

This Article has been retracted due to conflict of interest issues.

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 antibiotic. 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 concentration rate of NSAIDs in biofilms and its absorbance were measured by methanol 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 conformation 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.

Conclusion: Based on the constructional similarities in some NSAIDs, like Piroxicam, Ibuprofen and Hydrocortisone 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.

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

How to cite this article:



مقاله حاضر به دلیل بروز تضاد در منافع میان نویسندگان مسترد گشته است.

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^۳

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده دارو، دانشگاه پیام نور مشهد، مشهد، ایران
۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده 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 کاهش‌دهنده 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 کم‌هزینه برای مقابله با بیوفیلم باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از NSAIDs است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۲

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

موضوع:

باکتری‌شناسی 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

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

یافته‌ها: پس از داکینگ، بهترین کونفورماسیون هرکدام از NSAIDs برای مهار پروتئین‌های PqsE و LasR انتخاب شد. با توجه به اینکه انجام کار با مهارکننده دوگانه بود، سیستم به شکلی پیدا کنیم، که ثابت مهار برای LasR و PqsE هم‌زمان در پائین‌ترین حالت قرار گیرد. نتایج نشان داد که تشکیل بیوفیلم باکتری در مجاورت NSAID و آنتی بیوتیک توبرامایسین کمتر بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به شباهت ساختمانی NSAID با لوکسیکام و کتورولاک با لاکتون‌های هموسرین (AHLs) N این داروها، با مهار پروتئین‌های LasR و PqsE می‌تواند عنوان مهارکنندگان سیستم Quorum-sensing به کار روند و مانع از بیماری‌زایی باکتری شود.

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

سنسینگ، NSAIDs

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

مقدمه

پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان، فاگوسیتوز و درمان‌های آنتی بیوتیکی دورنگه می‌دارد (۱).

درصد بالایی از عفونت‌های انسانی ناشی از این حقیقت است، که میکروارگانیزم‌های موجود در بیوفیلم به از بین رفتن توسط عوامل ضد میکروبی مقاوم‌اند (۲). در نهایت شناخت

بیوفیلم‌ها زمانی که میکروارگانیزم‌ها گرد هم می‌آیند و به سطوح می‌چسبند، تشکیل می‌شوند (۱) و به‌عنوان عامل نگه‌دارنده تجمع میکروبی پیچیده روی سطوح جاندار و بی‌جان هستند. این اکوسیستم مینیاتوری محیط امنی برای اعضای این جامعه فراهم می‌آورد، و آن‌ها را از دسترس مکانیسم‌های دفاعی و

تحریک کننده نوع یک (AI 1) هستند (۸). سایر سیستم های QS باکتریایی شامل سیگنال Quinolone در *P.aeruginosa* (2-Heptyl-3hydroxyquinoline) (۹). مدارک زیادی در دست است که تشکیل بیوفیلم و آزادسازی بسیاری از فاکتورهای ویروالانس سودوموناس، تحت QS انجام می شود (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 سه بعدی ناشی می شوند (۱۱). امروزه بخش قابل توجهی از بیوانفورماتیک به ابداع ابزار الکترونیکی برای یافت رابطه بین توالی و ساختار سه بعدی اختصاص یافته است (این زمینه تخصصی، بیوانفورماتیک نامیده می شود) (۱۱). توبرامایسین در آزمایشگاه، بسیاری از سویه های استافیلوکوک ها و کلی فرمها و سایر باکتری های منفی را مهار می کند. این آنتی بیوتیک تا حدودی ظرفیت ضد باکتریایی جنتامایسین را با چند استثناء (۱۱) برسد.

