۳۰ دقیقه انکوبه شدن در 37°C درجه سلسیوس، جذب آن توسط دستگاه Plate reader مدل Bio Tek Synergy H4 Hybrid Reader ساخت کشور آلمان اندازه گرفته شد. لازم به توضیح می باشد، که ماده های داروئی مورد استفاده به صورت محلول اشباع ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳: میزان غلظت اشباع ماده های داروئی مورد استفاده پس

| ماده داروئی | کنترولاک | ملوکسیکام | پیروکسیکام |
|--------------------------------------|----------|-----------|------------|
| میزان غلظت آن در محلول اشباع (mg/mL) | ۲۰ | ۰/۹ | ۱ |

تهیه بیوفیلم و بررسی توانایی NSAIDs در بین بردن بیوفیلم *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type, Nottingham)

$20 \mu\text{L}$ از غلظت 10^4cfu/mL کشت تازه تهیه شده میکروب *P.aeruginosa* سویه PAO1 با $180 \mu\text{L}$ از محیط کشت غنی شده با گلوکز، به داخل هر چاهک پلیت تلقیح شد (برای هر کدام از داروها و کنترل مثبت و کنترل منفی سه چاهک در نظر گرفته شد). سپس در 37°C درجه سلسیوس انکوبه شد. محیط کشت هر چاهک روز اول پس از ۲۴ ساعت و در روز دوم هر ۱۲ ساعت تعویض شد. در ۱۲ ساعت پایانی $180 \mu\text{L}$ از محیط کشت غنی شده، حاوی ماده داروئی (NSAIDs) که غلظت مورد نظر آن با توجه به نتایج مرحله قبل انتخاب شده همراه با $25 \mu\text{L}$ آنتی بیوتیک توبرامایسین با غلظت 1mg/mL (غلظت MIC مربوط به میکروب *P.aeruginosa*) به هر چاهک اضافه شد، و به مدت ۱۲ ساعت در دمای 37°C درجه سلسیوس انکوبه شد (لازم به ذکر است، که به طور موازی با این روش، چاهک هایی نیز از ابتدا در معرض آنتی بیوتیک قرار داده شد، که در آن ها وجود آنتی بیوتیک مانع از تشکیل بیوفیلم گردید). به عنوان کنترل مثبت نیز از کشت میکروب در $180 \mu\text{L}$ محیط کشت غنی شده با گلوکز همراه با $25 \mu\text{L}$ آنتی بیوتیک توبرامایسین در هر چاهک، بدون ماده دارویی استفاده شد. برای کنترل منفی نیز از محیط کشت بدون هیچ گونه افزودنی استفاده گردید، تا از استریل بودن آن اطمینان حاصل شود. پس از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در مرحله پیشین، مایع هر چاهک برداشته و حذف شد، و باکتری های چسبیده به ته چاهک ها سه مرتبه با نرمال سالین استریل شستشو داده شد، تا باکتری ها با اتصال ضعیف حذف و سپس در معرض هوا خشک شد. بیو فیلم باقی مانده در این مرحله به کمک محلول کریستال ویوله $0/3$ درصد به مدت ۲۰ دقیقه

شناسایی جایگاه فعال پروتئین پیدا کردن اسیدهای آمینه پیرامون این جایگاه ضروری است (جدول ۴).

