Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2022; Vol. 46; No. 3

Effect of Curcumin Nanoparticles on Biofilm Gene Expression in Pseudomonas Aeruginosa

Reyhaneh Dariushy[1], Fatemeh Ashrafi[2*]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

Received: November 03, 2021; Accepted: February 08, 2022

Abstract

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important nosocomial pathogens. One of the therapeutic problems of this bacterium is antibiotic resistance, which is associated with biofilm production. The aim of the present study was to investigate the effect of curcumin nanoparticles on biofilm gene expression in *Pseudomonas aeruginosain vitro*.

Methods: In the present *in vitro* study, 50 *Pseudomonas aeruginosa*isolates were collected from Firoozgar Hospital. The prevalence of *pil*A, *alg*X, *las*I, and *est*A genes was determined using PCR, biofilm formation ability using microtiter plate, and MIC for curcumin nanoparticles using microdilution broth method. Also, in order to investigate the inhibition effect of curcumin nanoparticle on gene expression, Real-time PCR was run. Data were analyzed using REST 2009 and GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.). The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to evaluate the mean changes in the expression of the studied genes compared to the control sample in the presence of 16srRNA internal control gene. P-value <0.05 was considered as significant.

Results: The prevalence of *pil*A, *alg*X, *las*I and *est*A genes were 40%, 100%, 100%, and 94%, respectively. In addition, 38% of strains formed strong biofilm, 54% moderate, and 8% weak. The MIC values for all strains and PAO1 positive control strains were the same with the concentration of 128 µg / ml of nanoparticles. The expression levels of *pil*A, *alg*X, and *las*I decreased by 1.91, 2.9, and 3.98 folds, respectively, but *est*A gene expression increased by 0.19. These observed changes in gene expression were found to be statistically significant (P-value <.05).

Conclusion: Due to the inhibitory effect of nanocurcumin on genes involved in the formation of *Pseudomonas aeruginosa*biofilm, it is possible that this nanoparticle could be used as a therapeutic option against this bacterium and to inhibit the genes involved in its virulence.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilm; Nanocurcumin; virulence; Real-time PCR

Please cite this article as: Dariushy R, Ashrafi F. Effect of Curcumin Nanoparticles on Biofilm Gene Expression in Pseudomonas Aeruginosa. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(3):95-104.

[*]**Corresponding Author:** Fatemeh Ashrafi; Email: mnfa.ashrafi@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۶، شماره ۳، سال ۱۴۰۱ شمسی، صفحات ۹۵ تا ۱۰۴

بررسی اثرات نانوذره ی کورکومین بر روی بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا

ریحانه داریوشی[۱]، فاطمه اشرفی[۲*]

۱- گروه تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.
۲- گروه تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای بیمارستانی مطرح است. یکی از مشکلات درمانی این باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن به درمان‌های رایج آنتی‌بیوتیکی است که با تولید بیوفیلم مرتبط است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نانوذره کورکومین بر روی بیان ژن بیوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

روش کار: در مطالعه تجربی (*in vitro*) حاضر تعداد ۵۰ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* از بیمارستان فیروزگر جمع‌آوری شد. شیوع ژن‌های *pilA*، *algX*، *lasI* و *estA* با استفاده از PCR، درت تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت و MIC برای نانوپارتیکل کورکومین با استفاده از روش میکرودایلوشن براث تعیین شد. به منظور بررسی تاثیر بازدارندگی نانوپارتیکل کورکومین بر بیان ژن‌های مورد بررسی، از تکنیک مولکولی Real-time PCR استفاده شد. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری REST 2009 و GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc) تجزیه و تحلیل شدند. آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis Test) برای بررسی میانگین تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به نمونه کنترل در حضور ژن کنترل داخلی *16srRNA* استفاده شد و (P-value<۰/۰۵). معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: شیوع ژن‌های *pilA*، *algX*، *lasI* و *estA* به ترتیب ۴۰ درصد، ۱۰۰درصد، ۱۰۰درصد و ۹۴ درصد بود. ۳۸ درصد سویه‌ها تولیدکننده بیوفیلم قوی، ۵۴ درصد متوسط و ۸درصد ضعیف بودند. مقدار MIC برای همه جدایه‌ها و سویه کنترل مثبت PAO1 یکسان و غلظتی معادل ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذره بود. میزان بیان ژن‌های *pilA*، *algX* و *lasI* به ترتیب ۱/۹۱، ۲/۹ و ۳/۹۸ بار کاهش یافت. اما میزان بیان ژن *estA* ۰/۱۹ افزایش نشان داد. تغییرات مشاهده شده در بیان ژن از لحاظ آماری معنادار بود (P-value < ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با توجه به تاثیر مهاری نانوکورکومین بر ژن بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* احتمالا بتوان از این نانوذره به عنوان یک گزینه درمانی علیه این باکتری و مهار ژن ویرولانس آن استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*؛ بیوفیلم؛ نانوکورکومین؛ ویرولانس؛ Real-time PCR

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Dariushy R, Ashrafi F. Effect of Curcumin Nanoparticles on Biofilm Gene Expression in Pseudomonas Aeruginosa. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(3):95-104.

