



## بررسی اثر مهارکنندگی نانوذرات کورکومین بر بیان ژن esp مرتبط با بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس

سمانه علیزاده سروندانی: کارشناس ارشد زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

کیومرث امینی: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران (\*نویسنده مسئول).  
dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

پروانه صفاریان: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

### چکیده

کلیدواژه‌ها  
انتروکوکوس فکالیس،  
بیوفیلم،  
نانوذره کورکومین،  
esp  
Real-time PCR

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۰۲  
تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۱۲

**زمینه و هدف:** انتروکوکوس فکالیس مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به عنوان دومین علت مهم عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان شناخته می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که بیان esp عامل مؤثر در اتصال اولیه به سطوح و تشکیل بیوفیلم در باکتری انتروکوکوس فکالیس می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر نانوذره کورکومین بر بیان ژن پروتئین سطحی esp مؤثر در تشکیل بیوفیلم در میان نمونه‌های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به دارو دارای ژن مدنظر می‌باشد.

**روش گار:** در این مطالعه در مجموع ۶۰ ایزوله/انتروکوکوس فکالیس از محیط بستری بیمارستان‌های شهر تهران جداسازی و بر اساس آزمون‌های میکروبیولوژی/ایوشیمیابی تعیین گردید. ایزوله‌ها جهت تشخیص ژن esp توسط PCR بررسی شدند و فعالیت مهاری نانوذره کورکومین بر روی تشکیل بیوفیلم و بیان ژن esp با استفاده از براث میکرودایلوشن و تکنیک Real-time PCR بررسی شد.

**یافته‌ها:** از ۶۰ ایزوله مورد بررسی ۱۲ باکتری انتروکوک فکالیس واحد ژن esp مورد بررسی قرار گرفت و نتایج MIC و سنجش بیان ژن نشان دادند که عصاره نانوذره کورکومین اثر ضدمیکروبی و مهاری بر روی تشکیل بیوفیلم و بیان ژن esp در ایزوله‌های باکتری انتروکوک فکالیس ندارد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان دهنده شیوع بالای ژن esp در میان ایزوله‌های *E. faecalis* و نیز قابلیت آن برای در نظر گرفتن به عنوان ابزاری برای شناسایی مولکولی باکتری در فرآیند تشکیل بیوفیلم می‌باشد. تغییرات سطح رونوشت در حداقل غلظت مهاری نانوذره کورکومین قابل ملاحظه نبود که نشان دهنده پتانسیل پایین این نانوذره در مهار اپر ان esp دارد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه

**شیوه استناد به این مقاله:**

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 J Med Sci. 2019;26(9):39-46.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## Evaluating the inhibitory effect of Curcumin nanoparticles associated with expression of *esp* gene in *Enterococcus faecalis* biofilm

**Samaneh Alizadeh Sarvandani**, MSc in Cellular and Molecular Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

 **Kumarss Amini**, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran (\*Corresponding author), dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

**Parvaneh Saffarian**, Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** Antibiotic-resistant forms of *Enterococcus faecalis*, the second leading cause of severe nosocomial infections, have begun to emerge worldwide. Evidence has shown that the *esp* expression is related to the primary adherence and biofilm formation of *E. faecalis*. The present study investigated the effect of curcumin nanoparticles on the Enterococcal surface protein, *esp*, involved in biofilm formation of antibiotic-resistant forms of *Enterococcus faecalis*.

**Methods:** In this study, 60 clinical specimens collected from patients admitted to major hospitals of Tehran, Iran, and all specimens were identified by standard bacteriological and biochemical methods. The strains were evaluated for the presence of *esp* in *E. faecalis* by the PCR method. After treatment, the broth microdilution method and Real-time PCR were used to assess the inhibitory activity of curcumin nanoparticles on biofilm formation and the expression level of *esp* gene, respectively.

**Results:** Twelve *E. faecalis* harboring *esp* gene strains were included. The result of MIC testing and gene expression assay showed that curcumin nanoparticles did not show any inhibitory activity against biofilm formation in clinical isolates of *E. faecalis* and no significant changes in transcription were observed.