جدول (۴) اسیدهای آمینه جایگاه فعال پروتئین های LasR و PqsE

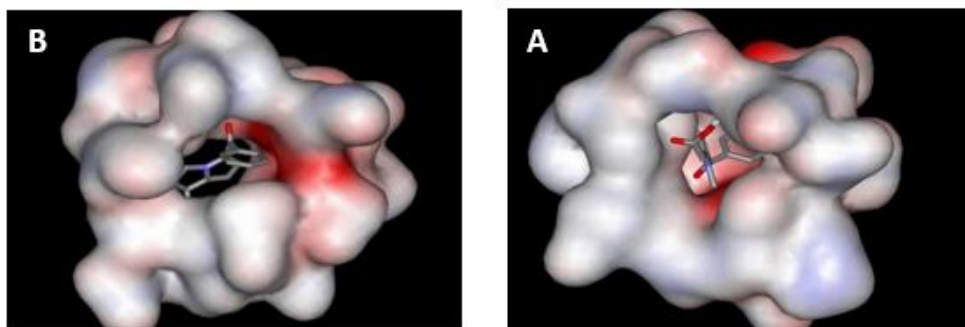
| LasR | | | | PqsE | | | | پروتئین |
|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------------------|
| Thr ^{۱۱۵} | Thr ^{۷۵} | Arg ^{۶۱} | Leu ^{۳۶} | Leu ^{۲۷۷} | Phe ^{۱۹۵} | His ^{۱۵۹} | His ^{۷۱} | اسیدهای آمینه جایگاه فعال |
| Ala ^{۱۲۷} | Val ^{۷۶} | Tyr ^{۶۴} | Ile ^{۵۲} | His ^{۲۸۲} | His ^{۲۲۱} | Asp ^{۱۷۸} | Tyr ^{۷۲} | |
| Ser ^{۱۳۹} | Trp ^{۸۸} | Ala ^{۷۰} | Tyr ^{۵۶} | Ser ^{۲۸۵} | Ser ^{۲۷۳} | Glu ^{۱۸۲} | Asp ^{۷۳} | |
| | Phe ^{۱۰۱} | Asp ^{۷۳} | Trp ^{۶۰} | Met ^{۲۸۶} | Phe ^{۲۷۶} | Leu ^{۱۹۳} | His ^{۷۴} | |

LasR و PqsE) و لیگاند (NSAIDs)، لیگاند جدید (NSAIDs)

در جایگاه فعال پروتئین داک شد (شکل ۱).

ساخت نقشه برای ماکرومولکول و لیگاند

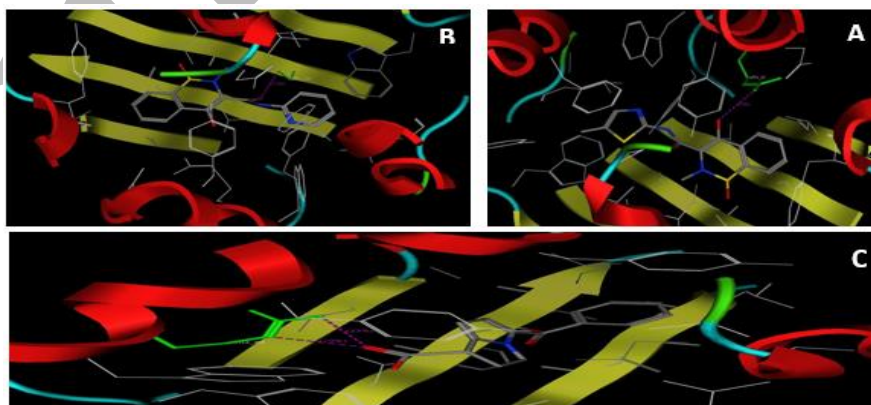
در انتها و پس از ساخت نقشه، یعنی تعریف جایگاه فعال پروتئین و اسیدهای آمینه آن برای برهمکنش پروتئین



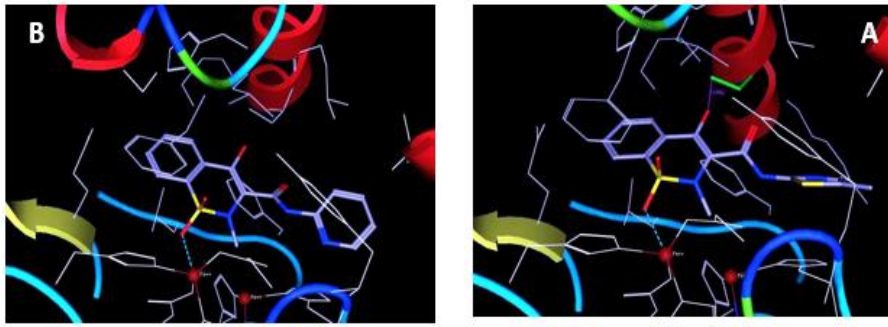
شکل ۱: جایگاه فعال PqsE - کتورولاک (A)، پیروکسیکام (B)

بعد، ویرایش پروتئین، یعنی اضافه کردن دوباره هیدروژن ها و بارهای منفی شکل های آن به دست آمد (شکل ۲ و ۳).