[*] نویسنده مسئول مکاتبات: فاطمه اشرفی؛ آدرس پست الکترونیکی: mnfa.ashrafi@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری باسیل گرم منفی و اکسیداز مثبت است که دارای ژنوم بزرگ، انعطاف‌پذیری متابولیک و سیستم تنظیمی قابل انطباق است که این باکتری را قادر به زنده ماندن در هر جایگاهی می‌کند (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی است که قادر به ایجاد عفونت‌های مزمن و پیچیده است و از طرفی کسب مکانیسم های مقاومت دارویی متعدد به دلیل نفوذپذیری پایین غشای خارجی و حضور پمپ‌های افلاکس متعدد به معضلات درمانی عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌افزاید. همچنین قدرت تشکیل بیوفیلم و تجمع‌های باکتری با شدت بالا در سطوح مخاطی یا سطح ابزار پزشکی سبب ایجاد چالش‌های زیادی در سیستم بهداشتی جوامع شده است (۲). عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* شامل پنومونی بیمارستانی، سپتی سمی، عفونت‌های ادراری، عفونت سوختگی و زخم هستند که اغلب در بیماران با نقص در سیستم ایمنی، سوختگی‌های شدید، سرطان، نوتروپنی و سیستیک فیبروزیس ایجاد می‌شوند (۳). *سودوموناس آئروژینوزا* عامل ۱۷ درصد موارد پنومونی وابسته به ونتیلاتور، ۹ درصد پنومونی‌های بیمارستانی، ۱۰ درصد عفونت‌های ادراری وابسته به کاتتر و ۶ درصد عفونت‌های جراحی است (۴). این باکتری سالانه سبب شش میلیون مورد بستری در بیمارستان و بیش از چهار میلیون مورد مرگ و میر می‌شود (۵). عفونت‌های تنفسی حاد در بیماران با ضعف سیستم ایمنی مانند افراد مبتلا به ایدز و بیماران سرطانی ایجاد می‌شود در حالی که نوع مزمن عفونت تنفسی ناشی از این باکتری در بیماران سیستیک فیبروزیس دیده می‌شود (۵). توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در ویرولانس این باکتری دارد. این باکتری پلی‌ساکارید خارج سلولی تولید می‌کند که سبب تشکیل بیوفیلم می‌شود. این ساختار در ایجاد عفونت‌های این باکتری بسیار مؤثر است. بیوفیلم نه تنها میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده آن را از تیمار بهداشتی محافظت می‌کند، بلکه محلی برای مبادله مواد ژنتیکی است. اصولاً باکتری‌ها وقتی بیوفیلم تشکیل می‌دهند، مقاومت آنها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می‌شود. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری‌ها آزاد هستند، ولی پایداری ژنتیکی در آنها بیشتر است و پلاسمیدها در بیوفیلم پایدارتر هستند. بیوفیلم باکتری را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌بادی‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز مقاوم می‌کند (۸-۶). سلول‌های پلانکتونیک با سلول‌های سیسیل از لحاظ بیان ژن‌ها تفاوت آشکاری دارند. به کمک مطالعات ژنتیک، برخی ژن‌های دخیل در تشکیل و توسعه بیوفیلم باکترهای گرم منفی با ایجاد موتاسیون شناسایی شده‌اند. برای مثال برای تبدیل حالت پلانکتونیک (آزادزی) به حالت سیسیل بیان برخی از ژن‌ها مانند *pilA* و *algX* افزایش می‌یابد (۹).

به دلیل ظهور سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو (MDR) در کشورهای در حال توسعه، درمان مکمل برای کنترل عفونت‌های مرتبط با این باکتری‌ها می‌تواند بسیار مفید باشد (۱۰). اخیراً، استفاده از مواد فیتوشیمیایی گیاهی با سابقه طولانی در موارد پزشکی در انسان برای کنترل بیوفیلم‌ها به دلیل غیر سمی بودن آنها بررسی شده است (۱۱، ۱۲). نشان داده شده است که ترکیب فنلی (کورکومین) Curcuma longa (زردچوبه) می‌تواند از تشکیل بیوفیلم در چندین باکتری مانند *سودوموناس آئروژینوزا* جلوگیری کند (۱۱، ۱۳). مکانیسم‌های متفاوتی برای فعالیت ضد بیوفیلمی کورکومین در برخی از مطالعات پیشنهاد شده است، اما مکانیسم مولکولی کورکومین برای مهار بیوفیلم هنوز نامشخص است. کورکومین ممکن است با تغییر در بیان ژن‌های تنظیم‌کننده مرتبط با مسیرهای سیگنال‌دهی *سودوموناس آئروژینوزا* بر تشکیل بیوفیلم تأثیر بگذارد. کورکومین دارای حلالیت کمی در محلول‌های آبی است که منجر به انتشار بافتی کمتر می‌شود. فرمولاسیون نانوذرات کورکومین (نانوکورکومین) نسبت به کورکومین محلول‌تر است و در برابر هیدرولیز آنزیمی مقاوم‌تر است. علاوه بر این، نانو کورکومین جذب بافتی را افزایش داده و همچنین نیمه عمر طولانی‌تری نسبت به کورکومین دارد که بررسی اثرات آن بر تشکیل بیوفیلم را مناسب‌تر می‌کند (۱۱). با توجه به تأثیر ترکیبات گیاهی روی بیوفیلم باکتری‌های مختلف از جمله *سودوموناس آئروژینوزا*، امروزه محققان بر آن هستند که با