**Conclusion:** Considering the high prevalence of *esp* gene among *E. faecalis* strains, molecular identification might serve as a potent drug-resistant marker of *E. faecalis*, as essential elements of *E. faecalis* for the effective infection control program. No significant changes in transcription were detected when the minimal medium was supplemented with curcumin nanoparticles, suggesting that these nanoparticles contribute very little, if at all, to inhibition of the *esp* operon.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Islamic Azad University, Saveh Branch

### Keywords

*Enterococcus faecalis*,  
Biofilm,  
Curcumin nanoparticles,  
*esp*,  
Real-time PCR

Received: 23/06/2019

Accepted: 03/11/2019

### Cite this article as:

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 J Med Sci. 2019;26(9):39-46.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.



پژوهشی است.

نتایج حاصل از بررسی اثر کورکومین بر روی گونه‌های مختلف از باکتری‌های بی‌هوای نشان داده است که این ماده می‌تواند در محدوده غلظت‌های مشخصی سبب مهار رشد باکتری از طریق مهار فاکتور *esp* شود. مطالعات زیادی، برای استفاده بهینه از کورکومین و افزایش بازده آن درمان بیماری‌ها انجام شده است (۱۳-۱۵). سیستم‌های تحويل دارو بر اساس نانوذرات، برای استفاده از عوامل آبگریز مانند کورکومین مناسب می‌باشند (۲).

باکتری‌های موجود در بیوفیلم خصوصاً در لایه‌های عمیق‌تر نسبت به درمان آنتی‌بیوتیکی و عملکرد فاگوسیتوز سلول‌های ایمنی مقاوم‌تر هستند و مهار تشکیل بیوفیلم و تنظیم بیان ژن‌های دخیل در این فرآیند توسط عوامل مهارکننده محیطی از نظر پژوهشی مهم می‌باشد. همان قدر که شناسائی ژن‌های دخیل در بروز بیماری‌زایی، تشکیل بیوفیلم و پاتوژن این باکتری مهم است، شناخت اینکه فاکتورهای محیطی در تنظیم این ژن‌ها نقش دارند، نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر نانوذره کورکومین بر بیان ژن پروتئین سطحی/انتروکوکوس فکالیس (*esp*) مؤثر در تشکیل بیوفیلم در میان نمونه‌های کلینیکی انتروکوکوس فکالیس دارای ژن *esp* مقاوم به دارو می‌باشد.

## روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این تحقیق تعداد ۶۰ نمونه ادرار/انتروکوکوس فکالیس افراد مبتلا به عفونت‌های شدید ادراری بستری در بیمارستان‌های شهر تهران طرف مدت ۶ ماه در بین سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ تهیه و به محیط آزمایشگاه منتقل شد. از همه انتروکوکوس‌های ایزوله شده در محیط آغاز خون دار کشت خالص تهیه شد و در "برین هارت برات" حاوی ۲۰٪ گلیسرول تلکیح شده و در دمای ۷۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمون‌های بیوشیمیایی شامل هیدرولیز اسکولین، کاتالاز، وجود پیرولیدونیل

انتروکوک فکالیس (*Enterococcus faecalis*) از جمله انواع شایع استرپتوكوک‌های گروه D یا انتروکوک‌ها می‌باشد که به عنوان فلور نرمال در دستگاه گوارشی حضور دارد (۱، ۲). متأسفانه فواید بسیاری که تاکنون برای انتروکوکوس‌ها توصیف شده‌اند، تحت تأثیر موارد بالای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی گستره در سال‌های اخیر قرار گرفته و این باکتری‌ها به عنوان عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی شناخته می‌شوند، که عمدتاً قابلیت ایجاد بیوفیلم‌ها دارند (۱، ۳-۵). بیوفیلم میکروبی اجتماعات پیچیده از باکتری‌های متصل به سطوح است که موجب اتصال غیرقابل برگشت میکرووارگانیسم‌ها به سطوح از جمله بافت زنده، مقاومت در برابر مواد ضدمیکروبی و بیماری‌زایی بیشتر می‌شود (۴، ۶، ۷). چندین فاکتور ویرونالنس مرتبط با اتصال از جمله تشکیل بیوفیلم در انتروکوکوس فکالیس توصیف شده که شامل ترکیبات پروتئین سطحی انتروکوک (*esp*، ژلاتیناز *GelE*، و پروتئین فاکتور تجمعی *Agg*) می‌باشند (۴، ۸).