پس از داکینگ و جدا کردن بهترین نتیجه از بین ۵۰ نتیجه به دست آمده، برای هر مولکول NSAID و ادغام دوباره آن با پروتئین موردنظر به کمک نرم افزارهای مختلف و در مرحله



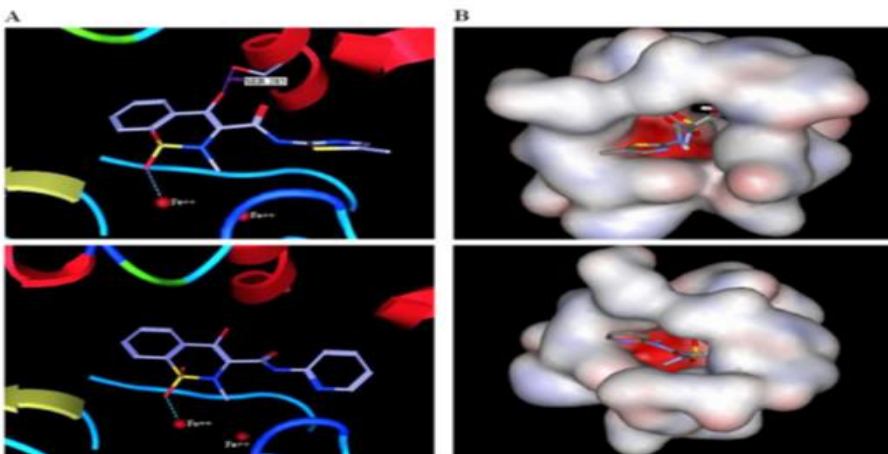
شکل ۲: باندهای هیدروژنی LasR - ملوکسیکام (A)، پیروکسیکام (B)، کتورولاک (C)



شکل ۳: باندهای هیدروژنی PqsE - ملوکسیکام (A)، پیروکسیکام (B)

تiazولی ملوکسیکام با هیستیدین ۷۱ جایگاه فعال PqsE واکنش می‌دهد، که در پیروکسیکام یک پیوند قطبی بین حلقه پیریمیدینی آن و این اسیدآمینو برقرار می‌شود (شکل ۴).

با توجه به نتایج مدل‌سازی مولکولی، ملوکسیکام با سرین ۲۸۵ جایگاه فعال PqsE باند هیدروژنی تشکیل داده، و با Fe^{2+} این جایگاه، پیوند الکترواستاتیک برقرار می‌کند. به علاوه، بخش



شکل ۴: هیدروژن و باندهای هیدروژنی در ملوکسیکام (A) و پیروکسیکام (B) در جایگاه فعال PqsE

مهارکننده دوگانه بود، توانستیم به شکلی دست پیدا کنیم، که ثابت مهار هم برای LasR و هم PqsE در پائین ترین حالت قرار گیرد (جدول ۵).

لیگاندها به صورت چسبیده و جسم‌های کروی قرمز رنگ ترکیبات آهن‌دار را نشان می‌دهند. باندهای الکترواستاتیک و هیدروژنی با نقطه‌های آبی و ارغوانی مشخص شده‌اند.

دستاورد داکینگ

در این پروژه توانستیم، بهترین کونفورماسیون هرکدام از NSAID ها را برای مهار پروتئین‌های LasR و PqsE را بر اساس نتایج انتخاب کنیم. به عبارت دیگر با توجه به اینکه انجام کار روی

جدول ۵: نتیجه‌های داکینگ در کتورولاک، ملوکسیکام و پیروکسیکام

| NSAID | ثابت مهار در LasR | ثابت مهار در PqsE |
|------------|---|--|
| کتورولاک | Binding Energy = -۷/۴۱ Kcal/mol K _i = ۳/۷۳ μm | Binding Energy = -۶/۰۲ Kcal/mol K _i = ۳۸/۸۸ μm |
| ملوکسیکام | Binding Energy = -۹/۴۴ Kcal/mol K _i = ۱۱۹/۴۳ μm | Binding Energy = -۷/۳۶ Kcal/mol K _i = ۴/۰ μm |
| پیروکسیکام | Binding Energy = -۹/۱۴ Kcal/mol K _i = ۲۰/۱۲۹ μm | Binding Energy = -۷/۲۵ Kcal/mol K _i = ۴/۸۸ μm |

