ORIGINAL ARTICLE

Inhibition of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Quorum-Sensing Network by Lawsone and Bis-lawsone Derivatives to Prevent Biofilm Formation and Virulence Factors Production

Mehran Ghanei[1]
Razieh Ghodsi[2,3]
Amineh Sadat Tajani[4]
Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz[3,5]
Vahid Soheili[6]

[1] PharmD, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[2] Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3] Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4] PhD Pharmaceutical Control, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[5] Professor, Department of Pharmaceutical Control, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[6] Associate Professor, Department of Pharmaceutical Control, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received November 4, 2023 ; Accepted December 2, 2023)

Abstract

Background and purpose: Bacterial infections are treated with antibiotics, but the development of multi-drug resistant strains, which are growing at an increasing rate, is a phenomenon that threatens human societies. Therefore, alternative strategies are needed to combat infectious diseases. Today, compounds that reduce the pathogenicity of bacteria and do not interfere with their survival or growth are introduced as the next generation of antibiotics. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the important and hazardous pathogens that employs its quorum-sensing network to regulate pathogenicity and virulence factors production. Here, we investigated the effect of a natural naphthoquinone compound, Lawsone (isolated from Henna), and its synthetic derivatives on the quorum-sensing system of *P. aeruginosa* PAO1.

Materials and methods: First, the MIC of each compound was evaluated. Then, the effect of the selected compounds on biofilm formation and survival rate of biofilm sessile cells was investigated by colorimetric method. Finally, the virulence factors secretion of *P. aeruginosa*, including pyocyanin, pyoverdine, and protease was studied in the presence of the selected compounds.

Results: The results indicated that Lawsone and NO2-481 reduced the production of *P. aeruginosa* biofilm by about 79% and 92%, respectively. Moreover, Lawsone and NO2-481 (at both concentrations, 250 and 125 µg/mL) decreased the viability of biofilm cells by about 70%. Furthermore, NO2-481 reduced the production of virulence factors including pyocyanin and pyoverdine by about 55% and 81%, respectively; however, it did not affect the protease production.

Conclusion: NO2-481 derivative has the ability to reduce the pathogenicity of *P. aeruginosa*, and if it is proven to be non-cytotoxic, it can be assessed through animal and clinical studies, to be applied as an alternative compound along with antibiotics or disinfectants.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, quorum-sensing, naphthoquinone, lawsone, NO2-481

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (227): 37-49 (Persian).

Corresponding Author: Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz and Vahid Soheili - School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. (E-mail: Fazlis@mums.ac.ir and Soheiliv@mums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ۲۲۷ آذر سال ۱۴۰۲ (۴۹-۳۷)

مهار شبکه Quorum-Sensing باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 با استفاده از لاوسون و مشتقات بیس لاوسون به منظور جلوگیری از تولید بیوفیلم و فاکتورهای بیماری زا

مهران قانعی[۱]
راضیه قدسی[۲و۳]
امینه سادات طاجانی[۴]
بی بی صدیقه فضلی بزاز[۳و۵]
وحید سهیلی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: درمان عفونت‌های باکتریایی با کمک آنتی‌بیوتیک‌ها صورت می‌پذیرد، اما ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو که با سرعت فزاینده‌ای در حال رشد است، پدیده‌ای است که جوامع انسانی را تهدید می‌کند. بنابراین برای مبارزه با بیماری‌های عفونی به استراتژی‌های جایگزین نیاز است. امروزه ترکیباتی که بیماری‌زایی باکتری‌ها را کاهش می‌دهند و در عین حال هیچ‌گونه تداخلی با زنده ماندن یا رشد آن‌ها ندارند، به‌عنوان نسل بعدی آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی می‌شوند. *سودوموناس آئروژینوزا*، یکی از پاتوژن‌های مهم و خطرناک است که از شبکه کوئروم سنسینگ (Quorum-Sensing) خود برای تنظیم بیماری‌زایی و تولید عوامل بیماری‌زا استفاده می‌کند. در این مطالعه، به بررسی اثر ترکیب نفتوکینونی طبیعی لاوسون (جدا شده از گیاه حنا) و چندین مشتق صناعی آن بر سیستم کوئروم سنسینگ باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا تعیین حداقل غلظت مهاری(MIC) هر ترکیب اندازه‌گیری شد. سپس تأثیر ترکیبات منتخب بر تشکیل بیوفیلم و میزان زنده مانی سلول‌های باکتری موجود در داخل بیوفیلم، با روش رنگ سنجی بررسی گردید. در نهایت میزان ترشح فاکتورهای بیماری‌زای تحت کنترل سیستم کوئروم سنسینگ *سودوموناس آئروژینوزا* شامل پیوسیانین، پیووردین و پروتئاز در حضور ترکیبات منتخب مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ترکیبات لاوسون و NO_2-481 تولید بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* را به ترتیب به میزان حدود ۷۹ و ۹۲ درصد کاهش می‌دهند. هم‌چنین لاوسون و ترکیب NO_2-481 (در هر دو غلظت ۲۵۰ µg/mL و ۱۲۵)، میزان زنده مانی سلول‌های بیوفیلم را در حدود ۷۰ درصد کاهش دادند. در ادامه مشتق NO_2-481 مقدار تولید فاکتورهای بیماری‌زای پیوسیانین و پیووردین را در بهترین حالت، به ترتیب حدود ۵۵ و ۸۱ درصد کاهش داد اما بر میزان تولید پروتئاز تأثیری نداشت.