پروتئین سطحی انتروکوک (*esp*، پروتئین دیواره سلولی است که به عنوان ادھرین/انتروکوکوس فکالیس در کلونیزاسیون این باکتری در سطوح از جمله دستگاه ادراری و تولید بیوفیلم نقش دارد (۱، ۹-۱۱). مطالعات نشان می‌دهد که ایزوله‌های فاقد فاکتور *esp* پس از کسب پلاسمید حامل ژن *esp* قادر به تولید بیوفیلم می‌گردند (۱، ۵). حضور ژن *esp* در بین ایزوله‌های انتروکوک جدا شده از نمونه‌های ادرار و کاتتر با مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی، می‌تواند با کلونیزاسیون بیشتر باکتری و توسعه عفونت مزمن ادراری مرتبط باشد (۱۲). بروز فاکتورهای بیماری‌زا مثل تشکیل بیوفیلم و مقاومت روزافزون/انتروکوکوس فکالیس به آنتی‌بیوتیک‌های موجود از جمله بیان *esp*، از مضادات مهم درمان عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌گردد. لذا تحقیقات در مورد مواد آنتی‌باکتریایی جدید و نیز روش‌های نوین جهت شکست مقاومت‌های میکروبی امری ضروری بوده و از اولویت‌های مطالعات حوزه‌ی

تعیین MIC نانوکورکومین: با استفاده از روش استاندارد پیشنهادی توسط کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI)، حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) برای انتروکوکوس فکالیس در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات بدست آورده شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۲ ردیف که هر کدام حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتون سویا براث (TSB) استریل بود، استفاده گردید. سپس ۱۰۰ μg/mL به ردیف اول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتون سویا براث اضافه شد و رقیق‌سازی تا رقت ۱۲۸ μg/mL انجام شد (۱۰۰ μg/mL-۱۰۲۴). سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به همه چاهک‌ها اضافه شد. همچنین از دو ردیف چاهک به عنوان کنترل مثبت (محیط و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی تست (محیط + نانو ذره کورکومین) استفاده شد. سپس میکروپلیت‌ها در انکوباتور شیکر دار (۳۷°C) ۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷°C و حداکثر مدت زمان (۲۴ ساعت) گرمخانه گذاری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA کلی با استفاده از کیت استخراج RNA به نام Cinna pure RNA extraction (سیناکلون) پس از تیمار دهی سوسپانسیون باکتریایی واجد ژن esp در فاز لگاریتمی رشد (OD<sub>600</sub>=0.4-0.6) با ذرات نانو کورکومین (رقت بعد از MIC) انجام شد. برای حذف آلودگی‌های احتمالی RNA استخراج شده با DNA ژنومی، پیش از Fermentase, DNaseI (Roche, Waltham, USA) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMV (شرکت Roche) با غلظت ۱۰۰ U/25 انجام شد. بدین ترتیب RNA استخراج شده برای مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس نسخه‌برداری معکوس (RT) در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه با ۲ میکرولیتر AMV ۰/۸ Random Primer dNTP ۱۰ Reverse Transcriptase میکرولیتر بافر ۱۰ x آنزیم AMV انجام شد. سپس آنزیم AMV در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه و غیرفعال شد.

آمینو پپتیداز، رشد در مجاورت ۵٪ NaCl، تست حرکت و تولید پیگمان، تست قندی ال-آرابینوز و سوربیتول و دهیدرولیز اسید آمینه آرژنین مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA و شناسایی ژن esp: جهت استخراج DNA باکتریایی، چند کلنی از ایزوله انتروکوکوس فکالیس تعیین هویت شده، در یک تا چهار میلی لیتر محیط LB کشت داده شد. از رسوب حاصل، جهت استخراج DNA باکتریایی توسط کیت استخراج DNA مرکز ذخایر ژنتیک استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر MasterMix ۲X، یک میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۲ پیکومول)، ۴ میکرولیتر H<sub>2</sub>O، ۴ میکرولیتر الگو (۵ نانوگرم) با Gradient استفاده از دستگاه ترموماسایکلر Masterrcycler Eppendorf انجام شد. به منظور تکثیر ژن esp، مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس تکثیر در ۳۵ سیکل به ترتیب زیر بود. مرحله واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمروها در ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه به اجرا در آمد. یک جفت پرایمر با توالی مشخص برای mexA-F (GGAACGCCCTGGTATGCTAAC) و mexA-R (GCCACTTATCAGCCTGAACC) با طول ۶۹ جفت باز، طراحی و جهت سنتز به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی سفارش داده شد. در نهایت محصولات PCR، بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و پس از پایان مرحله الکتروفورز به وسیله دستگاه UV Transilluminator تصویربرداری شد. مارکر مورد استفاده در این تحقیق DNA Ladder Mix ساخت شرکت سینا کلون با فاصله ۱۰۰ جفت باز از ۱۰۰ تا ۱۳۰۰ جفت باز بود.

