Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

This Article has been retracted due to conflict of interest issues.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 antibioticResistance By Identifying Dual Inhibitors and Using NSAIDs in Combination with Antibiotic Against Biofilm

Mohammad Besharati[1], **Ali ZhianiAsgharzadeh**[2], **Vahid Soheili**[3], **Bibi Sedig[illegible] Bazzaz**[3], **Majid Rajabian Noghondar**[1]

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: For avoiding 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 penetration 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.

Conclusion: 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.

RETRACTED

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 antibioticResistance 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 پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۴ – مهر و آبان ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

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 آنتی‌بیوتیک علیه بیوفیلم

محمد بشارتی[۱]، علی ژیانی اصغرزاده[۲]، وحید سهیلی[۳]، بی‌بی صدیقه فضلی بزاز[۳]، مجید رجبیان نقندر[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

اطلاعات مقاله

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

چکیده

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

مواد و روش کار: پس از انجام مطالعات مولکولی، NSAIDs در کنار آنتی‌بیوتیک توبرامایسین برای باکتری *P. aeruginosa* سویه PAO1، استفاده شد. دستگاه Plate Reader جذب محلول کریستال ویوله در اتانول را اندازه‌گیری کرد. میزان نفوذ [illegible] بیوفیلم، تهیه 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 LasR و PqsE انتخاب شد. با توجه به اینکه انجام کار با مهارکننده دوگانه بود، در نهایت 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 آنتی‌بیوتیک توبرامایسین کمتر بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به شباهت ساختمانی NSAID ها مانند پیروکسیکام و کتورولاک با لاکتون های هموسرین N (AHLs) این داروها، با مهار پروتئین‌های LasR و PqsE می‌توانند به‌عنوان مهارکنندگان سیستم Quorum-sensing به کار روند و مانع از بیماری‌زایی باکتری [illegible]

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

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

مقدمه

بیوفیلم ها زمانی که میکروارگانیسم‌ها 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 پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان، فاگوسیتوز و درمان‌های آنتی‌بیوتیکی دورنگه می‌دارد (۲).

درصد بالایی از عفونت‌های انسانی ناشی از این حقیقت است، که میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم به از بین رفتن توسط عوامل ضد میکروبی مقاوم‌اند (۳). درنهایت شناخت

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

بیوفیلم ها در عفونت‌های مزمن می‌تواند در انتخاب درمان مناسب به ما کمک نماید.

Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa) یک پاتوژن فرصت‌طلب است. این باکتری شایع‌ترین باکتری گرم منفی است که در عفونت‌های بیمارستانی یافت می‌شود، و مسئول پنومونی بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های خونی، زخم‌های جراحی، التهاب حاد ملتحمه، اوتیت مدیای حاد، اندوکاردیت و درماتیت است (۴). عفونت‌های ایجادشده 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، رامنولیپیدها، آلکالین پروتئاز، لکتین ها، اگزوتوکسین A و HCN. تولید این فاکتورهای سمی تحت کنترل quorum-sensing (QS) می‌باشد (۶). *P.aeruginosa* همچنین قادر است، بر فشارهای ایجادشده به‌وسیله آنتی‌بیوتیک‌های محدودکننده رشد غلبه نماید. بنابراین در این موردنیاز به درمان‌های آنتی میکروبیال جدید احساس می‌شود (۴).