استنتاج: مشتق NO_2-481 توانایی کاهش بیماری زایی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را دارد و در صورت اثبات عدم سمیت سلولی، می‌تواند وارد فاز مطالعات حیوانی و بالینی گردد، تا به عنوان یک ترکیب کمکی در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها یا ضدعفونی‌کننده‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، بیوفیلم، کوئروم سنسینگ، نفتوکینون، لاوسون، NO_2-481

مولف مسئول: بی بی صدیقه فضلی بزاز– مشهد: بلوار وکیل‌آباد، پردیس دانشگاه فردوسی، دانشکده داروسازی E-mail: Fazlis@mums.ac.ir
و وحید سهیلی– مشهد: بلوار وکیل‌آباد، پردیس دانشگاه فردوسی، دانشکده داروسازی E-mail: Soheiliv@mums.ac.ir
۱. دکترای عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، مرکز فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. دکترای تخصصی کنترل دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. استاد، گروه کنترل دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۶. دانشیار، گروه کنترل دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۸/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۲/۸/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۴۰۲/۹/۱۱

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

مقدمه

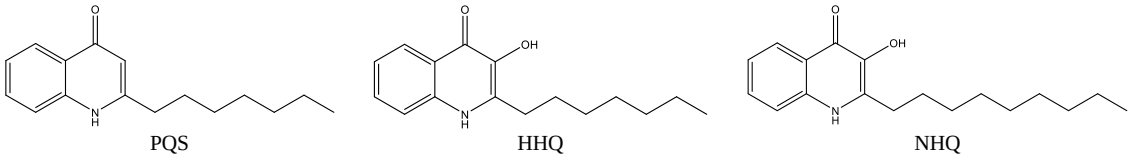
بیوفیلم را می‌توان به عنوان مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌های متصل به سطح تعریف کرد(۱). تشکیل بیوفیلم فرآیندی است که در آن میکروارگانیسم‌ها به‌طور برگشت ناپذیر، به سطح متصل شده، رشد کرده و پلیمرهای خارج سلولی تولید می‌کنند. این اتفاق باعث پیوستگی و تشکیل ماتریس و تغییر در فنوتیپ ارگانیسم‌ها، با توجه به سرعت رشد و رونویسی از ژن‌ها می‌شود. بیوفیلم تاثیر زیادی بر سلامت عمومی دارد، زیرا به‌طور قابل توجهی باعث کاهش حساسیت میکروارگانیسم به عوامل ضدمیکروبی می‌شود(۳،۲). علت توسعه مقاومت میکروبی سلول‌های بیوفیلم مشخص نشده است، اما مطالعات اخیر مکانیسم‌های متعددی پیشنهاد کرده‌اند از جمله: شکست عوامل ضدمیکروبی در نفوذ به داخل بیوفیلم، رشد آهسته سلول‌ها و پاسخ استرس، ناهمگونی (Heterogeneity) در بیوفیلم به دلیل تفاوت در شیب مواد مغذی، مواد زائد و عوامل سیگنالینگ، پاسخ استرس عمومی (General stress response)، القای یک فنوتیپ متفاوت با بیان ژن‌هایی متفاوت و وجود پمپ‌های چند دارویی (Multi-drug efflux pumps)(۴).