جدول ۶: مقدار جذب کریستال ویوله در بیوفیلیم های

P.aeruginosa

کنترل مثبت کتورولاک ملوکسیکام پیروکسیکام

| میزان جذب (nM) | ۰/۸۱ | ۱/۳ | ۰/۶۵ | ۱/۴۵ |
|----------------|------|-----|------|------|
| جذب | | | | |

هر چه مقدار جذب به دست آمده در این مرحله پائین تر از کنترل مثبت باشد (جدول ۶)، بیانگر تشکیل بیوفیلیم کمتر و در نتیجه اثربخشی بهتر ماده دارویی مورد استفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) می باشد.

اندازه‌گیری نفوذ ماده دارویی در بیوفیلیم

P.aeruginosa سویه PAO1 (Wild type Nottingham)

با کمک نمک تترازولیموم، میزان نفوذ ماده دارویی (NSAIDs) را در بیوفیلیم اندازه‌گیری و میزان رنگ قرمز که معیاری از زنده ماند میکروب‌های داخل بیوفیلیم می باشد (و هم‌چنین میزانی از نفوذ ماده دارویی در بیوفیلیم)، به کمک دستگاه Plate Reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و میانگین سه چاهک در نظر گرفته شده، برای هر کدام از ماده‌های دارویی مشخص گردید (جدول ۷).

جدول ۷: اندازه‌گیری میزان نفوذ ماده دارویی در بیوفیلیم با

توبرامایسین در طول موج ۴۵۰ نانومتر

| | کتورولاک | ملوکسیکام | پیروکسیکام |
|-------------------------------------|----------|-----------|------------|
| TTC (nM) به همراه ۲۵ μL توبرامایسین | ۰/۱۷۸ | ۰/۳۶ | ۰/۲۸۱ |

با توجه به نتایج به دست آمده، در مقایسه با کنترل مثبت (جدول ۸) مشخص گردید، ماده دارویی مورد استفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) ورود و نفوذ توبرامایسین را به داخل بیوفیلیم ها را تسهیل نموده و می تواند، تأییدی دیگر بر اثربخشی NSAIDs در مهار سیستم Quorum-sensing در

یافته‌های ما در این پروژه نشان داد که میل ترکیبی پیروکسیکام و ملوکسیکام با جایگاه فعال PqsE در حدود ۶ برابر بیشتر از بنزوات و ۲ برابر بیشتر از آنترانیلات می باشد. این توانایی و پتانسیل می تواند، مربوط به باندهای هیدروژنی و واکنش‌های الکترواستاتیک پیروکسیکام و ملوکسیکام باشد. نتایج داکینگ نشان داد، که پیروکسیکام و ملوکسیکام می توانند، پل‌های هیدروژنی با آرژنین ۶۱ و سرین ۱۲۹ در جایگاه فعال LasR بسازند. ملوکسیکام دارای گروه متیل تیازول و پیروکسیکام دارای یک حلقه پیریدین بجای حلقه اگزوفوران در 3-oxo-c12-HSL می باشند. اما هردوی این گروه‌ها اندازه یکسانی دارند (۲۴۳/۵ cm³/mol versus ۲۵۶/۵ و ۲۶۸/۵ cm³/mol) و هردوی آن‌ها دارای گروه فعال آمیدی هستند. این مقایسه ساختاری بیانگر این است، که با توجه به شباهت ساختاری اکسیکام ها از دسته دارویی NSAIDs و خود القاء LasR (3-oxo-C12-HSL) و مولکول شبه بنزوات موجود در جایگاه فعال PqsE، این ترکیبات می توانند، بهترین مهارکنندگان LasR و PqsE نامیده شوند.