آماده‌سازی سوسپانسیون نانو ذرات: برای تهیه محلول استوک نانو ذرات، ۱۰ گرم نانو ذره در یک لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان حلالی کمکی به صورت سوسپانسیون در آورده شد و برای پراکنده شدن مناسب آن‌ها از دستگاه التراسونیک (Bandelin) به مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد.

جدول ۱- شرایط دمایی و اجزای واکنش PCR

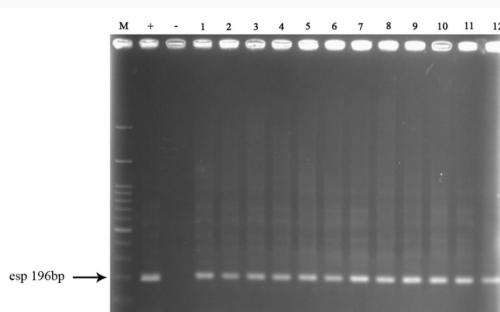
	Raction mixture	Volume per one reation
Master Mix		
Prime Qmaster mix (2x) with syber green		10 µL
Forward primer (10 µM)		1 µL
Forward primer (10 µM)		1 µL
Rox dye		1 µL
Depc water		5 µL
cDNA		2 µL
Final volume		20 µL
Cycling temprature		
Steps		Temperature/duration
Initial denaturation	Denaturation	95 °C/ 1 min
Amplification	Annealing	95 °C/ 30 sec
	Elongation	59 °C/ 40 sec
Final extension		72 °C/ 60 sec
		72 °C/ 5 min

برای ۱۲ ایزوله انجام شد و در ادامه فعالیت مهاری نانوکورکومین بر روی تشکیل بیوفیلم و بیان ژن *esp* بر روی این ایزوله‌ها صورت گرفت.

آزمون MIC: نتایج حاصل از MIC بر پایه براحت میکرودایلوشن نشان داد که دامنه حداقل غلظت مهار رشد در ایزوله‌های جدا شده/انتروکوکوس فکالیس برای نانوذره کورکومین ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

بیان ژن *esp* بعد از مجاورت با مهارکننده‌های تشکیل بیوفیلم: میزان بیان نسبی ژن *esp* در ایزوله‌های تیمار شده با نانوذره نسبت به ایزوله‌های کنترل تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان نداد و بر اساس نتایج به دست آمده، P بیان ژن برای *esp* از میزان ۰/۰۵ بیشتر می‌باشد که بیانگر بی معنا بودن اختلاف بیان ژن در بین دو گروه تیمار شده و گروه تیمار نشده بوده است

بیان ژن *esp* در حضور نانوذرات کورکومین: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio کره جنوبی (CAT NO: Step-One Plus real-time PCR Q9210) در دستگاه Step-One Plus real-time PCR system (AppliedBiosystems, CA, USA) با شرایط دمایی و مواد در جدول ۱ آورده شده است. از ژن rRNA 16s در این مطالعه به عنوان کنترل رفرانس استفاده شد. برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از LightCycler ® Relative Quantification Software برای بدست آوردن نسبت بیان ژن موردنظر به ژن mRNA، داده‌های مربوط به تغییرات بیان ژن *esp* با روش  $\Delta\Delta CT$  بر پایه Efficiency و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه تحلیل شدند (Control: پیش از تیمار و Sample: بعد از تیمار).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی ژن *esp* بر روی تعدادی از جدایه‌های مثبت از نمونه ۱ تا ۱۲، به ترتیب از چپ به راست: DNA Ladder، +، - کنترل منفی و نمونه‌ها (ذل آگارز ۲٪) نشان داد (شکل ۱). شناسایی مولکولی ژن *esp*: تکثیر ژن *esp* در ایزوله‌های باکتری، وجود باند 69bp را در ژل الکتروفورز نشان داد (شکل ۱). شناسایی مولکولی لوکوس ژنی *esp*

## یافته‌ها

جدازی و تشخیص ایزوله‌ها از نمونه‌های بالینی: در این مطالعه در مجموع ۶۰ ایزوله با استفاده از تست‌های تشخیصی و تاییدی میکروبیولوژی/بیوشیمیایی، به عنوان باکتری/انتروکوکوس فکالیس جدازی و تعیین هویت شدند.