NSAIDs (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs) در گروه های مختلف شیمیایی طبقه بندی می شوند. این تنوع شیمیایی عامل ایجاد دامنه گسسته و ویژگی های فارماکوکینتیک است (۱۳). با توجه به شباهت ساختمانی بین لیگاندها و مهارکنندگان پروتئین های lasR و PqsE، NSAIDs در این مطالعه اثرات مهارکنندگی چند داروی به گونه ای مشابه به دسته NSAIDs بر روی پروتئین های lasR و PqsE را نشان دادند. این یافته ها نرم افزارها و مدل های کامپیوتری را برای انتخاب داروهای با بهترین اثر مهارکنندگی بر روی هر دو پروتئین، در محیط آزمایشگاه بررسی گردید. امید است، که نتایج این پژوهش بتواند روش ارزان قیمت و قابل دسترسی در درمان بیماری های عفونی مرتبط با سویه های ایجادکننده بیوفیلم *P.aeruginosa* به ویژه در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروز ایجاد نماید.

مواد و روش ها

مدل سازی مولکولی

در این مطالعه پژوهشی که از شهریور ۱۳۹۴ تا بهمن ۱۳۹۴ انجام شد، تمام محاسبات با چندین نرم افزار

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 سریع ترین باکتری گرم منفی است که در عفونت های بیو بیوتیک یافت می شود، و مسئول پنومونی بیمارستانی، عفونت های مجاری ادراری، عفونت های خونی، زخم های جراحی، التهابات ملتحمة، اوتیت میدیای حاد، اندوکاردیت و درماتیت است (۴). عفونت های ایجاد شده توسط *P.aeruginosa* بیشتر شامل تونل بازمانده های از فاکتورهای سمی مرتبط با سلول و عوامل خارج سلولی می باشد (۵). عوامل سمی خارج سلولی که توسط *P.aeruginosa* تولید می شوند عبارتند از: پیوسیانین، الاستاز، رامنولپیدها، آلکالین پروتئاز، لکتین ها، اگزوتوکسین A و HCN. تولید این فاکتورهای سمی تحت کنترل quorum-sensing (QS) می شود (۶). *P.aeruginosa* همچنین قادر است، بر فشارهای ایجاد شده به وسیله آنتی بیوتیک های محدودکننده رشد غلبه نماید. بنابراین در این مورد نیاز به درمان های آنتی میکروبیال جدید احساس می شود (۴).

دو مسیر کوئروم سنسینگ مرتبط اما متمایز در *P.aeruginosa* شناسایی شده اند. هر دو این سیستم ها به لحاظ ژنتیکی شبیه هستند، و شامل پروتئین های فعال کننده رونویسی کدگذاری ژن ها (lasR, rhIR) و هم چنین ژن های مسئول تولید مولکول های سیگنالینگ هموسرین لاکتون های N-آسیله می باشد (lasI, rhI) (۷). علاوه بر 3-oxo-c₁₂-HSL و C₄-HSL یک سیگنال درون سلولی سوم توسط *P.aeruginosa* تولید می شود. این سیگنال 2-Heptyl-3hydroxyquinoline است، و Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) نامیده می شود (۷). تولید PQS به صورت مثبت توسط کوئروم سنسینگ las تنظیم می شود، و زیست فعالی PQS به حضور RhIR بستگی دارد. جالب توجه است، که علاوه برافزایش تولید الاستاز LasB، نیز برای القای بروز rhII، که سنتز C₄-HSL را کدگذاری می کند نشان داده شده است. این مشاهدات منجر به این نتیجه می شوند، که PQS به عنوان سیگنال اتصال دهنده، بین سیستم های کوئروم سنسینگ las, rhI عمل می کند (۸).

QS از طریق هموسرین لاکتون بهترین مشخصه سیستم ارتباط سلول-سلول در باکتری است. Acyl-homoserine lactones معمولاً منسوب به مولکول های خود

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)، 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 پروتئین باهم ادغام شد، و سپس با نرم افزار ViewerLite کوفته ها 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 لیگاند مقایسه شد. سپس وارد فاز آزمایشگاهی برای اثبات نظریه ما گردیدیم. غلظت ۱۰^۴ از باکتری *P.aeruginosa* (حداقل غلظت مورد نیاز از باکتری) سویه PAO1 تهیه شد.