مطالعات ژنتیکی نشان می‌دهند که تشکیل بیوفیلم طی مراحل مختلفی رخ می‌دهد: تماس اولیه و اتصال به سطح که به دنبال آن تشکیل میکروکلونی رخ می‌دهد و در ادامه بلوغ و تشکیل ساختمان بیوفیلم و در نهایت سلول‌های بیوفیلم جدا شده و پراکنده می‌گردند. این اتفاق نیاز به نوع خاصی از سیگنالینگ بین سلول‌ها دارد که تحت عنوان کوئروم سنسینگ(Quorum Sensing: QS) شناخته می‌شود. هم‌چنین نیاز به رونویسی از مجموعه‌ای از ژن‌ها دارد که نسبت به ژن‌های فرم پلانکتونی همان میکروارگانیسم متفاوت هستند(۵). تاکنون استراتژی‌های مختلفی برای از بین بردن بیوفیلم پیشنهاد شده است. به‌طور کلی این استراتژی‌ها را می‌توان به روش‌های مکانیکی (شامل تغییر بار سطحی و میزان آبگریزی، جلوگیری از اتصال باکتری به سطح و تجزیه بیوفیلم)، فیزیکی (شامل میدان‌های مغناطیسی فوق‌العاده قوی، اولتراسوند و پالس‌های الکتریکی با قدرت بالا) و شیمیایی (آنتی‌بیوتیک‌ها، بیوسیدها و پوشش‌های یونی) تقسیم کرد(۶). هم‌چنین تکنولوژی‌های سبز شامل استفاده از باکتریوفاژها(۶)، آنزیم‌ها(۶)، و عصاره‌های گیاهی(۷) نیز پیشنهاد شده است. *سودوموناس آئروژینوزا* یک پاتوژن فرصت‌طلب وگرم منفی است که می‌تواند عفونت‌های شدید و تهاجمی را در بیماران بستری و مبتلا به بیماری‌های حاد ایجاد کند. این باکتری یکی از علل شایع عفونت‌های حاد و مزمن است و عفونت‌های ناشی از آن و سویه‌های مقاوم به چندین دارو (Multi-drug resistant, MDR)، در بیماران بستری در حال افزایش است. *سودوموناس آئروژینوزا* به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمینوگلیکوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها مقاومت نشان می‌دهد. مکانیسم‌های مقاومت مورد استفاده برای مقابله با حمله آنتی‌بیوتیکی را می‌توان به سه دسته مقاومت ذاتی، اکتسابی و تطبیقی طبقه‌بندی کرد. در مقاومت آنتی‌بیوتیکی تطبیقی، تغییرات گذرا در بیان ژن و یا پروتئین در پاسخ به یک محرک محیطی ایجاد می‌شود و زمانی که محرک حذف شود، قابل برگشت است. این مکانیسم‌ها شامل تشکیل بیوفیلم و تولید سلول‌های ماندگار است. این موضوع توانایی یک باکتری را برای زنده ماندن در برابر حمله آنتی‌بیوتیکی افزایش می‌دهد. این مکانیسم‌ها شامل تشکیل بیوفیلم و تولید سلول‌های ماندگار است. بیوفیلم به‌عنوان یک مانع انتشار برای محدودکردن دسترسی آنتی‌بیوتیک به سلول‌های باکتریایی عمل می‌کند. از این گذشته، سلول‌های مقاوم به چند دارو که قادر به زنده ماندن در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها هستند، نیز می‌توانند در بیوفیلم تشکیل شوند(۸). سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با تولید بیوفیلم و فاکتورهای بیماری‌زا می‌تواند بر دفاع سلول‌های میزبان غلبه کند که این کار از طریق سیستم QS تنظیم می‌شود(۹). QS در باکتری باعث تولید و انتشار مولکول‌های سیگنالینگ به نام خودالقاگر

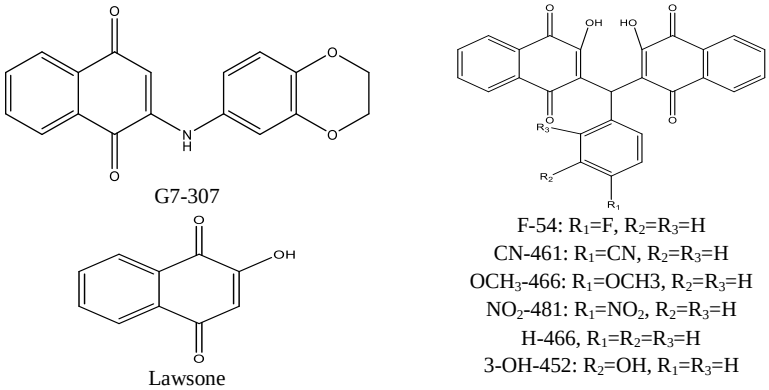
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

(auto-inducer) می‌شود که غلظت این مولکول‌ها در پی افزایش تراکم سلولی افزایش می‌یابد(۱۰).