دو مسیر کوئروم سنسینگ مرتبط اما متمایز در *P.aeruginosa* شناسایی‌شده‌اند. هر دو این سیستم‌ها به لحاظ ژنتیکی شبیه هستند، و شامل پروتئین‌های فعال‌کننده رونویسی کدگذاری ژن‌ها (lasR, rhlR) و هم‌چنین ژن‌های مسئول تولید مولکول‌های سیگنالینگ هموسرین لاکتون های N-آسیله می‌باشد (lasI, rhl) (۷). علاوه بر 3-oxo-c_{12}-HSL و C_4-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 زیست فعالی PQS به حضور RhIR بستگی دارد. جالب‌توجه است، که علاوه برافزایش تولید الاستاز LasB, PQS نیز برای القای بروز rhlI، که سنتز C4-HSL را کدگذاری می‌کند نشان داده‌شده است. این مشاهدات منجر به این نتیجه می‌شوند، که PQS به‌عنوان سیگنال اتصال‌دهنده، بین سیستم‌های کوئروم سنسینگ las, rhl 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 بیوفیلم و آزادسازی بسیاری از فاکتورهای ویرولانس سودوموناس، تحت QS انجام می‌شود (۱۰). PqsE بااینکه در تولید PQS نقشی ندارد، ولی نشان داده‌شده 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 گفته‌شده، ایجادکننده خصوصیات بیولوژیکی پروتئین نیست. این خصوصیات از ساختار سه‌بعدی ناشی می‌شوند (۱۱). امروزه بخش قابل‌توجهی از بیوانفورماتیک به ابداع ابزار الکترونیکی برای یافت رابطه بین توالی و ساختار سه‌بعدی اختصاص‌یافته است (این زمینه تخصصی، بیوانفورماتیک [illegible]ی نامیده می‌شود) (۱۱). توبرامایسین در آزمایشگاه، بسیاری از سویه‌های استافیلوکوک ها و کلی فرم‌ها و سایر باکتری‌های گرم منفی را مهار می‌کند. این آنتی‌بیوتیک تا حدودی [illegible] باکتریایی جنتامایسین را با چند استثناء [illegible] (۱۱).

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) 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 [illegible] و PqsE ابتدا به کمک نرم‌افزارها و مدل‌های کامپیوتری و [illegible] 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 بیوفیلم *P.aeruginosa* به‌ویژه در بیماران مبتلابه 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

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

شامل ViewerLite 4.2 (available at http://viewerlite.software.informer.com)، ChemBioOffice Ultra 8.0 (accessible at http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemBioOffice)، HyperChem 7.0 (presented at http://www.hyper.com)، MOE (2009)، AutoDock1 tools 1.5.4 و Swiss PDB viewer 3.7 (۱۵) (۱۶) انجام گرفت. برای تشخیص فعالیت مهاری NSAIDs علیه LasR و PqsE در ترکیب شامل پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک انتخاب شدند. ابتدا هر یک از مولکول‌های موردمطالعه توسط نرم‌افزار ChemBioOffice Ultra 8.0 کشیده و رسم شدند و بهینه‌سازی انرژی (minimized-energy) توسط نرم‌افزار HyperChem 7.0 انجام شد. سپس ساختار سه‌بعدی 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 سوبسترای موجود در جایگاه فعال هر پروتئین (در پروتئین LasR سوبسترا هموسرین لاکتون و در پروتئین PqsE سوبسترا 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 موردنظر، پروتئین و لیگاند را در نرم‌افزار AutoDock در محیط سیستم‌عامل لینوکس کپی کرده و پروتئین را ویرایش کردیم. سپس لیگاند را بازکرده و به‌صورت 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 نرم‌افزار 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 به‌صورت 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 نرم‌افزار Swiss pdb viewer ابتدا لیگاند و پروتئین باهم ادغام شد، و سپس با نرم‌افزار ViewrLite کوفاکتورها و H باندها را دوباره اضافه کردیم. این کار برای تمام NSAIDs موردمطالعه انجام شد، و بهترین نتیجه به‌دست‌آمده از داکینگ هر لیگاند با پروتئین مقایسه شد. سپس وارد فاز آزمایشگاهی برای اثبات نظریه تئوری شدیم. غلظت ۱۰^۴ از باکتری *P.aeruginosa* (حداقل غلظت موردنیاز 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 مورداستفاده است که می‌تواند، رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند. برای این منظور ۲۰µL از غلظت ۱۰^۴cfu/mL کشت تازه تهیه‌شده میکروب *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type, Nottingham) با ۱۸۰µL از ۸ غلظت مختلف پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک (جدول ۲)، در محیط کشت مولر مایع غنی‌شده با گلوکز (با نسبت ۱ به ۹) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد.