تعیین Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

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

منظور از MIC حداقل غلظت آن ماده دارویی مورد استفاده است که می تواند، رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند. برای این منظور ۲۰ μL از غلظت ۱۰^۴cfu/mL کشت تازه تهیه شده میکروب *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type, Nottingham) با ۱۸۰ μL از ۸ غلظت مختلف پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک (جدول ۲)، در محیط کشت مولر مایع غنی شده با گلوکز (با نسبت ۱ به ۹) در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد.

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) MOE (v2014) AutoDockTools 1.5.4 (<http://www.hyper.com>) (۱۵) و Swiss PDB viewer 3.7 (۱۶)، انجام گردید. برای تشخیص فعالیت مهاری NSAIDs علیه LasR و PqsE ترکیب شامل پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک انتخاب شدند. ابتدا هر یک از مولکول های مورد مطالعه توسط نرم افزار ChemBioOffice Ultra 8.0 کشیده و رسم شدند. بهینه سازی انرژی (minimized-energy) توسط نرم افزار HyperChem 7.0 انجام شد. سپس ساختار سه بعدی هر یک از پروتئین های LasR و PqsE از سایت Protein Data Bank (PDB) استخراج گردید (جدول ۱).

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

پروتئین	کد
LasR	۲UVO
PqsE	۲QOJ

توالی های 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 مولکول های آب در مدل پروتئینی که می توانند، با لیگاند جدید برهمکنش داده و نتایج غلط سبب شوند، حذف گردید.

برهمکنش پروتئین و لیگاند

پیش از شروع به کار برنامه AutoDock، مولکول های پروتئین با اضافه کردن اتم های هیدروژن به آن اصلاح گردید. پس از آماده کردن پروتئین ها 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

جدول ۲: غلظت های 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	۰/۰۰۷۸mg/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	۰/۱۵mg/mL

چسبیده به ته چاهک‌ها سه مرتبه با نرمال سالین استریل شستشو داده شد، تا باکتری‌ها با اتصال ضعیف حذف و سپس در معرض هوا خشک شد. بیو فیلم باقی‌مانده در این مرحله به کمک محلول کریستال ویوله ۰/۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس مازاد این رنگ توسط شستشو با نرمال سالین استریل (سه مرتبه) حذف و در معرض هوا خشک شد. اکنون آنالیز کمی بیوفیلم‌ها با افزودن ۱۰۰ μL اتانول ۹۶ درصد به داخل هر چاهک (به مدت ۱۵ دقیقه) صورت گرفت.

به‌عبارت‌دیگر، پس از انجام این کار جذب کریستال ویوله موجود در محلول اتانول به‌عنوان معیاری از میزان بیوفیلم تشکیل‌شده، به کمک دستگاه Plate Reader (مدل Bio Tek Synergy H4 Hybrid Reader ساخت کشور آلمان) در طول موج ۵۹۰ نانومتر خوانده شد، و در صورت بالا بودن میزان جذب کریستال ویوله (بیشتر از ۲) تمام چاهک‌ها به میزان ۱/۲ با الکل ۹۶ درصد رقیق شد (نتایج این آزمایش و میزان جذب کریستال ویوله در بخش یافته‌ها بیان خواهد شد).

اندازه‌گیری میزان نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم

این مرحله به کمک نمک تترازولیوم (TTC) انجام شد. روش کار مانند مرحله شستشو (در معرض قرار دادن بیوفیلم در ۱۲ ساعت پایانه کشت توسط NSAIDs) می‌باشد، با این تفاوت که در این مرحله ۴۸ ساعت انکوبه شدن پلیت‌ها و پس از سه بار شستشوی چاهک‌ها با نرمال سالین استریل دوباره چاهک‌ها با ۱۷۵ μL محیط کشت (مشابه ۲ ساعت پایانه) به همراه ۲۵ توبرامایسین پرشده، در ۴۰ μL نمک تترازولیوم (TTC) با غلظت ۵ mg/mL اضافه شده و به مدت ۳۷ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از این مدت میزان رنگ قرمز که معیاری از زنده ماندن میکروب‌های داخل بیوفیلم می‌باشد (و هم‌چنین میزانی از نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم) به کمک دستگاه Plate Reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و مشخص شد. در این مرحله نیز در صورت بالا بودن جذب خوانده‌شده، تمام چاهک‌ها به میزان ۱/۲ با الکل ۹۶ درصد رقیق شدند. (لازم به ذکر است، که برای هرکدام 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.

این پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت انکوبه شد. سپس جهت تعیین MIC از نمک تترازولیوم (TTC) (۵ mg/mL) استفاده شد. برای این منظور پس از پایان انکوباسیون، ۲۰ μL نمک تترازولیوم به چاهک‌ها اضافه شد، و پس از ۳۰ دقیقه انکوبه شدن در ۳۷ درجه سلسیوس، جذب آن توسط دستگاه Plate Reader (مدل Bio Tek Synergy H4 Hybrid Reader ساخت کشور آلمان) اندازه‌گیری شد. لازم به توضیح می‌باشد، که ماده‌های داروئی مورد استفاده به‌صورت محلول اشباع ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳: میزان غلظت اشباع ماده‌های داروئی مورد استفاده

ماده دارویی	کنترولاک	ملوکسیکام	تروکسیکام
میزان غلظت آن در محلول اشباع (mg/mL)	۲۰	۰/۹	۱

تهیه بیوفیلم و بررسی توانایی NSAIDs در

از بین بردن بیوفیلم *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type, Nottingham)

۲۰ μL از غلظت 10^4cfu/mL کشت تازه تهیه‌شده میکروب *P.aeruginosa* سویه PAO1 با ۱۸۰ μL از محیط کشت غنی‌شده با گلوکز، به داخل هر چاهک پلیت تلقیح شد (برای هرکدام از داروها و کنترل مثبت و کنترل منفی سه چاهک در نظر گرفته شد). سپس در ۳۷ 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 ۱۸۰ μL از محیط کشت غنی‌شده، حاوی ماده داروئی (NSAIDs) که غلظت موردنظر آن با توجه به نتایج مرحله قبل انتخاب‌شده همراه با ۲۵ μL آنتی‌بیوتیک توبرامایسین با غلظت ۱ mg/mL (غلظت MIC مربوط به میکروب *P.aeruginosa*) به هر چاهک اضافه شد، و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد (لازم به ذکر است، که به‌طور موازی با این روش، چاهک‌هایی نیز از ابتدا در معرض آنتی‌بیوتیک قرار داده شد، که در آن‌ها وجود آنتی‌بیوتیک مانع از تشکیل بیوفیلم گردید). به‌عنوان کنترل مثبت نیز از کشت میکروب در ۱۸۰ μL محیط کشت غنی‌شده با گلوکز همراه با ۲۵ μL آنتی‌بیوتیک توبرامایسین در هر چاهک، بدون ماده دارویی استفاده شد. برای کنترل منفی نیز از محیط کشت بدون هیچ‌گونه 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 باکتری‌های

یافته‌ها

جایگاه فعال پروتئین

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

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

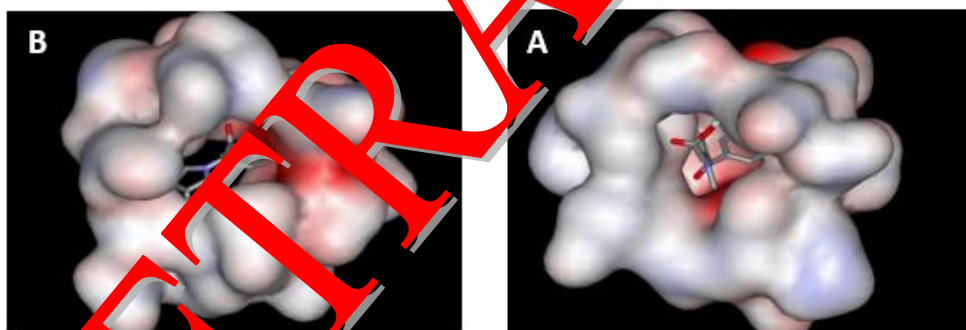
جدول (۴) اسیدهای آمینه جایگاه فعال پروتئین‌های LasR و PqsE