سیستم QS *سودوموناس آئروژینوزا* دارای سه مسیر اصلی است: las، rhl و pqs. طبق مطالعات، هر سه مسیر نقش اساسی در چرخه زندگی بیوفیلم ایفا می‌کنند. هر شبکه دارای یک پروتئین تنظیم‌کننده رونویسی به نام‌های LasR، RhlR و PqsR است که با مولکول سیگنال‌دهی مربوطه خود فعال می‌شوند. در حالی که آسیل هموسرین لاکتون‌ها، 3-oxo-C12-AHL و C4-HSL، مولکول‌های خودالقاگر مسیرهای LasR و RhlR هستند، ۳و۴-دی هیدروکسی-۲-هپتیل کینولین(PQS)، پیش‌ساز آن ۲-هپتیل-۴-هیدروکسی کینولین (HHQ) و ۲-نونیل-۴-هیدروکسی کینولین (NHQ) لیگاندهای طبیعی PqsR هستند. این دسته تشکیل بیوفیلم را در مراحل اولیه عفونت و التهاب *سودوموناس* ایجاد می‌نمایند. بر این اساس، انتظار می رود که مهارکننده‌های PqsR به‌طور قابل توجهی تشکیل بیوفیلم را کاهش دهند. QS در *سودوموناس آئروژینوزا* هم‌چنین تولید فاکتورهای بیماری‌زا مانند پروتئاز، رامنولیپیدها، پروتئاز قلیایی، لکتین‌ها، سوپراکسیداز دسموتازها، اگزوتوکسین A، سیانید هیدروژن و پیوسیانین را تنظیم می‌کند(۹). بنابراین یک استراتژی مؤثر برای غلبه بر بیماری زایی این باکتری (تولید عوامل بیماری‌زا) و مقاومت آن (تشکیل بیوفیلم)، تداخل در سیستم QS است(۱۱). در میان عوامل مختلف ضد میکروبی، نفتوکینون‌ها (NQs) با منشأ گیاهی یا شیمیایی، دارای تنوع ساختاری و عملکردی بسیار زیادی هستند و در برابر پاتوژن‌های MDR نیز موثر می‌باشند(۱۲). بنابراین با توجه به خواص ضد باکتریایی نفتوکینون‌ها و شباهت ساختاری بین آن‌ها با مولکول‌های خود القاگر HHQ، PQS و NHQ (تصویر شماره ۱) در این مطالعه به بررسی خواص لاوسون (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)، یک رنگ قرمز نارنجی در برگ‌های گیاه حنا (*Lawsonia inermis*) و گلبرگ‌های گیاه سنبل آبی (*Eichhornia crassipes*)(۱۳) و نیز چندین مشتق آن علیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و شبکه QS آن پرداخته شد (تصویر شماره ۲). مطالعات نشان داده‌اند که لاوسون فعالیت‌های زیستی جالبی مانند آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری، ضدقارچی، ضدالتهابی، ضدتب، ضددرد، ضدسرطان و سایتوتوکسیک دارد(۱۴).



تصویر شماره ۱: ساختار شیمیایی لیگاندهای طبیعی مسیر pqs، مولکول های خود القاگر PQS، HHQ و NHQ



تصویر شماره ۲: ساختار شیمیایی مواد مورد استفاده

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

مواد و روش ها

مواد

کلیه مشتقات لاوسون مطابق مقاله قبلی گل مکانیون و همکاران تهیه و استخراج شدند(۱۵). کلونی‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 (سویه wild type Nottingham) بود. تمام ارزیابی‌های میکروبی در محیط کشت مولر- هینتون آگار (MHA) و محیط کشت مولر- هینتون براس (MHB) خریداری شده از شرکت HiMedia (هند) انجام شد. توبرامایسین از شرکت Sigma-Aldrich (ایالات متحده آمریکا) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی، از جمله ۲و۳و۵-تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC)، کلروفرم، اسید هیدروکلریک، و شیر خشک بدون چربی (skimmed milk) از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند.

روش کار

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) لاوسون و مشتقات آن در برابر باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1

ابتدا از کشت یک شبه باکتری، سوسپانسیون ذخیره با غلظت 10^8 CFU/mL (معادل ۰/۵ مکفارلند) در نرمال سالین استریل تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون، رقت‌های 10^7 CFU/mL و 10^6 ساخته شد. از هرکدام از مواد مورد آزمایش، ۲ mg وزن و با کمک DMSO (۷ v/v درصد) حل شد.

سپس با محیط کشت MHB غنی شده با گلوکز (۲/۵ w/vدرصد)، به حجم ۱ mL رسید. سپس، رقت‌های ۱ mg/mL، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲ ساخته شد و به چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه، ۱۸۰ µL از هر غلظت اضافه شد (به هر غلظت، دو چاهک اختصاص داده شد). در ادامه، ۲۰ µL از سوسپانسیون میکروبی 10^6 CFU/mL به هر چاهک تلقیح شد. پس ازآن پلیت د دمای ۳۷°C انکوبه شده و پس از طی ۱۸ ساعت ۳۰ µL نمک TTC حل شده در آب (با غلظت ۵ mg/mL) افزوده شد و مجدداً پلیت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد.