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	۰/۰۰۷۸mg/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

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

این پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت انکوبه شد. سپس جهت تعیین MIC از نمک تترازولیوم (TTC) (۵mg/mL) استفاده شد. برای این منظور پس از پایان انکوباسیون، ۲۰µL نمک [illegible] 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 اندازه گیری شد. لازم به توضیح می‌باشد، که ماده‌های داروئی مورد استفاده به‌صورت محلول اشباع ساخته‌شده و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳: میزان غلظت اشباع ماده‌های داروئی مورد استفاده پس از انحلال در محیط کشت مولر هینتون

ماده دارویی	کتورولاک	ملوکسیکام	سیپروکسیکام
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)

۲۰µL از غلظت 10^4cfu/mL کشت تازه تهیه‌شده میکروب *P.aeruginosa* سویه PAO1 با ۱۸۰µL 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 ۱۸۰µL از محیط کشت غنی‌شده، حاوی ماده داروئی (NSAIDs) که غلظت موردنظر آن با توجه به نتایج مرحله قبل انتخاب‌شده همراه با ۲۵µL آنتی‌بیوتیک توبرامایسین با غلظت ۱mg/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 چسبیده به ته چاهک‌ها سه مرتبه با نرمال سالین استریل شستشو داده شد، تا باکتری‌ها بااتصال ضعیف حذف و سپس در معرض هوا خشک شد. بیو فیلم باقی‌مانده در این مرحله به کمک محلول کریستال ویوله ۰/۰۳ 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 بیوفیلم ها 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 طول‌موج 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 [illegible] در بخش یافته‌ها بیان خواهد شد).

اندازه‌گیری میزان نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم

این مر[illegible] به کمک نمک تترازولیوم (TTC) انجام شد. روش [illegible] کار مانند مرحله [illegible]شته (در معرض قرار دادن بیوفیلم در ۱۲ ساعت پایانی [illegible]شت توسط NSAIDs) می‌باشد، با این تفاوت که در [illegible] ۴۸ ساعت انکوبه [illegible] پلیت ها و پس از سه بار شستشوی چاهک‌ها با نرمال سالین استریل دوباره چاهک‌ها با ۱۷۵µL محیط کشت (مشابه ۲ ساعت پایانی) به همراه µL ۲۵ توبرامایسین پرشده، و [illegible] ۴۰µL [illegible] تترازولیوم (TTC) با غلظت ۵mg/mL اضافه شد [illegible] در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس‌ازاین مد[illegible] میزان رنگ قرمز که معیاری از زنده ماندن میکروب‌های [illegible]خل بیوفیلم می‌باشد (و همچنین میزانی از نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم)، به کمک دستگاه Plate Reader در طول‌موج 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 گرفته‌شده 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.

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

یافته‌ها

جایگاه فعال پروتئین

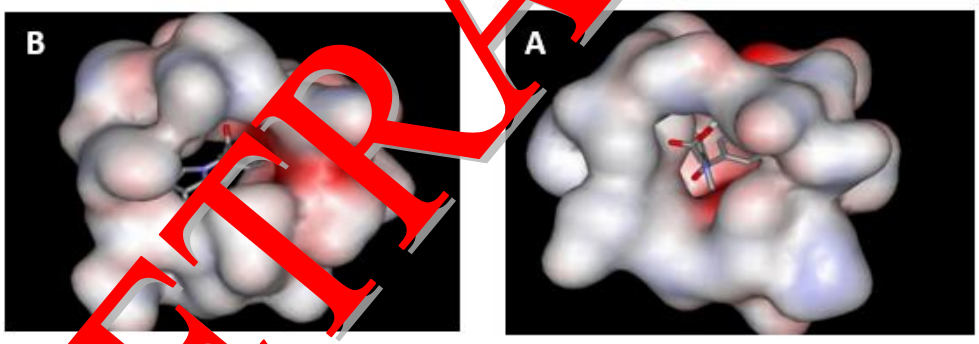
پیش از حذف لیگاند جایگاه فعال شناسایی شد، و در انتها توانستیم، لیگاند جدید را در این جایگاه جایگزین کنیم. برای شناسایی جایگاه فعال پروتئین پیدا کردن اسیدهای آمینه پیرامون این جایگاه ضروری است (جدول ۴).