LasR				PqsE			
Thr۱۱۵	Thr۷۵	Arg۶۱	Leu۳۶	Leu۲۷۷	Phe۱۹۵	His۱۳۹	His۷۱
Ala۱۲۷	Val۷۶	Tyr۶۴	Ile۵۲	His۲۸۲	His۲۲۱	Asp۱۱۲	Tyr۷۲
Ser۱۲۹	Trp۸۸	Ala۷۰	Tyr۵۶	Ser۲۸۵	Ser۲۷۳	Trp۱۱۸۲	Asp۷۳
	Phe۱۰۱	Asp۷۳	Trp۶۰	Met۲۸۶	Phe۱۰۱	Leu۱۹۳	His۱۰۱

(LasR و PqsE) و لیگاند (NSAIDs)، لیگاند جدید (NSAIDs) در جایگاه فعال پروتئین داک شد (شکل ۱).

ساخت نقشه برای ماکرومولکول لیگاند

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

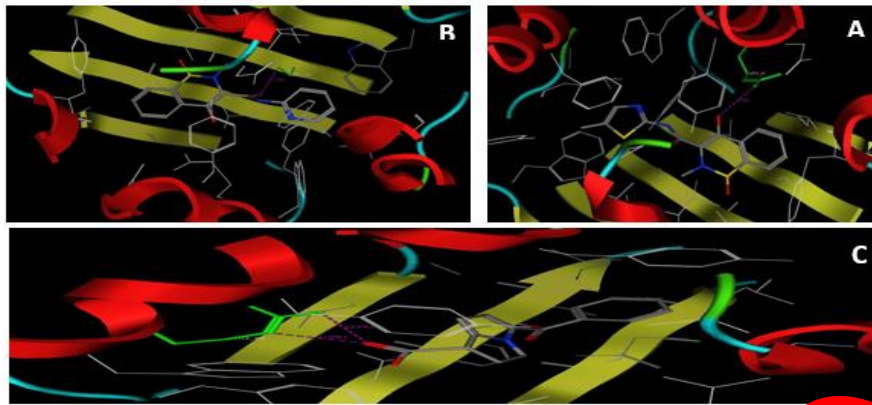


شکل ۱: جایگاه فعال PqsE - کتورولاک (A)، پیروکسیکام (B)

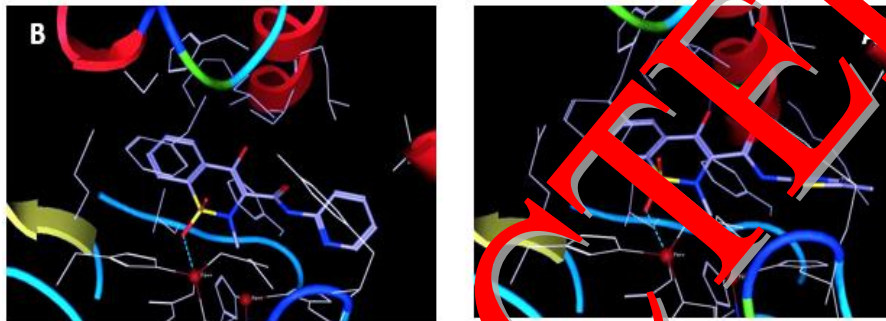
بعد، ویرایش پروتئین، یعنی حذف آب و یون‌ها و بارهای منفی شکل‌های آن به دست آمد (شکل ۲ و ۳).