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

مطالعات بیشتر روی ترکیبات دقیق ساختار بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* بتوانند به صورت دقیق این ساختار را مورد هدف دارویی قرار دهند. همچنین استفاده از ترکیبات پروتئینی ساختار بیوفیلم این باکتری می‌تواند به عنوان واکسن برای مهار ایجاد عفونت بیوفیلمی بکار برده شود. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نانوذره کورکومین بر روی بیان ژن بیوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

روش کار

جمع آوری نمونه:

در مطالعه تجربی (in vitro) حاضر که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، تعداد ۵۰ جدایه *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های ادراری بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان فیروزگر شهر تهران جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات منتقل شد. با استفاده از تست‌های روتین آزمایشگاهی از قبیل رشد در محیط مک کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI، بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار (۱۴)، تعداد ۵۰ نمونه ایزوله به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* در نظر گرفته شد.

طراحی پرایمر، استخراج DNA و انجام PCR:

استخراج DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA (Roche,Germany) انجام گرفت. حضور ژن‌های *pil*A ، *alg*X، *est*A و *las*I با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که در مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزارهای الیگو ۷ (oligo 7.60) و پرایمر ۳ (Primer 3 Web) (جدول ۱) طراحی شد، مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (مخلوط واکنش ۷ میکرولیتر مستر میکس (Ampliqon Co., Denmark) ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۱ میکرولیتر DNA باکتری و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر استریل) در طی ۳۵ سیکل، شامل: مرحله اولیه بـــاز شـــدن دو رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله باز شدن دو رشته DNA ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمرها مطابق جدول ۱ و به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله طویل شدن رشته هدف بـــه مـــدت ۶۰ ثانیه دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصد، ارزیابی شد.

جدول ۱- توالی‌های پرایمرهای طراحی شده

ژن		توالی پرایمر ($5' \rightarrow 3'$)	اندازه محصول PCR (bp)	دمای انیلینگ (°C)	مرجع
*pil*A	F	GATCATCGGTATCCTGGCGG	۱۱۱	۶۰	مطالعه حاضر
*alg*X	F	GCCGAAGATCCTCATCTGGG	۱۳۰	۶۰	مطالعه حاضر
	R	CTTGACCTTGCGGCTGAGTA			
*est*A	F	ATTCCGTTGAACATCCCGCT	۹۵	۶۰	مطالعه حاضر
	R	AAACAGGTGCCGATCAGGTT			
*las*I	F	GTTTTCGGTTGCTGGCGAAT	۱۲۳	۶۰	مطالعه حاضر
	R	GAAACGGCTGAGTTCCCAGA			
16srRNA	F	GCCCTCAAGTTCGATTTCGC	۹۹	۵۸	(۱۵)
	R	ATGGAAGATCAGTGGCGTGG			

بررسی تشکیل بیوفیلم ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به روش میکروتیترپلیت:

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار (Merck) حاوی ۱درصد گلوکز کشت داده و به مدت ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ازکلنی‌های تک رشد کرده بر روی محیط جامد به ۱۰ میلی‌لیتر محیط مایع TSB حاوی ۱درصد گلوکز تلقیح شد و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. بعد از رسیدن کدورت به نیم مک فارلند، از سوسپانسیون تهیه شده ۲۰۰ میکرولیتر داخل چاهک‌های میکروپلیت ریخته و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد، سپس فاز رویی هر چاهک را بیرون ریخته و چاهک‌ها چهار مرتبه با PBS شستوشو داده شدند. در مرحله بعد پلیت‌ها به مدت یک ساعت