بررسی توانایی لاوسون و مشتقات آن در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا PAO1

۲۰ µL از سوسپانسیون میکروبی 10^6 CFU/mL *سودوموناس آئروژینوزا*، با ۱۸۰ µl از غلظت‌های زیر MIC ترکیبات منتخب (لاوسون با غلظت ۵۰۰µg/mL و ماده NO_2-481 با غلظت ۲۵۰µg/mL) در محیط کشت MHB غنی شده با گلوکز، در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد (برای هر غلظت ۳ چاهک). سپس این پلیت‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید (محیط کشت داخل هر چاهک روز اول هر ۲۴ ساعت و روز دوم هر ۱۲ ساعت تعویض شد). پس از این مدت، محتوای هر چاهک تخلیه و پس از ۲ بار شستشو با ۱۰۰µL نرمال سالین، ۵۰µL محلول کریستال ویوله (۰/۰۳ w/v درصد) اضافه شد. با حذف کریستال ویوله و شستشوی مجدد هر چاهک با نرمال سالین، آنالیز کمی بیوفیلم با افزودن ۱۰۰ µL اتانول ۹۶ درجه صورت گرفت. جذب کریستال ویوله به عنوان معیاری از میزان بیوفیلم تشکیل شده، در طول موج ۵۹۰ nm خوانده شد (Synergy H4، BioTek). نتایج با کنترل منفی (محیط کشت بدون میکروب) و کنترل مثبت (محیط کشت همراه با میکروب) و کنترل داروئی (توبرامایسین با غلظت ۱ µg/mL) مقایسه شد.

بررسی لاوسون و مشتقات آن از نظر افزایش در اثربخشی آنتی‌بیوتیک توبرامایسین

۲۰ µL از سوسپانسیون میکروبی 10^6 CFU/mL *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1، با ۱۸۰ µL محیط کشت MHB غنی شده با گلوکز، در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد (برای هر غلظت ۳ چاهک). سپس پلیت در دمای ۳۷°C به‌مدت ۳۶ ساعت انکوبه گردید (محیط کشت داخل هر چاهک روز اول هر ۲۴ ساعت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

و روز دوم هر ۱۲ ساعت تعویض شد). در ۱۲ ساعت پایانی غلظت‌های زیر MIC ترکیب NO_2-481 (۱۲۵ µg/mL و ۲۵۰ µg/mL) و لاوسون با/بدون توبرامایسین با غلظت ۱µg/mL به چاهک‌های محیط کشت حاوی باکتری اضافه و مجدداً در دمای ۳۷°C انکوبه شد.

پس از گذشت این زمان، محیط کشت حاوی ترکیبات دارویی تخلیه و ۲۰۰ µL محیط کشت غنی شده با گلوکز حاوی نمک TTC (۵ mg/mL) به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شد. در نهایت، میزان رنگ قرمز که نشان‌دهنده میزان میکروب‌های زنده می‌باشد در طول موج ۴۵۰ nm تعیین گردید. نتایج با کنترل منفی (محیط کشت خالی) وکنترل مثبت (محیط کشت همراه با باکتری) و کنترل داروئی (توبرامایسین و باکتری در محیط کشت MHB) مقایسه شد.

بررسی اثر مشتقات لاوسون در جلوگیری از تولید فاکتورهای بیماری زا

سنجش میزان پیوسیانین

یک کلونی از *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 به ۱۵mL محیط کشت MHB غنی شده با گلوکز، اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل دستگاه شیکر- انکوباتور در دمای ۳۷°C و دور ۲۰۰ rpm قرارگرفت. کشت حاصل پس از سانتریفیوژ و حذف فاز رویی، شستشو و مجدداً در ۵ mL محیط کشت، در داخل ارلن، سوسپانسیون شد. همزمان، ماده NO_2-481 نیز در غلظت‌های $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$ مقدار MIC (۱۲۵ µg/mL و ۲۵۰ µg/mL) به هر ارلن اضافه و کشت‌های جدید مجدداً به‌مدت ۲۴ ساعت با شرایط ذکر شده انکوبه شدند.

پیوسیانین تولید شده با افزودن ۵mL کلروفرم، به صورت منقسم (۲ بار ۲mL و ۱ بار ۱mL)، استخراج شد و به دنبال آن با افزودن اسید هیدروکلریک (۰/۱ M) مجدداً عمل استخراج صورت گرفت. جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۰nm خوانده شد. کنترل منفی (محیط کشت بدون میکروب) و کنترل مثبت (محیط کشت همراه با میکروب و بدون ماده مورد آزمایش) به عنوان شاهد استفاده شد.