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 نرم‌افزارهای مختلف و در مرحله



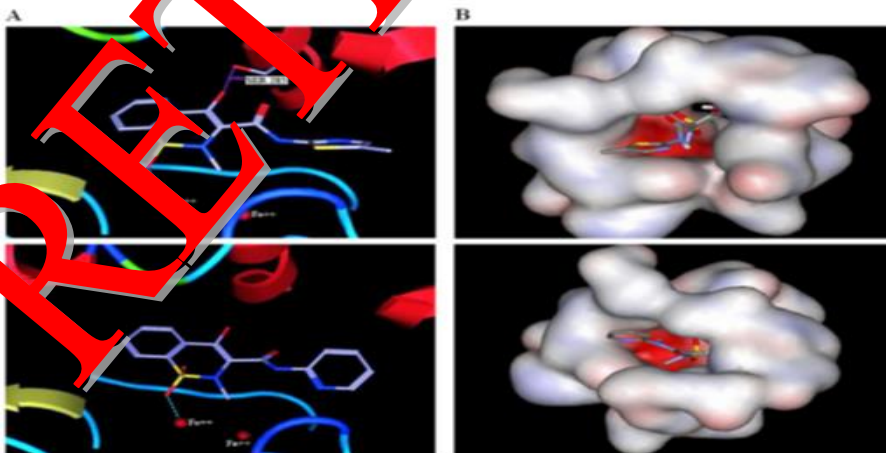


شکل ۲: باندهای هیدروژنی LasR - ملوکسیکام (A)، پیروکسیکام (B)، کتورولاک (C)



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

با توجه به نتایج مدل سازی مولکولی، ملوکسیکام با ۲۸۵ جایگاه فعال PqsE باند هیدروژنی تشکیل داده، و با Fe^{2+} این جایگاه، پیوند الکترواستاتیک برقرار می کند. به علاوه، بخش یازولی ملوکسیکام با هیستیدین ۷۱ جایگاه فعال PqsE واکنش می دهد، در پیروکسیکام یک پیوند قطبی بین حلقه پیریمیدین آن با هیستیدین ۷۱ سید آمینه برقرار می شود (شکل ۴).



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

نتایج انتخاب کنیم. به عبارت دیگر با توجه به اینکه انجام کار روی 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 هر کدام از NSAID ها را برای مهار پروتئین‌های LasR و PqsE را بر اساس

جدول ۵: نتایج داکینگ مولوکسیکام 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 = ۲۸/۸۸ 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 = ۲۰۱/۲۹ μm	Binding Energy = -۷/۲۵ Kcal/mol K _i = ۴/۸۸ μm

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

همان گونه که روش اجرا بیان شد، پس از تهیه بیوفیلیم های *P.aeruginosa* و ورودن ماده دارویی به آن‌ها، جذب کریستال در حضور اتانول به عنوان معیاری از میزان بیوفیلیم تشکیل شده، به کمک دستگاه Plate Reader در طول موج ۵۹۰ نانومتر خوانده شده است (جدول ۶).

جدول ۶: مقدار جذب کریستال در بیوفیلیم های *P.aeruginosa*

کنترل مثبت	کتورولاک	ملوکسیکام	پیروکسیکام
۱/۴۵	۰/۶۵	۱/۳	۰/۸۱
میزان (nM)			
جذب			

هر چه مقدار جذب به دست آمده در این مرحله پائین تر از کنترل مثبت باشد (جدول ۶)، بیانگر تشکیل بیوفیلیم کمتر و

یافته‌های ما در این پروژه نشان داد که میل ترکیبی پیروکسیکام و ملوکسیکام با جایگاه فعال PqsE در حدی برابر بیشتر از بنزوات و ۲ برابر بیشتر از آنترانیلات می‌باشد. این توانایی و پتانسیل می‌تواند، مربوط به باندهای هیدروژنی و واکنش‌های الکترواستاتیک پیروکسیکام و ملوکسیکام باشد. نتایج داکینگ نشان داد، که پیروکسیکام و ملوکسیکام می‌توانند 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 می‌باشند. اما هر دوی این گروه‌ها اندازه یکسانی دارند (۲۴۳/۵ cm³/mol versus ۲۵۶/۵ cm³/mol و ۲۶۸/۵ cm³/mol) و هر دوی آن‌ها دارای گروه فعال آمیدی هستند. این مقایسه ساختاری بیانگر این است، که با توجه به شباهت ساختاری اکسیکام‌ها از دسته دارویی NSAIDs و خود القاء LasR (3-oxo-C12-HSL) و مولکول شبه بنزوات موجود در جایگاه فعال PqsE، این ترکیبات می‌توانند، بهترین مهارکنندگان LasR و PqsE نامیده شوند.