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا کاملاً خشک شود. سپس رنگ‌آمیزی با رنگ کریستال ویوله به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت، سپس رنگ موجود در چاهک‌ها را بیرون ریخته پلیت توسط آب شست‌وشو داده شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاوی اتانول۷۰ درصد و ایزوپروپیل الکل ۱۰درصد به چاهک‌ها افزوده و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) قرائت شد. این آزمون با سه بار تکرار برای هر نمونه باکتری انجام گرفت و یک چاهک که تنها حاوی محیط کشت تریپتیکاز سوی براث حاوی ۱درصد گلوکز بود به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. از سویه *Pseudomonas aeruginosa*ATCC27853 نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سویه‌هایی که متوسط جذب نوری آنها بیش از سه برابر انحراف معیار مربوط به نمونه کنترل منفی (TSB حاوی ۱درصد گلوکز) بود از نظر تولید بیوفیلم به عنوان مثبت در نظرگرفته شدند (۷). نمونه‌های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلم (غیر چسبنده)، نمونه‌های با OD بین ۰/۱ تا ۰/۲ به عنوان بیوفیلم ضعیف (چسبنده ضعیف)، نمونه‌های با OD بین ۰/۲ تا ۰/۳ به عنوان بیوفیلم متوسط (چسبنده متوسط) و نمونه‌های با OD بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلم قوی (چسبنده قوی) ارزیابی در نظر گرفته شدند (۱۶).

آماده‌سازی سوسپانسیون نانو ذرات کورکومین:

برای تهیه محلول استوک نانوذرات کورکومین، از دی متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان حلالی کمکی استفاده شد. برای این منظور ۱۰ گرم از نانوذره کورکومین (Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) در یک لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به صورت سوسپانسیون تهیه شد و از دستگاه التراسونیک (SONOREX SUPER RK 31 H Bandelin) به مدت زمان ۳۰ دقیقه برای پراکنده شدن مناسب آنها استفاده شد (۱۷).

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) کورکومین:

حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) کورکومین برای ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزایی* که حاوی هر ۴ ژن مورد مطالعه و تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند با استفاده از روش میکرودایلوشن براث تعیین شد. برای این منظور درون هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث استریل ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کورکومین با رقت بالا (۱۰۲۴ µg/mL) به ردیف اول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث اضافه شد و رقیق‌سازی تا رقت ۸ µg/mL انجام گرفت. سپس به تمامی چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. سوش استاندارد PAO1 *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان سویه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. همچنین از دو ردیف چاهک به عنوان کنترل مثبت (محیط و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی تست (محیط + نانوذره کورکومین) استفاده شد. پس از آن میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند (۱۸).

واکنش Real-time PCR:

به کمک کیت استخراج RNA (Roche, Germany) و طبق پروتکل شرکت سازنده RNA کل ۲۰ نمونه از محیط حاوی غلظت Sub-MIC کورکومین با استفاده از کیت Roche استخراج شد. این نمونه‌ها تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند و سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت تاکارا (Takara, Tokyo, JaPan) انجام شد. از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ برای تکثیر ژن‌های *pil*A، *alg*X، *las*I و *est*A استفاده شد. ژن *16SrRNA* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. Real Time PCR به صورت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه و سپس ۴۰ سیکل در مرحله اول در دمای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و سپس در مرحله دوم در ۵۸ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و سپس در مرحله سوم در ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه Rotor-Gene thermal cycler (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) انجام شد. برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزارهای REST 2009 و GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc) استفاده شد. نوع روش استفاده شده در این مطالعه برای Real-time PCR نسبی (Relative) و از رنگ سایبرگرین (Ampliqon Co, Denmark) به عنوان شناساگر استفاده شد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

نتایج به روش CTΔΔ یا روش لیواک (Livak method) آنالیز شد. هر تست ۳ بار به صورت مستقل انجام شد (۱۹).

آنالیز آماری:

داده ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری REST 2009 و GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc) تجزیه و تحلیل شدند. آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis Test) برای بررسی میانگین تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به نمونه کنترل در حضور ژن کنترل داخلی *16srRNA* استفاده د و P-value < ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

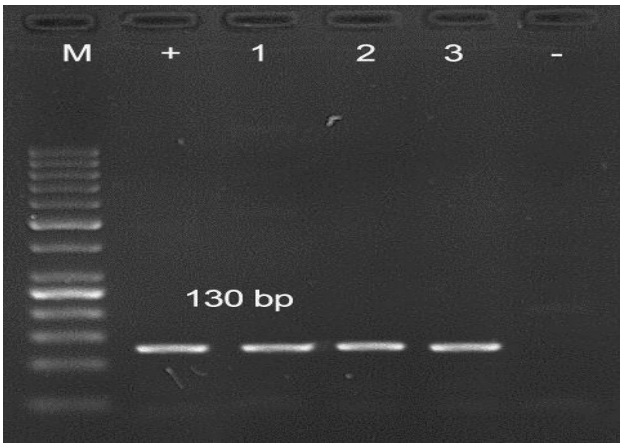
یافته‌ها

جداسازی و تشخیص ایزوله‌ها از نمونه‌های بالینی و ارزیابی تشکیل بیوفیلم:

در این مطالعه در مجموع ۵۰ ایزوله با استفاده از تست‌های تشخیصی و تاییدی میکروبیولوژی/بیوشیمیایی، به عنوان باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی و تعیین هویت شدند. ۳۸درصد (۱۹/۵۰) سویه‌ها دارای قدرت تشکیل بیوفیلم بالا، ۵۴ درصد (۲۷/۵۰) متوسط و ۸ درصد (۴/۵۰) ضعیف بودند.