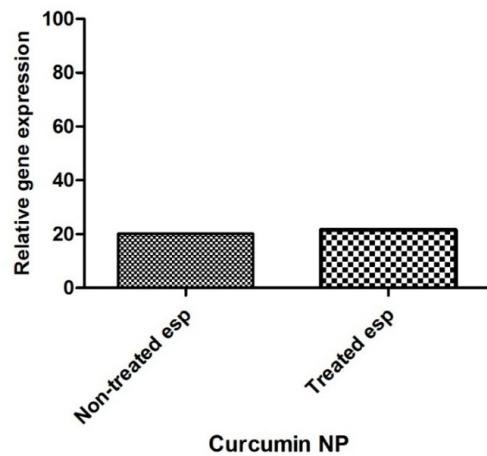
شناسایی مولکولی ژن *esp*: تکثیر ژن *esp* در ایزوله‌های باکتری، وجود باند 69bp را در ژل الکتروفورز نشان داد (شکل ۱). شناسایی مولکولی لوکوس ژنی *esp*

بر روی تشکیل بیوفیلم و بیان ژن *esp* بر روی این ایزوله‌ها صورت گرفت.

صالحی و همکاران، پس از تعیین هویت ایزوله‌های جدا شده نمونه‌های کانتر ادراری و نمونه‌های ادرار بیماران، ژن *esp* در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های ادرار را ۸۳ درصد و ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های کانترهای ادراری را ۹۷ درصد با استفاده از روش PCR گزارش کردند (۷). این نتایج نشانگر اهمیت نقش ژن *esp* در تشکیل بیوفیلم در عفونت‌های حاصله از این ارگانیسم باشد و به عنوان ابزار تشخیصی در شناسایی مولکولی/انتروکوکوس فکالیس مقاوم به دارو با واسطه تشکیل بیوفیلم استفاده شود.

نانوفناوری پزشکی حوزه کاربرد رویکردها، نظریه‌ها، دستگاه‌ها و ادوات مقیاس نانو و نانوساختارهای ویژه به منظور شناخت، پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها از طریق آشکارسازی، ترمیم و بازسازی بافت‌های زیستی آسیب‌دیده در سطوح مولکولی است. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که ماندگاری کورکومین در مایعات بدن به دلیل دفع سریع آن کوتاه است، بنابراین امروزه برای افزایش زیست ماندگاری این ماده ارزشمند در سلول و بدن و به تبع آن افزایش آثار این ماده، از ناقلین مختلف استفاده شده است. در مورد ترکیبات هیدروفوب مثل کورکومین، کاربرد نانوذرات جهت افزایش انحلال آبی دارو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۱۸). در این مطالعه، میزان بیان نسبی ژن *esp* در ایزوله‌های تیمار شده با نانوذره نسبت به ایزوله‌های کنترل تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان نداد.

نقش ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی کورکومین و مشتقات پلی فنولی آن در سال‌های اخیر در مطالعات *in vivo* و *in vitro* در نشان داده شده است که از این میان، بیشترین اثر ضد باکتریایی کورکومین، بر روی هلیکوبکتر پیلوئی بوده است و به عنوان ماده افزودنی در کاهش علائم گاستریت کاربرد دارد (۱۹)، (۲۰). Negi و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه‌ای بر روی ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروزینوز/ نشان دادند که خاصیت ضد میکروبی کورکومین برای مهار رشد این باکتری از طریق اختلال در پمپ افلاکس باکتری مقاوم چند دارویی به همراه سایر داروهای انتخابی می‌باشد. پس از اضافه کردن کرکومین (۵۰)



**شکل ۲**- میزان بیان ژن *esp* در ایزوله‌های دو گروه سلولی تیمار شده و تیمار نشده با نانوذره کورکومین. تفاوت معنی دار بین نتایج تست و کنترل مشاهده نشد ( $P>0.05$ ). از ژن رفرانس 16s RNA برای نرمال سازی نتایج استفاده شد.