سنجش میزان پیووردین

یک کلونی از *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 به ۱۰mL محیط کشت MHB غنی شده با گلوکز، در داخل ارلن اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C با دور ۲۰۰ rpm هم زده شد. در مرحله بعد، سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ و فاز رویی حذف شد. سپس باکتری‌ها در ۵ mL محیط کشت MHB غنی شده، در حضور ماده NO_2-481 با غلظت‌های کم‌تر از MIC (۱۲۵ µg/mL و ۲۵۰ µg/mL)، سوسپانسیون و مجدداً به مدت ۸ ساعت در دستگاه شیکر- انکوباتور با شرایط ذکر شده قرار گرفت. در این مرحله ارلن‌ها با کاغذ آلومینیومی پوشانده شد. بعد از سانتریفیوژ فاز مایع رویی جمع‌آوری گردید. ۲۰۰µL از این فاز داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه مشکی ریخته (برای هر غلظت ۳ چاهک) و نشر فلوروسانس آن ثبت شد (λ_{ex}= ۴۰۰nm و λ_{em}=۴۵۵ nm). نتایج با کنترل مثبت (محیط کشت همراه با میکروب و بدون ماده) و کنترل هر غلظت (محیط کشت همراه با همان غلظت ماده) مقایسه گردید.

سنجش میزان پروتئاز

یک کلونی از *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 به ۱۰mL محیط کشت MHB حاوی ماده NO_2-481 با غلظت‌های زیر MIC (۱۲۵ µg/mL و ۲۵۰ µg/mL)، در داخل ارلن اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C با دور ۲۰۰ rpm هم زده شد. سپس، فاز رویی جدا و با فیلتر سرسرنگی فیلتر گردید. به این فاز ۱mL شیر خشک بدون چربی ۱/۲۵ درصد اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. در نهایت جذب حاصل در طول موج ۶۰۰nm خوانده شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

تحلیل آماری نتایج

تمامی آزمایش‌ها حداقل ۳ بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار بیان شد. تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲، به کمک آزمون برابری میانگین‌های چند گروه مستقل (One-way ANOVA) و با توجه به تست‌های Levene، Tukey و Tamhane با درصد خطای حداکثر ۰/۰۵ (P<۰/۰۰۵) انجام شد.

یافته‌ها

نتایج MIC مواد منتخب در برابر سودوموناس آئروژینوزا PAO1

MIC ترکیبات مختلف در برابر *سودوموناس آئروژینوزا* در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

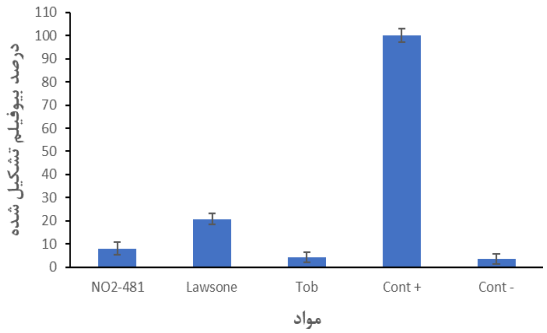
MIC حداقل غلظتی است که در آن اثرات مهاری مشاهده می‌شود، بنابراین اولین چاهکی که در آن رنگ قرمز وجود نداشت به عنوان MIC گزارش شد. فقط برای دو ماده 3-OH-452 و NO_2-481 مقدار MIC به ترتیب برابر ۱ mg/mL و ۰/۵ mg/mL به‌دست آمد و برای سایر مواد در تمامی غلظت‌ها رشد مشاهده شد. MIC توبرامایسین نیز ۲ µg/mL شد.

بررسی توانایی ترکیبات منتخب در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا

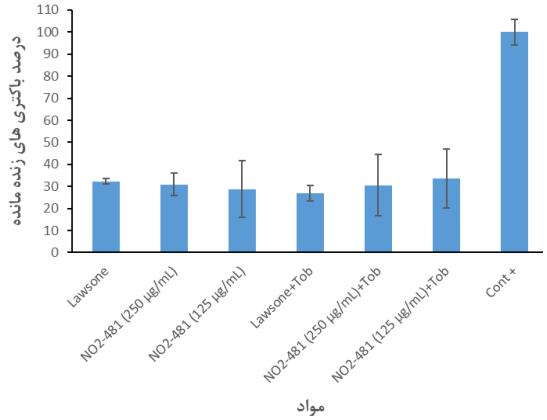
پس از تهیه بیوفیلم‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و افزودن مواد انتخاب شده در مرحله قبل (لاوسون و ماده NO_2-481)، جذب کریستال ویوله موجود در محلول اتانول به عنوان معیاری از بیوفیلم تشکیل شده، در طول موج ۵۹۰nm خوانده شد (نمودار شماره ۱).