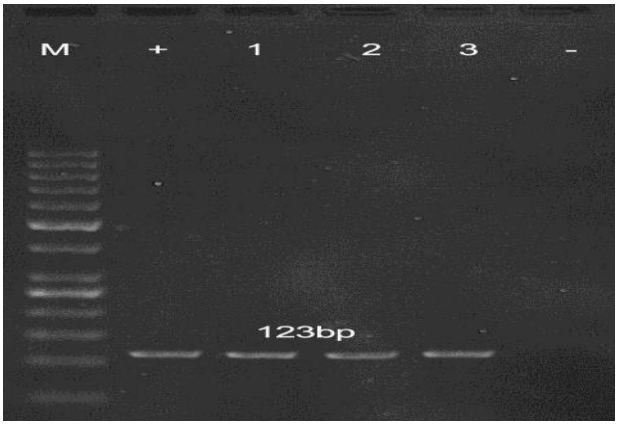
نتایج حاصل از PCR:

بر اساس نتایج حاصل از PCR، ژن‌های *algX* و *lasI* در تمام سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی شده حضور داشتند. درصد فراوانی ژن‌های *pilA* و *estA* نیز به ترتیب ۴۰درصد و۹۴درصد بود (شکل‌های ۱ تا ۴).



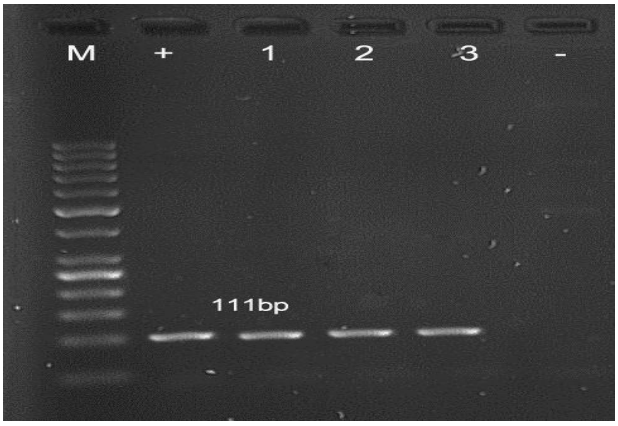
شکل ۱- تکثیر ژن *algX* توسط PCR

M: مارکر (۵۰bp)، + : کنترل مثبت (سویه PAO1)، چاهک شماره ۱ تا ۷: سویه‌های دارای ژن *algX* و - : کنترل منفی



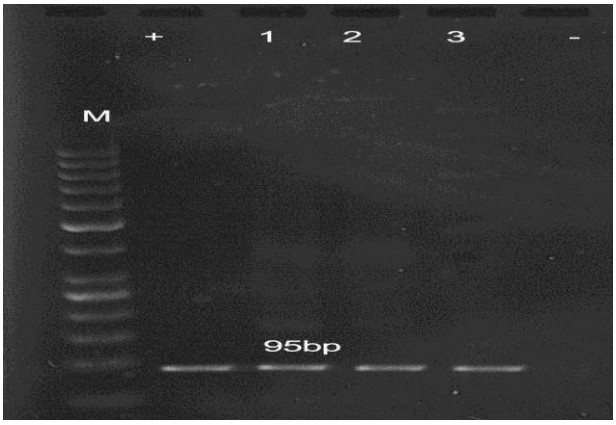
شکل ۲- تکثیر ژن *lasI* توسط PCR

M: مارکر (۵۰bp) ، + : کنترل مثبت (سویه PAO1)، چاهک شماره ۱ تا ۷: سویه‌های دارای ژن *lasI* و - : کنترل منفی



شکل ۳- تکثیر ژن *pilA* توسط PCR

M: مارکر (۵۰bp) ، + : کنترل مثبت (سویه PAO1)، چاهک شماره ۱ تا ۶: سویه‌های دارای ژن *pilA* ، چاهک شماره ۷: سویه فاقد ژن *pilA* و - : کنترل منفی



شکل ۴- تکثیر ژن *estA* توسط PCR

M: مارکر (۵۰bp) ، + : کنترل مثبت (سویه PAO1)، چاهک شماره ۱ تا ۶: سویه‌های دارای ژن *estA* ، چاهک شماره ۷: سویه فاقد ژن *estA* و - : کنترل منفی

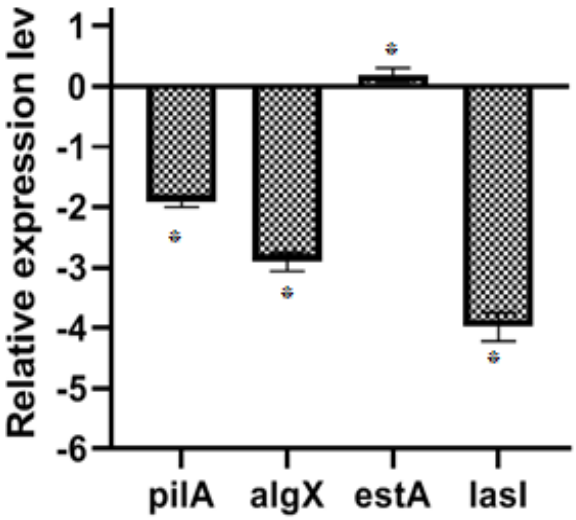
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