P.aeruginosa به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفتری زوکسیم، کاربنی سیلین، سفالوتین 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 سیستم‌آشاری *P.aeruginosa* در سیستم کوثروم سنسینگ و اثرات آنیسی *PqsE* بر روی این سیستم است. به‌عبارت‌دیگر، با توجه به اینکه فلورهای 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 به‌نوعی 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 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.

در نتیجه اثربخشی بهتر ماده داروئی مورداستفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) می‌باشد.

اندازه‌گیری نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type Nottingham)

با کمک نمک تترازیلیوم، میزان نفوذ ماده داروئی (NSAIDs) را در بیوفیلم اندازه‌گیری و میزان رنگ قرمز که معیاری از زنده ماندن میکروب‌های اخل بیوفیلم می‌باشد (و همچنین میزانی نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم)، به کمک دستگاه Plate Reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و میانگین سه چاهک در هر گفته‌شده برای هر محلول از ماده‌های داروئی مشخص گردید (جدول ۷).

جدول ۷: اندازه‌گیری میزان نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم با

توبرامایسین در طول موج ۴۵۰ نانومتر	کتورولاک	ملوکسیکام	پیروکسیکام
۰/۱۷۸	۰/۳۶	۰/۲۸۱	به TTC (nM)
همراه ۲۵μL			
توبرامایسین			

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، در مقایسه با کنترل مثبت (جدول ۸) مشخص گردید، ماده داروئی مورداستفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) ورود و نفوذ توبرامایسین را به داخل بیوفیلم‌ها را تسهیل نموده و می‌تواند، تأییدی دیگر بر اثربخشی NSAIDs در مهار سیستم Quorum-sensing در باکتری *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type Nottingham) باشد.

جدول ۸: کنترل مثبت بیوفیلم بدون ماده داروئی به همراه نمک تترازیلیوم

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

بحث

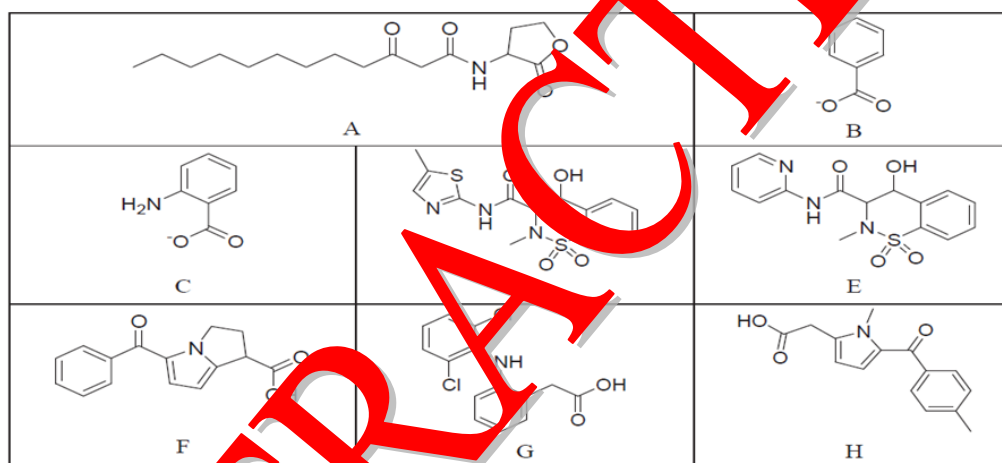
عفونت در زخم‌های سوختگی یکی از عوارض مهم و تعیین‌کننده سرانجام بیماران است. بیشتر عفونت‌های شدید و سپتی‌سمی‌ها و عفونت‌های ریوی به دنبال گسترش عفونت از محل زخم‌های سوختگی شدید ایجاد می‌شوند. در کشور ما شایع‌ترین باکتری که باعث ایجاد عفونت در این زخم‌ها می‌شود، باکتری *P.aeruginosa* است. این باکتری نقشی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