(۲)، شکل (۲).

## بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت‌های گسترده آنتی‌بیوتیکی ناشی از تشکیل بیوفیلم به مسئله‌ای نگران‌کننده در مورد انtronوکوکوس فکالیس محسوب می‌گردد و لذا شناخت عوامل مؤثر در این فرآیند و بررسی اثر درمانی داروهای جدید جایگزین می‌تواند در راستای کاهش بار عفونت‌های شایع بیمارستانی حاصله از این ارگانیسم کمک‌کننده باشد (۱۶، ۱۷). پروتئین سطحی انtronوکوک که توسط ژن *esp* کروموزومی رمزدهی می‌شود، در اتصال اولیه و تشکیل بیوفیلم/انtronوکوکوس فکالیس دخالت دارد و با تشدید بیماری، کلونیزاسیون، پایداری در بافت‌های میزبان بخصوص مجاری ادراری همراه است. از این رو امروزه مهار تشکیل بیوفیلم از دید پزشکی حائز اهمیت می‌باشد (۱، ۵، ۹). در این پژوهش، به این سؤال که آیا نانوذره کورکومین قابلیت مهار فرآیند تشکیل بیوفیلم را از مسیر القашده با پروتئین مشارکت‌کننده تشکیل بیوفیلم به نام *esp* که از ابعاد مهم بیماری‌زایی این باکتری می‌باشد، را دارد تا با کنترل این عوامل بتوان از بروز عفونت‌های شدید جلوگیری نمود. شناسایی مولکولی لوکوس ژنی *esp* در این مطالعه برای ۱۲ ایزوله انجام شد و در ادامه فعالیت مهاری نانوذره کورکومین

مطالعه و سایر مطالعات، این یافته می‌تواند به عنوان ابزار تشخیصی در شناسایی مولکولی باکتری انتروکوکوس فکالیس مقاوم به دارو به واسطه تشکیل بیوفیلم استفاده شوند. از این رو نقش مهم آن در بروز مقاومت دارویی، الگوی درمانی مناسب جایگزین آنتی بیوتیک‌ها در بیماران آلوده به این باکتری حائز اهمیت است. در این مطالعه، نتایج ارزیابی قدرت بازدارندگی رشد باکتری و بیان ژن نشان داد که نانو ذره کورکومین به عنوان عامل مهار کننده رشد باکتری تاثیر کمی بر روی فرآیند تشکیل بیوفیلم به واسطه esp داشته است. به نظر می‌رسد که کورکومین به صورت ترکیبی با سایر آنتی بیوتیک‌ها دارای اثر ضد باکتری قوی‌تری ایزوله‌های باکتریایی تولیدکننده بیوفیلم است. اگر چه فاکتور مطالعه شده دخیل در تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در افزایش بیماری‌ای مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف بازی می‌کند، اما نقش عوامل دیگر و اثرات تجمعی آن‌ها نباید نادیده گرفته شود.

### تقدیر و تشکر

نویسنده‌گان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه‌های بیمارستان مشارکت‌کننده مستقر در شهر تهران که در جمع آوری و کشت اولیه نمونه‌ها ما را یاری نمودند و هم چنین از خدمات بی‌دریغ پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### References

1. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MaJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2001;67:4538-45.
2. Benes J, Picha D, Kabelkova M, Dzupova O, Horova B, Gabrielova A. Infective endocarditis caused by unusual gram-positive pathogens. Folia Microbiol. 2002;47: 737.
3. Zareba T, Hryniewicz W. Clinical significance of Enterococcus infection. New Med. 1997;4:30-3.
4. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in Enterococcus spp. clinical isolates. Virulence. 2014;5: 634-7.

میلی‌گرم در لیتر) با مواد ضد میکروبی انتخاب شده در ۳۰ درصد از ایزوله‌های مقاوم به چند دارویی سودوموناس آئروژینوزا، کاهش معنی‌داری در MIC مشاهده شد، در حالی که با مواجهه کورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به تنها یی تغییر محسوسی در MIC مشاهده نشد (۱۵). در مطالعه دیگری، در مواجهه کورکومین با دوز مشابه نیز به تنها یی تغییر محسوسی در MIC مشاهده نشد و حداکثر فعالیت سینئرژیک کورکومین با سایپروفلوكسازین در میان ایزوله‌های گرم مثبت و آمیکاسین، جنتامایسین و سفپیم در بین ایزوله‌های گرم منفی مشاهده شد. کورکومین به صورت ترکیبی با سایر آنتی بیوتیک‌ها دارای اثر ضد باکتری قوی‌تری ایزوله‌های باکتریایی تولیدکننده بیوفیلم است (۲۱).