نتایج تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) کورکومین:

حساسیت ۱۸ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* که حاوی هر ۴ ژن مورد مطالعه و دارای بیوفیلم قوی بودند؛ بر اساس حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) با استفاده از روش میکرو براث دایلوشن برای تعیین حساسیت نسبت به کورکومین تعیین شد. مقدار MIC برای همه سویه‌ها و سویه کنترل مثبت PAO1 یکسان و غلظتی معادل ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذره بود.

نتایج حاصل از Real-Time PCR:

تمامی نمونه‌ها از غلظت Sub-MIC (۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط حاوی کورکومین برای ایجاد فشار انتخابی بر روی ژن‌های تولید بیوفیلم به دست آمدند. نتایج نشان‌دهنده تاثیر معنادار حضور نانوذره کورکومین بر کاهش بیان ژن‌های *pilA*، *algX* و *lasI* و افزایش بیان ژن *estA* بود (P-value<۰/۰۵). کاهش بیان برای ژن *lasI* (۳/۹۸-) در مقایسه با ژن‌های *algX* (۲/۹-) و *pilA* (۱/۹۱-) بیشتر بود. میزان بیان ژن *estA* نیز ۰/۱۹ افزایش نشان داد (نمودار ۱).



نمودار ۱- سطح بیان ژن‌های مورد بررسی نسبت به نمونه کنترل در حضور ژن کنترل داخلی *16srRNA* ⁎: (P-value<۰/۰۵).

بحث

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم انسانی سبب ایجاد عفونت‌های حاد و مزمن، به ویژه در بیماران دارای نقص ایمنی می‌شود. در دهه‌های اخیر، استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها منجر به ظهور سویه‌های مقاوم در این باکتری‌ها شده است (۲۰). تشکیل بیوفیلم یکی از مکانیسم‌های بکار گرفته شده توسط این باکتری‌ها است که اثر درمان با آنتی بیوتیک را کاهش می‌دهد. بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* ساختاری متشکل از مولکول‌های زیستی مختلف؛ از قبیل عوامل چسبندگی باکتریایی، پلی ساکاریدهای خارج سلولی (EPS) و DNA خارج سلولی (eDNA) است (۲۱). تنظیم بیان ژن‌های ضروری در فرآیند ترشح و تشکیل اجزای بیوفیلم تحت کنترل مستقیم و غیر مستقیم سیستم‌های نظارتی دو جزئی و کروم سنسینگ باکتری است. اختلال در این سیستم‌ها منجر به توقف تولید بیوفیلم یا معیوب شدن ساختار آن می‌شود (۲۲).

ترکیبات طبیعی با اثرات ضد میکروبی به عنوان یک درمان جایگزین یا مکمل اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. فعالیت ضد میکروبی اسانس برخی از گیاهان بر روی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند دارو در شرایط آزمایشگاهی توسط برخی مطالعات قبلی نشان داده شده است (۲۳، ۲۴). کورکومین یک جزء فنلی فعال از زردچوبه است که به دلیل ویژگی‌های دارویی بررسی شده است (۲۱، ۲۵). برخی از مطالعات تأییدکننده اثر کورکومین بر تولید بیوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داده‌اند که این اثر به احتمال زیاد به دلیل تداخل کورکومین با سیستم کروم سنسینگ باکتری و تنظیم نادرست ژن‌های تنظیم کننده دخیل در این فرایند است (۱۱). در تحقیقی، رودشتی و همکاران (۲۶) با استفاده از RT-PCR نشان دادند که سیگنال‌های C12-HSL و C4-HSL سویه *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 در حضور کورکومین به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. رودراپا و همکاران (۲۷) فرض کردند که کورکومین ممکن است پاسخ کروم سنسینگ را در *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 از طریق تأخیر در ساخت HSL یا غیرفعال کردن سیگنال‌های کروم سنسینگ دریافت کننده مورد هدف قرار دهد. با این وجود، مطالعات دیگر نشان دادند که کورکومین بر بیان ژن‌هایی که مستقیماً در تولید بیوفیلم نقش دارند، تأثیر می‌گذارد (۲۸).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