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

پروتئین	PqsE				LasR			
اسیدهای آمینه جایگاه فعال	His۷۱	His[illegible]	Phe۱۹۵	Leu۲۷۷	Leu۳۶	Arg۶۱	Thr۷۵	Thr۱۱۵
	Thr۷۲	Asp[illegible]	His۲۲۱	His۲۸۲	Ile۵۲	Tyr۶۴	Val۷۶	Ala۱۲۷
	Asp۷۳	Glu۱۸۲	Ser۲۷۳	Ser۲۸۵	Tyr۵۶	Ala۷۰	Trp۸۸	Ser۱۲۹
		Leu۱۹۳	Phe۲[illegible]	Met۲۸۶	Trp۶۰	Asp۷۳	Phe۱۰۱	

ساخت نقشه برای ماکرومولکول و لیگاند

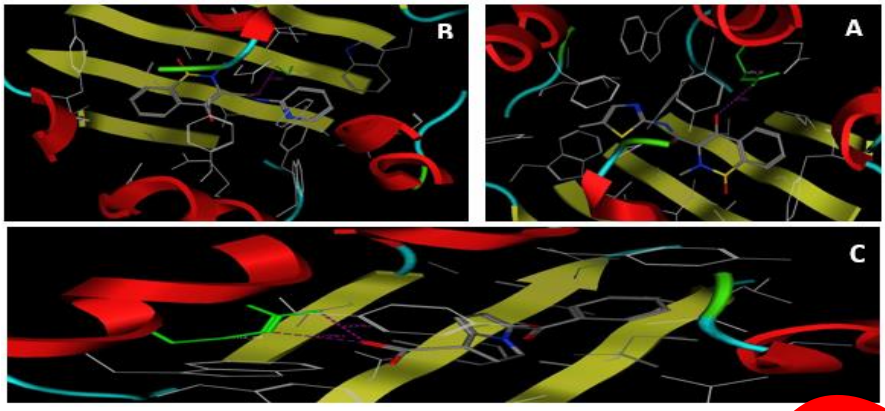
در انتها و پس از ساخت نقشه، یعنی تعریف جایگاه فعال پروتئین و اسیدهای آمینه آن برای برهمکنش پروتئین (LasR و PqsE) و لیگاند (NSAIDs)، لیگاند جدید (NSAIDs) در جایگاه فعال پروتئین داک شد (شکل ۱).



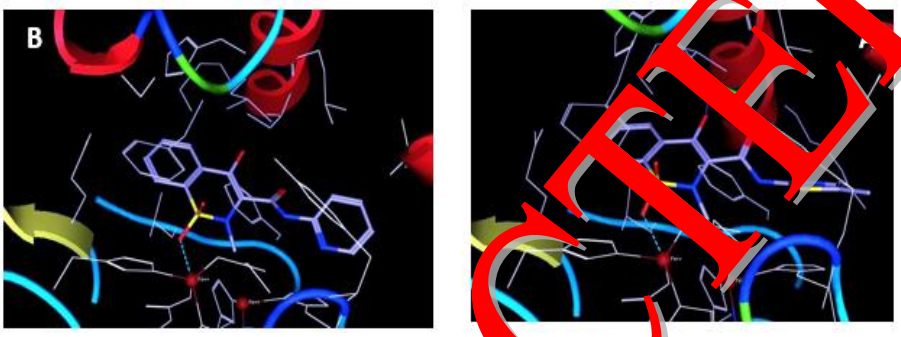
شکل ۱: جایگاه فعال PqsE – کتورولاک (A)، پیروکسیکام (B)