استفاده بهینه کورکومین به صورت نانو ذره با استفاده از کایتوزان و نمک تری پلی فسفات نشان داد که درمان عفونت پوستی استافیلوکوکوس اورئوس در موش‌های BALB/c با نانوذرات کایتوزان حاوی کورکومین به مدت سه روز به صورت معنی‌داری سبب مهار رشد باکتری می‌گردد (۲۲). مطالعات بر پایه نانوذره نشان می‌دهد که نانوذره کورکومین محلول در DMSO در غلظت‌های MIC بین ۱۲۵-۲۵۰ میکرو‌گرم/میلی‌لیتر به روش براث میکرو دایلوجشن می‌تواند از رشد ۱۰ گونه مختلف از استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی سیلین جلوگیری کند (۲۳). در مطالعه کنونی، نتایج روش MIC و بیان ژن جزء esp نشان داد که نانو ذره کورکومین کارایی پایینی در فعالیت مهاری و آنتی باکتریال پایینی برای کاهش میزان تشکیل بیوفیلم از مسیر واسطه esp در باکتری انتروکوکوس فکالیس دارد که با برخی نتایج به دست آمده توسط محققان در مورد باکتری‌های گرم مثبت نظری استافیلوکوکوس اورئوس منطبق نیست. مواجهه کورکومین به تنها یی تغییر محسوسی در بیان ژن جزء esp در محدوده MIC مشاهده نشد و به نظر می‌رسد که حداکثر فعالیت سینئرژیک کورکومین به صورت ترکیبی با مواد ضد میکروبی نظری آنتی بیوتیک‌ها علیه ایزوله‌های باکتریایی تولیدکننده بیوفیلم باشد. با توجه به حضور بالای لوکوس ژنی esp در ایزوله‌های بالینی باکتری انتروکوکوس فکالیس در این

5. Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol.* 2007;189:8233-40.
6. Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 2002;4: 215-24.
7. Salehi M, Mosavari N, Hosseini F, Mobaraki M. The evaluation of esp and eep genes in *Enterococcus* strains isolated from clinical urine samples in Tehran. *Arak Med Uni J.* 2012;15:39-48.
8. Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis.* 2002;35:570-5.
9. Ramadhan A, Hegedus E. Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci. *J Clin Pathol.* 2005;58:685-6.
10. Sava I, Heikens E, Kropec A, Theilacker C, Willems R, Huebner J. Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host but is not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection. *J Med Microbiol.* 2010;59:1001-4.
11. Billström H, Lund B, Sullivan Å, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32:374-7.
12. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Naghili B, Aghazadeh M, Milani M, et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Adv Pharm Bull.* 2013;3:197.
13. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2011;10:12.
14. Kocaadam B, Şanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57:2889-95.
15. Negi N, Prakash P, Gupta ML, Mohapatra TM. Possible role of curcumin as an efflux pump inhibitor in multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Diagn Res.* 2014;8:DC04.
16. Ike Y. Pathogenicity of enterococci. *Nihon Saikingu Zasshi Jap J Bact.* 2017;72:189-211.
17. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.* 2007;56:1581-8.
18. Phan TT, See P, Lee ST, Chan SY. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *J Trauma Acute Care Surg.* 2001;51:927-31.
19. Akram M, Shahab-Uddin AA, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, Asif M. Curcuma longa and curcumin: a review article. *Rom J Biol Plant Biol.* 2010;55:65-70.
20. Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
21. Kali A, Devaraj Bhuvaneshwar P, Charles M, Seetha KS. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7:93.
22. Jahromi MAM, Rajayi H, Al-Musawi S, Pirestani M, Ramandi MF, Ahmadi K, et al. Evaluation of Antibacterial Effect of Curcumin Loaded Chitosan Nanoparticles. *Galen.* 2015;5:134-41.
23. Gutierrez JKT, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanitá PV, Pavarina AC, et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PloS One.* 2017;12:e0187418.