از جمله نقاط قوت مطالعه حاضر می‌توان به بررسی اثر مهاری کورکومین بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* اشاره کرد. اما از جمله محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به منشأ جداسازی ایزوله‌ها که تنها از عفونت ادراری بود و عدم دسترسی به پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد بررسی اشاره کرد که البته خارج از اهداف مطالعه حاضر بود. نتایج نشان‌دهنده تاثیر معنادار حضور نانوذره کورکومین بر کاهش بیان ژن‌های *pilA*، *algX*، *lasI* و افزایش بیان ژن *estA* بود. با توجه به شیوع بالای ژن‌های مذکور در مطالعه حاضر و اهمیت آنها در تشکیل بیوفیلم و ویرولانس سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و تاثیر معنادار نانوذره کورکومین بر میزان بیان آنها، اهمیت استفاده از این نانوذره برای مهار این سویه‌ها مشخص می‌شود. شریعتی و همکاران در مطالعه خود نشان دادند اگرچه نانو کورکومین به صورت وابسته به غلظت در تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* تأثیر مهاری دارد، اما بر بیان ژن های تنظیم‌کننده اصلی که نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم ایفا می‌کنند، تأثیر قابل توجهی ندارد (۲۸). تجزیه بیوفیلم‌های باکتریایی توسط کورکومین از طریق تعامل آن با پروتئین‌های ماتریس بیوفیلم برخی از گونه‌های باکتریایی توسط یک مطالعه گزارش شده است (۲۵). علاوه بر این، یک پروتئین جدید CdrA در ساختار بیوفیلم شناسایی شده است. این پروتئین یک اتوترانسپورتر است که سبب تجمع باکتری‌ها و تشکیل بیوفیلم استاتیک با تعامل با Psl می‌شود (۲۹). کورکومین ممکن است ساختار بیوفیلم را بی‌ثبات کرده و تجمع باکتری‌ها را با مهار آزادسازی این پروتئین به ماتریس خارج سلولی یا تخریب بیوفیلم در نتیجه تعامل با این نوع پروتئین‌های بیوفیلم، کاهش دهد (۲۹).

با توجه به مقاومت بالای *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به اکثر آنتی بیوتیک‌های رایج و عوامل ضد عفونی کننده و اهمیت این باکتری در عفونت‌های بیمارستانی و سوختگی‌ها و بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی، یافتن یک مکمل درمانی موثر و بی خطر ضروری است. بنابراین شناسایی ترکیب موثری که بتواند ژن‌های بیماری‌زای این باکتری را مهار کند اهمیت به سزایی دارد. با توجه به تاثیر مهاری نانوکورکومین علیه ژن بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* احتمالاً بتوان از این نانوذره به عنوان مکمل درمانی علیه این باکتری و مهار ژن ویرولانس آن استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که با توجه به تاثیر مهاری نانوذره کورکومین بر بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* احتمالاً بتوان از این نانوذره به عنوان گزینه درمانی علیه این باکتری و مهار ژن‌های ویرولانس آن استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کارکنان بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات قدردانی کنند.

تأمین بودجه

این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول، در گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، با کد ۸۰۳۱۲ استخراج شده است.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده اند.

مشارکت نویسندگان

طراحی پژوهش: فاطمه اشرفی؛ روش پژوهش و نمونه‌گیری: فاطمه اشرفی، ریحانه داریوشی؛ تحلیل داده‌ها: ریحانه داریوشی؛ نگارش متن و بازبینی: فاطمه اشرفی، ریحانه داریوشی.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

References

1. Quick J, Cumley N, Wearn CM, Niebel M, Constantinidou C, Thomas CM, et al. Seeking the source of Pseudomonas aeruginosainfections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. BMJ open. 2014;4(11):e006278. Doi: https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006278

2. Yan S, Wu G. Can biofilm be reversed through quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa? Frontiers in microbiology. 2019;10:1582. Doi: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01582

3. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. Pseudomonas aeruginosalifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2017;7:39. Doi: https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039

4. Baker SM, McLachlan JB, Morici LA. Immunological considerations in the development of Pseudomonas aeruginosavaccines. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2020;16(2):412-8. Doi: https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1650999

5. Cookson WO, Cox MJ, Moffatt MF. New opportunities for managing acute and chronic lung infections. Nature reviews Microbiology. 2018;16(2):111. Doi: https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.122

6. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007;59(6):1210-5. Doi: https://doi.org/10.1093/jac/dkl509

7. Shivaee A, Meskini M, Shahbazi S, Zargar M. Prevalence of flmA, flmH, mrkA, ecpA, and mrkD virulence genes affecting biofilm formation in clinical isolates of K. pneumonia. KAUMS Journal (FEYZ). 2019;23(2):168-76.