در نتیجه با توجه به شباهت ساختمانی پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک با هموسرین لاکتون (لیگاند نخستین در LasR و مولکول شبه بنزوات در PqsE) و رقابت با آن، روی ساخت بیوفیلیم های *P.aeruginosa* تأثیر گذاشته، و موجب مهار گسترش بیوفیلیم های *P.aeruginosa* گردید.

آنالیز کمی بیوفیلیم

همان‌گونه که در روش اجرا بیان شد، پس از تهیه بیوفیلیم های *P.aeruginosa* و افزودن ماده دارویی به آن‌ها، جذب کریستال ویوله موجود در محلول اتانول به‌عنوان معیاری از میزان بیوفیلیم تشکیل شده، به کمک دستگاه Plate Reader در طول موج ۵۹۰ نانومتر خوانده شده است (جدول ۶).

باکتری *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type Nottingham) باشد.

جدول ۸: کنترل مثبت بیوفیلم بدون ماده دارویی به همراه نمک تترازولیوم

| بدون توبرامایسین | به همراه توبرامایسین |
|------------------|----------------------|
| ۰/۸ | ۰/۵۷۶ |
| (nM) کنترل مثبت | |

بحث

عفونت در زخم‌های سوختگی یکی از عوارض مهم و تعیین‌کننده سرانجام بیماران است. بیشتر عفونت‌های شدید و سپتی‌سمی‌ها و عفونت‌های ریوی به دنبال گسترش عفونت از محل زخم‌های سوختگی شدید ایجاد می‌شوند. در کشور ما شایع‌ترین باکتری که باعث ایجاد عفونت در این زخم‌ها می‌شود، باکتری *P.aeruginosa* است. این باکتری نقشی واضح و اساسی به‌عنوان عامل بیماری‌زا در میان عفونت‌های شدید، وخیم و کشنده ایفا می‌کند (۱۷). طبق یک تحقیق مقاومت *P.aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفتری‌زوکسیم، کاربنی‌سیلین، سفالتین و سفتازیدیم بیشتر از ۹۰ درصد می‌باشد (۱۸).

در دهه گذشته، به داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs)، که پیش‌تر به خاطر خواص تسکین‌دهنده درد، تب و التهاب کاربرد گسترده‌ای داشتند، دوباره توجه شد. اما این بار این توجه خاص نه به خاطر خواص سنتی آنان، بلکه به خاطر ویژگی‌های جدیدی بود، که کمابیش در اعضای این خانواده به چشم می‌خورد. در واقع دیده شد، که التهابات موضعی و سیستمیک همانند آنچه از عفونت‌های باکتریایی در سطوح موکوس ایجاد می‌گردد، در صورت استفاده از NSAIDs در ترکیب با داروهای دیگر در زمان کوتاه‌تری بهبود می‌یابد. در مطالعه‌ای که توسط Umaru و همکاران روی دیکلوفناک انجام گرفت، نشان داده شد که دیکلوفناک خواص ضد میکروبی خوبی از خود نشان می‌دهد. همچنین دیکلوفناک باعث مهار بیوفیلم‌های باکتریایی می‌گردد (۱۹).

در این مطالعه *LasR* و *PqsE* به‌عنوان پروتئین‌های هدف مناسب انتخاب شد، که دلیل این‌گزینهش نقش مهم *LasR* در

آغاز سیستم آبخاری *P.aeruginosa* در سیستم کوئروم سنسینگ و اثرات افزایشی *PqsE* بر روی این سیستم است. به‌عبارت‌دیگر، با توجه به اینکه فاکتورهای محیطی باعث بیان ژن‌های *lasI* و *lasR* می‌گردد، بنابراین دو پروتئین *LasI* و *LasR* تولید می‌شوند. *LasR* با اتصال به ترکیبی که توسط *LasI* بیان می‌شود، کمک به تولید مواد سمی و زیرساخت‌های موردنیاز برای تولید بیوفیلم می‌نماید. *LasR* نیز در طی مراحل باعث تولید زیر واحدهای *PQS* می‌شود، اما *PqsE* نیز باینکه در تولید *PQS* نقشی ندارد، ولی نشان داده شده است، که بدون وجود این پروتئین، مسیر سیگنالینگ عمل نخواهد کرد، هرچند مکانیسم عملکرد آن مشخص نشده است (۸).