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 ویروانس مانند آگزوتوکسین A، آلکان پروتئاز و الاستاز را بر عهده دارد. مطالعه ساختار شیمیایی اکسیکام ها (پیروکسیکام و ملوکسیکام) نشان‌دهنده شباهت معنی دار این ترکیبات با 3-oxo-c12-HSL می‌باشد (شکل ۵).

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

در سیستم تنظیم LasR، LasI، 3-oxo-c12-HSL و واکنش می‌دهد. 3-oxo-c12-HSL دارای یک حلقه ۵ ضلعی



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

واکنش الکترواستاتیک با یون Fe^{2+} است. اگرچه آن‌ها می‌توانند، پیوندهای هیدروژنی با برخی از نواحی جایگاه فعال PqsE مانند تیروزین ۷۲ و آرژنین ۸۸ برقرار کنند.

آنالیز کمی بیوفیلیم

با توجه به اینکه جذب خوانده شده 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 آنتی‌بیوتیک توپراماسین 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

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 آگزوفوران 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 اکسیکام ها (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

اگزو پلی ساکاریدی (بیوفیلیم ها) 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 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 به‌خصوص سرکار خانم زهرا ثابتی نوقابی (سرپرست آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده) و همچنین جناب آقای دکتر وحید سهیلی، قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

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 بیوفیلیم‌ها را دارا بوده، و می‌تواند تأییدی دیگر بر اثربخشی NSAIDs در مهار سیستم Quorum-sensing در باکتری *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wildtype Nottingham) باشد.

با توجه به این که میکروب‌های زنده می‌توانند نمک تترازولیوم را احیاء کنند در پایان از مرحله سه‌چهارم رنگ قرمز کمتری باقی بماند، بیانگر زمان فعالیتهای کمتر میکروب‌ها (احیاء کمتر نمک تترازولیوم) می‌باشد. به عبارت دیگر، در بیشتر توبرامایسین در بیوفیلیم‌ها بیان کرده، و نشان‌دهنده اثربخشی بهتر و بیشتر NSAIDs می‌باشد.

شماره‌های از NSAIDs می‌توانند، به‌عنوان مهارکنندگان دوگانه پروتئین‌های LasR و PqsE در سیستم تنظیم‌شده عمل کنند. با توجه به شباهت ساختمانی NSAID طبیعی مانند پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک با مولکول‌های نفوذپذیر متعلق به دسته لاکتون‌های هموسرین N اسیله (AHLs) که توسط باکتری‌های بیوفیلیم به محیط پیرامون آزاد می‌شوند، شاید بتوان، از این گروه داروها جهت مهار سیستم Quorum sensing بهره جست، و با جلوگیری از تشکیل دیواره

References

1. Reid G. Biofilm in infectious disease and on medical devices. International journal of antimicrobial agents, 1999; 19(3): 223-228.
2. Sawhney R, Bhat 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 RhIR. *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(ε-caprolactone) (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; 47(29): 5039-48.
14. Garrett MM, Ruth H, Williams Michel FS, Ford KB, David SG, Arthur JO. Software news and updates AutoDock and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem*. 2009; 30(16): 2785–2791.
15. MOE. Chemical Computing Group Inc. 1010 Sherbrooke St West, Suite 200, Montreal, QC, Canada H3A 2R4 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):111-117.
19. Umaru T, Nwagbala CO, Kaur 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. Ahumada M, Diaz 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.