پس از داکینگ و جدا کردن بهترین نتیجه از بین ۵۰ نتیجه به‌دست‌آمده، برای هر مولکول NSAID و ادغام دوباره آن با پروتئین موردنظر به کمک نرم‌افزارهای مختلف و در مرحله بعد، ویرایش پروتئین، یعنی اضافه کردن هیدروژن‌ها و بارهای منفی شکل‌های آن به دست آمد (شکل ۲ و ۳).

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

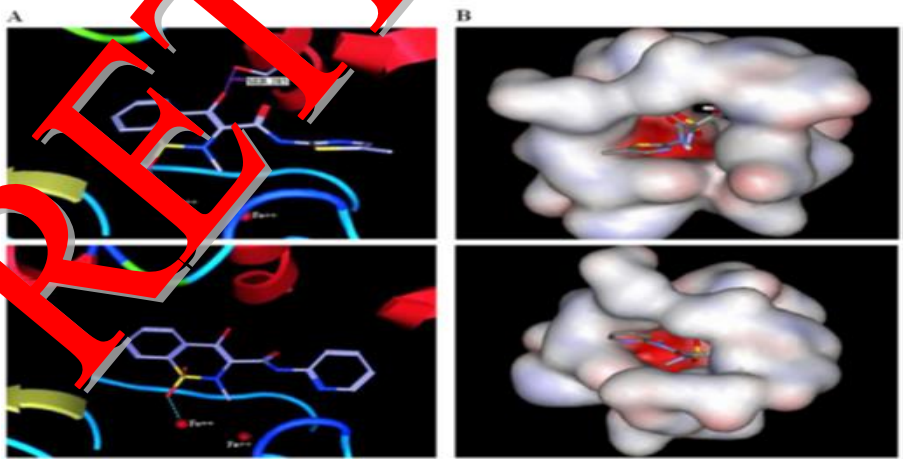


شکل ۲: باندهای هیدروژنی LasR – ملوکسیکام (A)، پیروکسیکام (B)، کتورولاک (C)



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

با توجه به نتایج مدل‌سازی مولکولی، ملوکسیکام با ترین ۲۸۵ جایگاه فعال PqsE باند هیدروژنی تشکیل داده، و با Fe^{2+} این جایگاه، پیوند الکترواستاتیک برقرار می‌کند. به‌علاوه، بخش یازولی ملوکسیکام با هیستیدین ۷۱ جایگاه فعال PqsE واکنش می‌دهد، در پیروکسیکام یک پیوند قطبی بین حلقه پیریمیدین آن با اسیدآمینه برقرار می‌شود (شکل ۴).



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

RETRACTED

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

لیگاندها به‌صورت چسبیده و جسم‌های کروی قرمزرنگ ترکیبات آهن‌دار را نشان می‌دهند. باندهای الکترواستاتیک و هیدروژنی با نقطه‌های آبی و ارغوانی مشخص‌شده‌اند.

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. به‌عبارت‌دیگر 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).

جدول ۵: نتایج داکینگ 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 = -۸/۳۶ 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

یافته‌های ما در این پروژه نشان داد که میل ترکیبی پیروکسیکام و ملوکسیکام با جایگاه فعال PqsE در حدود برابر بیشتر از بنزوات و ۲ برابر بیشتر از آنترانیلات می‌باشد. این توانایی و پتانسیل می‌تواند، مربوط به باندهای هیدروژنی 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 هردوی این گروه‌ها اندازه یکسانی دارند (۲۴۳/۵ cm^3/mol versus ۲۵۶/۵ cm^3/mol و ۲۶۸/۵ cm^3/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 داروئی NSAIDs و خود القاء گر LasR (3-oxo-C12-HSL) و مولکول شبه بنزوات موجود در جایگاه فعال PqsE، این ترکیبات می‌توانند، بهترین مهارکنندگان LasR و PqsE نامیده شوند.