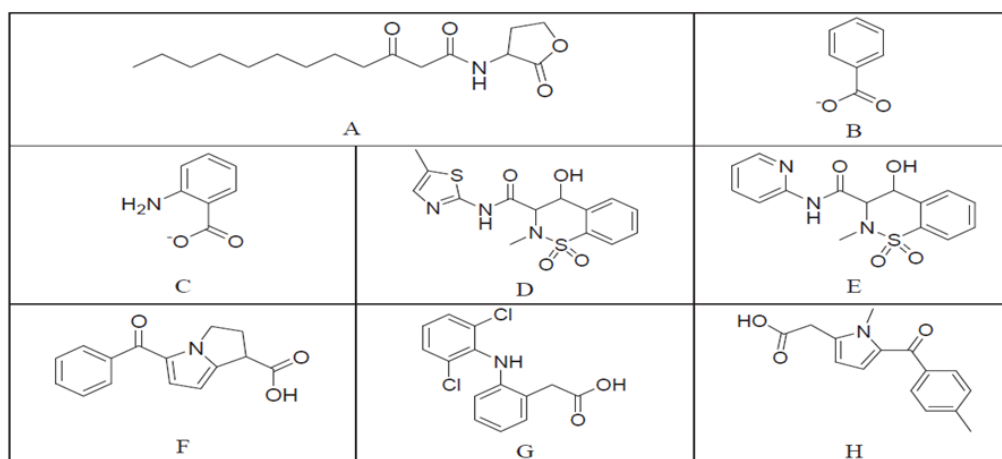
در مطالعه‌ای که توسط Yu و همکارانشان صورت گرفت، برخی مولکول‌ها برای باند شدن، با جایگاه فعال *PqsE* آزمایش شدند. نتیجه تحقیق آن‌ها بیانگر این بود، که تنها بنزوات و آنترانیلات می‌توانند اتصال ضعیفی ($10^{-7} \pm 1/1 \mu\text{M}$ و $29/1 \pm 4/8 \mu\text{M}$) با *PqsE* ایجاد نمایند (۸).

مهارکننده‌های دوگانه بالقوه (NSAIDs)، به‌واسطه استفاده از روش‌های مدل‌سازی مولکولی موردبررسی قرار داده شدند.

از آنجاکه شواهد زیادی وجود دارد، که داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌توانند، تأثیر منفی بر ایجاد بیوفیلم‌های *P.aeruginosa* داشته باشند (۲۰)، این مولکول‌ها انتخاب شده، و اثرات آن‌ها بر روی *LasR* و *PqsE* موردبررسی قرار گرفتند.

در سیستم تنظیمی *LasR*، *LasI* با *3-oxo-c12-HSL* واکنش می‌دهد. *3-oxo-c12-HSL* دارای یک حلقه ۵ ضلعی می‌باشد، و می‌تواند، به‌وسیله باندهای هیدروژنی و پیوندهای کتونی با تروپونین ۶۰ در جایگاه فعال پروتئین *LasR* باند شود.

حاصل این واکنش پروتئین *LasI* است، که این ترکیب مسئولیت برخی فاکتورهای ویروالانس مانند اگزوتوکسین A، آلکان پروتئاز و الاستاز را بر عهده دارد. مطالعه ساختار شیمیایی اکسیکام‌ها (پیروکسیکام و ملوکسیکام) نشان‌دهنده شباهت معنی‌دار این ترکیبات با *3-oxo-c12-HSL* می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵: ساختار شیمیایی 3-oxo-C12-HSL (A)، بنزوات (B)، آنترانیلات (C)، ملوکسیکام (D)، پیروکسیکام (E)، کتورولاک (F)، دیکلوفناک (G)، تولمتین (H)

آنتی‌بیوتیک توبرامایسین در کنار ماده دارویی مورد استفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) می‌باشد.