8. Rajabi S, Shivaee A, Khosravi MA, Eshaghi M, Shahbazi S, Hosseini F. Evaluation of multidrug efflux pump expression in clinical isolates of Staphylococcus. aureus. Gene Reports. 2020;18:100537. Doi: https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100537

9. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, et al. Gene expression in Pseudomonas aeruginosabiofilms. Nature. 2001;413(6858):860. Doi: https://doi.org/10.1038/35101627

10. Tuon FF, Gortz LW, Rocha JL. Risk factors for pan-resistant Pseudomonas aeruginosabacteremia and the adequacy of antibiotic therapy. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2012;16(4):351-6. Doi: https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.06.009

11. Sharifian P, Yaslianifard S, Fallah P, Aynesazi S, Bakhtiyari M, Mohammadzadeh M. Investigating the effect of nano-curcumin on the expression of biofilm regulatory genes of Pseudomonas aeruginosa. Infection and Drug Resistance. 2020;13:2477. Doi: https://doi.org/10.2147/IDR.S263387

12. Shivaee A, Meskini M, Roodaki RRN, Kalani BS, Mirshekar M, Razavi S. Evaluation of the effects of nano-curcumin on the expression of genes involved in biofilm formation in Staphylococcus epidermidis. Gene Reports. 2021;23:101026. Doi: https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101026

13. Li B, Li X, Lin H, Zhou Y. Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in S. mutans. BioMed research international. 2018;2018. Doi: https://doi.org/10.1155/2018/4508709

14. Cullimore DR. Practical atlas for bacterial identification: CRC Press; 2010. Doi: https://doi.org/10.1201/9781420087987

15. Zadeh RG, Kalani BS, Ari MM, Talebi M, Razavi S, Jazi FM. Biofilm Persister Cell Formation, and Relative Gene Expression Analysis of Type II Toxin-Antitoxin System in Pseudomonas aeruginosaStrains in the Exponential and Stationary Phases. 2021. Doi: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-253081/v1

16. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, et al. Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosawild type, flagella and type IV pili mutants. Molecular microbiology. 2003;48(6):1511-24. Doi: https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x

17. Alizadeh Sarvandani S, Amini K, Saffarian P. Evaluation of antimicrobial activity of Curcumin nanoparticles on the gene expression of the enterococcal surface protein, Esp, involved in biofilm formation of Enterococcus Faecalis. Razi Journal of Medical Sciences. 2019;26(9):39-46.

18. Alizadeh Sarvandani S, AMINI K, SAFFARIAN P. Evaluating the inhibitory effect of Curcumin nanoparticles associated with expression of esp gene in Enterococcus faecalis biofilm. razi journal of medical sciences (journal of iran university of medical sciences). 2019;26(9 #g001219):-.

19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 2001;25(4):402-8. Doi: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]

20. Tielen P, Kuhn H, Rosenau F, Jaeger K-E, Flemming H-C, Wingender J. Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of Pseudomonas aeruginosa. BMC microbiology. 2013;13(1):1-12. Doi: https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-159

21. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. BioMed research international. 2015;2015. Doi: https://doi.org/10.1155/2015/759348

22. Ganesh PS, Rai VR. Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa. Journal of traditional and complementary medicine. 2018;8(1):170-7. Doi: https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.05.008

23. Donadu M, Usai D, Pinna A, Porcu T, Mazzarello V, Fiamma M, et al. In vitro activity of hybrid lavender essential oils against multidrug resistant strains of Pseudomonas aeruginosa. The Journal of Infection in Developing Countries. 2018;12(01):009-14. Doi: https://doi.org/10.3855/jidc.9920

24. Trong Le N, Viet Ho D, Quoc Doan T, Tuan Le A, Raal A, Usai D, et al. In vitro antimicrobial activity of essential oil extracted from leaves of Leoheo domatiophorus Chaowasku, DT Ngo and HT Le in Vietnam. Plants. 2020;9(4):453. Doi: https://doi.org/10.3390/plants9040453

25. Singh AK, Prakash P, Singh R, Nandy N, Firdaus Z, Bansal M, et al. Curcumin quantum dots mediated degradation of bacterial biofilms. Frontiers in microbiology. 2017;8:1517. Doi: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01517

26. Roudashti S, Zeighami H, Mirshahabi H, Bahari S, Soltani A, Haghi F. Synergistic activity of sub-inhibitory concentrations of curcumin with ceftazidime and ciprofloxacin against Pseudomonas aeruginosaquorum sensing related genes and virulence traits. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017;33(3):50. Doi: https://doi.org/10.1007/s11274-016-2195-0

27. Rudrappa T, Bais HP. Curcumin, a known phenolic from Curcuma longa, attenuates the virulence of Pseudomonas aeruginosaPAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. Journal of agricultural and food chemistry. 2008;56(6):1955-62. Doi: https://doi.org/10.1021/jf072591j

28. Shariati A, Asadian E, Fallah F, Azimi T, Hashemi A, Sharahi JY, et al. Evaluation of Nano-curcumin effects on expression levels of virulence genes and biofilm production of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosaisolated from burn wound infection in Tehran, Iran. Infection and drug resistance. 2019;12:2223. Doi: https://doi.org/10.2147/IDR.S213200

29. Reichhardt C, Wong C, Passos da Silva D, Wozniak DJ, Parsek MR. CdrA interactions within the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix safeguard it from proteolysis and promote cellular packing. MBio. 2018;9(5):e01376-18. Doi: https://doi.org/10.1128/mBio.01376-18

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-08]