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

آنالیز کمی بیوفیلم

همان‌گونه که در روش اجرا بیان شد، پس از تهیه بیوفیلم های *P.aeruginosa* و افزودن ماده داروئی به آن‌ها، جذب کریستال ویوله موجود در محلول اتانول به‌عنوان معیاری از میزان بیوفیلم تشکیل‌شده، به کمک دستگاه Plate Reader در طول‌موج ۵۹۰ نانومتر خوانده‌شده است (جدول ۶).

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

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

هر چه مقدار جذب به‌دست‌آمده در این مرحله پائین تر از کنترل مثبت باشد (جدول ۶)، بیانگر تشکیل بیوفیلم کمتر و

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

درنتیجه 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 تترازولیوم، میزان نفوذ ماده داروئی (NSAIDs) را در بیوفیلم اندازه‌گیری و 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 طول‌موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و میانگین سه چاهک در نظر گرفته‌شده برای هر ماده از ماده‌های داروئی مشخص گردید (جدول ۷).

جدول ۷: اندازه‌گیری میزان نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم با توبرامایسین در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر

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

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 بیوفیلم ها را تسهیل نموده و می‌تواند، تائیدی 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 تترازولیوم

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

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، سفتی 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. درواقع 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 بیوفیلم های باکتریایی می‌گردد (۱۹).

در این مطالعه LasR و PqsE به‌عنوان پروتئین‌های هدف مناسب انتخاب شد، که دلیل این گزینش نقش مهم LasR در آغاز سیستم آبشاری *P.aeruginosa* در سیستم کوئروم سنسینگ و اثرات القایی PqsE بر روی این سیستم است. به‌عبارت‌دیگر، با توجه به اینکه فاکتورهای محیطی باعث بیان ژن‌های *lasR* و *lasI* می‌گردد، براین دو پروتئین LasR و LasI تولید می‌شوند. LasR باتصال به ترکیبی که توسط LasI بیان می‌شود، کمک به تولید مواد سمی و زیرساخت‌های موردنیاز برای تولید بیوفیلم می‌نماید. LasR نیز در طی مراحلی باعث تولید زیر واحدهای PQS می‌شود، اما PqsE نیز بنحوی در تولید PQS نقشی ندارد، ولی نشان داده‌شده 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 (۱/۱ ±۱۰/۷ μM و ۴/۸ ±۲۹/۱ =ki) با PqsE ایجاد نمایند (۸).

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

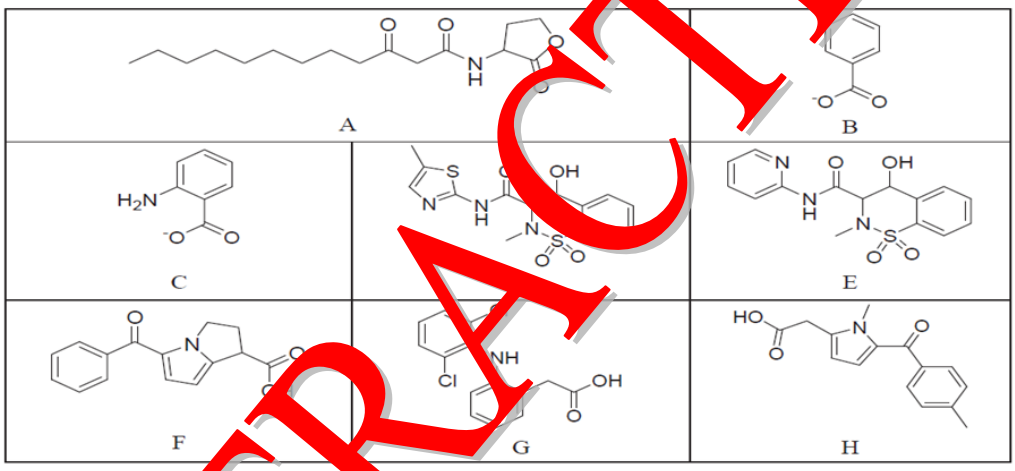
Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