میزان نفوذ ماده دارویی در بیوفیلیم های

P.aeruginosa سویه PAO1

با کمک نمک تترازولیوم و پس از اندازه‌گیری میزان نفوذ ماده دارویی (NSAIDs) را در بیوفیلیم توسط دستگاه Plate Reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر و مقایسه با کنترل مثبت (جدول ۷) مشخص گردید، ماده دارویی مورد استفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) توانائی تسهیل ورود و نفوذ توبرامایسین به داخل بیوفیلیم ها را دارا بوده، و می‌تواند تأییدی دیگر بر اثربخشی NSAIDs در مهار سیستم Quorum-sensing در باکتری *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type Nottingham) باشد.

با توجه به این‌که میکروب‌های زنده می‌توانند نمک تترازولیوم را احیاء کنند، در پایان این مرحله هر چه رنگ قرمز کمتری باقی بماند، بیانگر میزان فعالیت کمتر میکروب‌ها (احیاء کمتر نمک تترازولیوم) می‌باشد، به عبارت دیگر، نفوذ بیشتر توبرامایسین در بیوفیلیم را بیان کرده، و نشان‌دهنده اثربخشی بهتر و بیشتر NSAIDs می‌باشد.

شماره از NSAIDs می‌توانند، به‌عنوان مهارکنندگان دوگانه پروتئین‌های LasR و PqsE در سیستم کوئوروم سنسینگ عمل کنند. با توجه به شباهت ساختمانی NSAID هایی مانند

بهترین نتایج داکینگ از پیروکسیکام و ملوکسیکام به دست آمد، که پل‌های هیدروژنی با آرژنین ۶۱ و سرین ۱۴۹ ساختند و همان‌طور که گفته شد، ملوکسیکام دارای گروه متیل تiazول و پیروکسیکام دارای یک حلقه پیریدینی بجای حلقه اگزوفوران 3-oxo-c12-HSL می‌باشد. کتورولاک، که عضوی از خانواده NSAIDs و از خانواده استیک اسید می‌باشد، ۲ باند هیدروژنی با آرژنین ۶۱ برقرار می‌کند. ساختار شیمیایی کتورولاک شباهت کمی به خود القاگر 3-oxo-c12-HSL دارد (شکل ۵). گرچه تمام آن‌ها دارای گروه کربوکسیل اسید و گروه عملکرد آمینی با حلقه آروماتیک هستند، اما ساختارشان با 3-oxo-c12-HSL متفاوت می‌باشد. بنابراین آن‌ها نمی‌توانند به‌صورت اولیه با LasR واکنش بدهند، و در نتیجه مهار PqsE توسط آن‌ها به‌خوبی اکسیکام‌ها (پیروکسیکام و ملوکسیکام) نمی‌باشد. دلیل این مسئله را می‌توان در نتایج داکینگ دید، که نشان داده شد این ترکیبات (کتورولاک و دیگر اعضاء خانواده استیک اسید) نمی‌توانند واکنش الکترواستاتیک با یون Fe^{2+} بسازند. اگرچه آن‌ها می‌توانند، پیوندهای هیدروژنی با برخی رزیدوهای جایگاه‌های فعال PqsE مانند تیروزین ۷۲ و آرژنین ۲۸۸ برقرار کنند.

آنالیز کمی بیوفیلیم

با توجه به اینکه جذب خوانده‌شده در این مرحله، در طول موج ۵۹۰ نانومتر، پائین تر از کنترل مثبت بود (جدول ۶)، این نتایج بیانگر تشکیل بیوفیلیم کمتر و در نتیجه اثربخشی بهتر