بررسی اثر ترکیبات منتخب در افزایش اثربخشی آنتی‌بیوتیک توبرامایسین بر میکروب‌های موجود در بیوفیلم‌های سودوموناس آئروژینوزا PAO1

در این قسمت با توجه به جذب خوانده شده هر چاهک در ۴۵۰nm که رابطه مستقیم با شدت رنگ قرمز ناشی از احیای نمک تترازولیوم در حضور میکروب‌های زنده دارد، اثر ترکیبات منتخب به تنهایی و نیز اثر آن ها در افزایش اثربخشی آنتی بیوتیک توبرامایسین بررسی شد. به عبارت دیگر شدت جذب بالاتر نشان زنده ماندن باکتری‌های بیش‌تری است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱: درصد بیوفیلم تشکیل شده ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور لاوسون و ترکیب NO_2-481 در مقایسه با گروه های کنترل



نمودار شماره ۲: اثر ترکیبات منتخب در نفوذ به بیوفیلم و از بین بردن باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

جدول شماره ۱: نتایج **MIC** (mg/mL) مواد منتخب در برابر *سودوموناس آئروژینوزا*

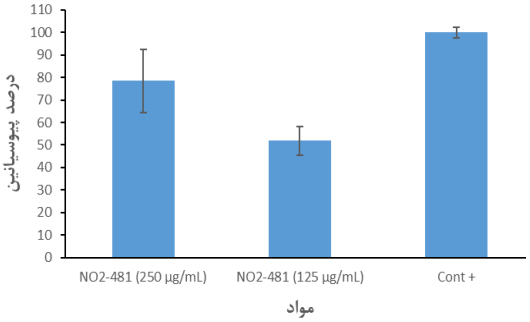
مواد	Lawsone	F-454	CN-461	3-OH-452	NO_2-481	OCH_3-466	H-466	G7-307
MIC	–	–	–	۱	۰/۵	–	–	–

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

بررسی اثر ترکیبات منتخب در جلوگیری از تولید فاکتورهای بیماری زا

تعیین مقدار پیوسیانین

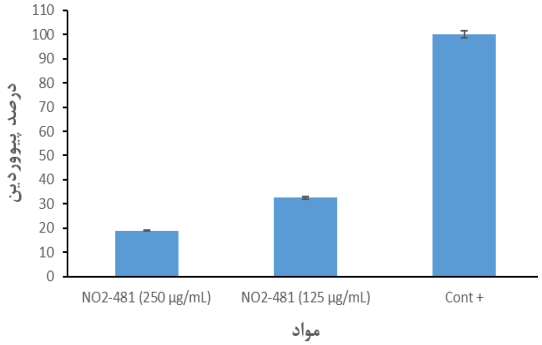
پس از مجاورت ۲۴ ساعته باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با ماده NO_2-481 با غلظت‌های $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$ مقدار MIC، پیوسیانین تولید شده توسط باکتری به رنگ سبز خود را نشان داد. با سانتریفیوژ و جدا کردن بقایای سلولی و استخراج پیوسیانین توسط کلروفرم، رنگ سبز- آبی مشاهده شد که با افزودن هیدروکلریک اسید به فاز آلی استخراج، رنگ صورتی ایجاد گردید. جذب محلول‌های حاصل در طول موج λmax= ۳۸۸ nm خوانده شد. میانگین جذب این غلظت‌ها در مقایسه با کنترل مثبت در نمودار شماره ۳ آمده است. هرچه میزان جذب کمتر باشد میزان تولید پیوسیانین بیش‌تر مهار شده است.



نمودار شماره ۳: درصد پیوسیانین تولید شده ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور ماده NO_2-481 با غلظت های مختلف در مقایسه با گروه کنترل