ازآنجاکه شواهد زیادی وجود دارد، که داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌توانند، تأثیر منفی بر ایجاد بیوفیلم های *P.aeruginosa* داشته باشند (۲۰)، این مولکول‌ها انتخاب‌شده، و اثرات آن‌ها بر روی LasR و PqsE [illegible] رسی قرار گرفتند.

در سیستم تنظیمی Las، LasR، 3-oxo-c12-HSL [illegible] واکنش می‌دهد. 3-oxo-c12-HSL [illegible] برای 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 ویرولانس مانند اگزوتوکسین A، آلکالن 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).



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

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 تیازول 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 درنتیجه 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 واکنش الکترواستاتیک با یون Fe^{2+} [illegible] اگرچه آن‌ها می‌توانند، پیوندهای هیدروژنی با برخی [illegible] های جایگاه فعال PqsE مانند تیروزین ۷۲ و آرژنین ۸۰ [illegible] برقرار کنند.

آنالیز کمی بیوفیلم

با توجه به اینکه جذب خوانده‌شده در این مرحله، در طول‌موج ۵۹۰ نانومتر، پائین تر از کنترل مثبت بود (جدول ۶)، این نتایج بیانگر تشکیل بیوفیلم کمتر و درنتیجه اثربخشی بهتر آنتی‌بیوتیک توبرامایسین در کنار ماده داروئی مورداستفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) می‌باشد.

میزان نفوذ ماده داروئی در بیوفیلم های *P.aeruginosa* سویه PAO1

با کمک نمک تترازولیوم و پس از اندازه‌گیری میزان نفوذ ماده داروئی (NSAIDs) را در بیوفیلم توسط دستگاه Plate

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

Reader در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر و مقایسه با کنترل مثبت (جدول ۷) مشخص گردید، ماده داروئی مورداستفاده (پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک) توانائی تسهیل ورود و نفوذ توبرامایسین به داخل بیوفیلم ها را دارا بوده، و می‌تواند تائیدی دیگر بر اثربخشی NSAIDs در مهار سیستم Quorum-sensing در باکتری *P.aeruginosa* سویه PAO1 (Wild type Nottingham) باشد.

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

شماری از NSAIDs می‌توانند، به‌عنوان مهارکنندگان دوگانه پروتئین‌های LasR و PqsE در سیستم کوروم سنسینگ عمل کنند. با توجه به شباهت ساختمانی NSAID هایی مانند پیروکسیکام، ملوکسیکام و کتورولاک با مولکول‌های کم نفوذپذیر متعلق به دسته لاکتون های 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 اگزو پلی ساکاریدی (بیوفیلم ها) مانع تکثیر و تهاجم و درنتیجه بیماری‌زایی *P.aeruginosa* گردید. درنتیجه 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 جراحت یا سوختگی شده باشند، می‌توان با بهره‌گیری از NSAIDs در کنار درمان آنتی‌بیوتیکی، دوز آنتی‌بیوتیک موردنظر برای درمان را کاهش داد و درنتیجه 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 انجام‌شده است. نویسندگان از همراهی و کمک‌های مسئولین و اساتید مربوطه به‌خصوص سرکار خانم زهرا ثابتی نوقابی (سرپرست آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده) و همچنین جناب آقای دکتر وحید سهیلی، قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Reid G. Biofilm in infection disease and on medical devices. International journal of antimicrobial agents, 1999. 199[illegible]11(3[illegible]): 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.

Downloaded from ijmm.ir at 1:08 +0330 on Monday December 17th 2018

RETRACTED

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 E, 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(4):11.

19. Umaru T, Nwaoha 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. Ahumedo M, Díaz A, Vargas-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.