کاهش داد و در نتیجه از عوارض دارویی و مقاومت نسل‌های بعدی باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک تا حد زیادی جلوگیری کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، که در دانشکده داروسازی مشهد انجام شده است. نویسندگان از همراهی و کمک‌های مسئولین و اساتید مربوطه به خصوص سرکار خانم زهرا ثابتی نوقابی (سرپرست آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده) و همچنین جناب آقای دکتر وحید سهیلی، قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک با مولکول‌های کوچک نفوذپذیر متعلق به دسته لاکتون‌های هموسرین N اسیله (AHLs) که توسط باکتری‌های بیوفیلم به محیط پیرامون آزاد می‌شوند، شاید بتوان، از این گروه داروها جهت مهار سیستم Quorum sensing بهره جست، و با جلوگیری از تشکیل دیواره آگرو پلی ساکارییدی (بیوفیلم‌ها) مانع تکثیر و تهاجم و در نتیجه بیماری‌زایی *P.aeruginosa* گردید. در نتیجه بهره‌گیری از NSAIDs برای شکستن مقاومت باکتری *P.aeruginosa* به آنتی‌بیوتیک با تکیه به مکانیسم‌های مولکولی داخل سلولی به‌عنوان یک روش آسان و کم‌هزینه در درمان عفونت‌های این باکتری پیشنهاد می‌شود. همچنین در درمان و مدیریت بالینی بیمارانی که دچار آلودگی با *P.aeruginosa* در محل جراحی یا سوختگی شده باشند، می‌توان با بهره‌گیری از NSAIDs در کنار درمان آنتی‌بیوتیکی، دوز آنتی‌بیوتیک موردنظر برای درمان را

References

1. Reid G. Biofilms in infectious disease and on medical devices. International journal of antimicrobial agents, 1999. 1999; 11(3-4): 223-226
2. Sawhney R, Berry V. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. Indian J Med Sci. 2009; 63(7):313-21.
3. Prasanna S, Doble M. Medical biofilms—Its formation and prevention using organic molecules. J Indian Inst Sci. 2012; 88(1):27-35.
4. Bottomley MJ, Muraglia E, Bazzo R, Carfi A. Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. J Biol Chem. 2007; 282(18):13592-600.
5. Medina G, Juarez K, Diaz R, Soberon-Chavez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. Microbiology. 2003; 149(11): 3073-81.
6. Croda-Garcia G, Grosso-Becerra V, Gonzalez-Valdez A, Servin- Gonzalez L, Soberon- Chavez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. Microbiology. 2011; 157(9): 2545-55.
7. Borlee BR, Geske GD, Blackwell HE, Handelsman J. Identification of Synthetic Inducers and Inhibitors of the Quorum-Sensing Regulator LasR in *Pseudomonas aeruginosa* by High-Throughput Screening. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(24): 8255-8.
8. Yu S, Jensen V, Seeliger J, Feldmann I, Weber S, Schleicher E, et al. Structure elucidation and preliminary assessment of hydrolase activity of PqsE, the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) response protein. Biochemistry. 2009; 48(43):10298-307.
9. Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN, Lazdunski A. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. Mol Microbiol. 2003; 48(1): 199-210.
10. Diggle SP. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Thesis (Ph. D.) University of Nottingham, 2001.
11. Claverie JM, Notredame C. Bioinformatics for dummies: John Wiley & Sons; 2011. 456.
12. Katzung BG, Trevor AJ, Masters SB. Basic and Clinical Pharmacology. langetextbooks.com. International Edition. 2004; 9.

13. Bryers JD, Jarvis RA, Lebo J, Prudencio A, Kyriakides TR, Uhrich K. Biodegradation of poly (anhydride-esters) into non-steroidal anti-inflammatory drugs and their effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro and on the foreign-body response in vivo. *Biomaterials*. 2006; 27(29): 5039-48.
14. Garrett MM, Ruth H, William L, Michel FS, Richard KB, David SG, Arthur JO. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem*. 2009; 30(16): 2785–2791.
15. MOE. Chemical Computing Group Inc. 1010 Sherbooke St West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7. 2014.
16. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis*. 1997; 18(15): 2714-2723.
17. Sihorkar V, Vyas S. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. *Pharm Res*. 2001; 18(9):1247-54.
18. Zeng Z, Qian L, Cao L, Tan H, Huang Y, Xue X, et al. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 79(1):119.
19. Umaru T, Nwamba CO, Kolo I, Nwodo UU. Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: Diclofenac sodium as a case study. *African J Biotechnology* 2009; 8(25): 7332-7339.
20. Ahumado M, Díaz A, Vivas-Reyes R. Theoretical and structural analysis of the active site of the transcriptional regulators LasR and TraR, using molecular docking methodology for identifying potential analogues of acyl homoserine lactones (AHLs) with anti-quorum sensing activity. *Eur J Med Chem*. 2010; 45(2):608-15.