تعیین مقدار پیووردین

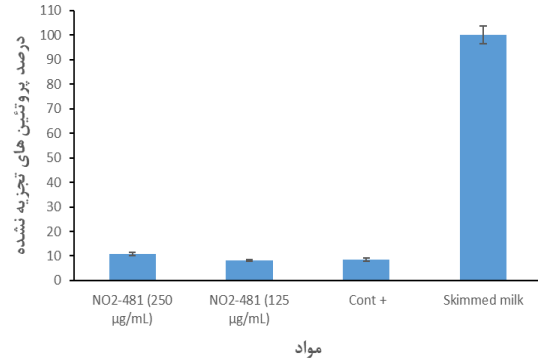
پس از مجاورت ۸ ساعته باکتری رشدیافته با غلظت‌های مختلف ماده NO_2-481، میزان نشر فلوروسانس پیووردین تولید شده در پلیت ۹۶ خانه مشکی خوانده شد. در عین حال جهت محاسبه میزان نشر واقعی ناشی از پیووردین، مقادیر فلورسانس کنترل برای هر غلظت (همان غلظت بدون حضور باکتری) از مقادیر بدست آمده در حضور باکتری کاسته شد. به‌طور کلی هرچه نشر کم‌تر باشد میزان مهار تولید پیووردین بیش‌تر خواهد بود (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: مقدار پیووردین تولید ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور ترکیب NO_2-481 با غلظت های مختلف در مقایسه با گروه کنترل

تعیین مقدار پروتئاز

همان‌طور که بیان شد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و ماده NO_2-481 با غلظت‌های زیر MIC (۱۲۵ µg/mL و ۲۵۰ µg/mL) به مدت ۲۴ ساعت با هم انکوبه شده و پس از سانتریفیوژ و فیلتر کردن، با اضافه نمودن ۱mL شیر خشک بدون چربی، جذب حاصل ثبت شد. هرچه جذب بیش‌تر باشد تولید آنزیم پروتئاز بیش‌تر مهار شده است و مقدار پروتئین‌های تجزیه نشده بیش‌تر می‌باشد (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: مقدار پروتئین‌های تجزیه نشده شیر خشک بدون چربی در حضور ترکیب NO_2-481 با غلظت‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل

بحث

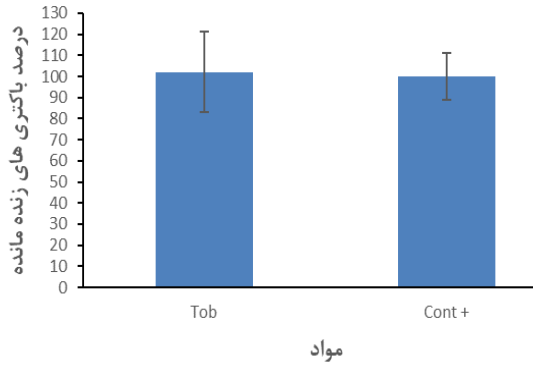
مهارکنندگان سیستمQS و آنتاگونیست‌های باکتریایی، عوامل بالقوه درمانی مناسبی برای مدیریت بیماری‌های

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

عفونی هستند. تاکنون آنالوگ‌های صناعی AHL، مشتقات مبتنی بر کینولون و کینازولینون، مشتقات فورانون و بسیاری از ترکیبات طبیعی عمدتاً با منشاء گیاهی، برای مهار سیستم QS باکتری‌ها توصیف شده‌اند. از این گذشته، برخی داروهایی که قبلاً کشف شده بودند، فعالیت تعدیل‌کننده QS از خود نشان داده‌اند که از آن جمله می‌توان تداخل آزیترومایسین با سیستم QS *سودوموناس آئروژینوزا* را نام برد(۱۶).

۱و۴-نفتوکینون‌ها در برابر پاتوژن‌های ESKAPE (*انتروکوکوس فاسیوم*، *استافیلوکوکس اوروئوس*، *کلبسیلا نومونیه*، *آسینتوباکتر بومانی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و گونه‌های *انتروباکتر*) و نیز MDR از طریق مکانیسم‌های مختلف مانند تأثیر بر پلاسمیدها، مهار پمپ‌های افلاکس، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، مهار آنزیم DNA ژیراز، اختلال در پتانسیل غشا و مهار بیوفیلم عمل می‌کنند(۱۲). همان‌طورکه پیش‌تر اشاره شد در این مطالعه از لاوسون و برخی مشتقات آن جهت برهم زدن سیستم QS باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد که در واقع نفتوکینون‌هایی با گروه کتونی در موقعیت‌های ۱ و ۴ می‌باشند. در بین مشتقات مورد آزمایش تنها ترکیبات ماده 3-OH-452 و NO_2-481 در بازه غلظتی آزمایش شده دارای MIC بودند که به ترتیب معادل ۱ mg/mL و ۰/۵ بود. بنابراین چون مشتق ۵، ترکیب قوی‌تری بود با غلظت‌های کم‌تر از MIC در مرحله بعد مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین ترکیب لاوسون نیز که به وفور در دسترس می‌باشد در آزمایشات پیشگیری از تشکیل بیوفیلم، مورد استفاده قرارگرفت. از آن‌جا که هدف اختلال در شبکه QS باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (و نه از بین بردن آن) می باشد انجام این کار منطقی است چرا که اساس مقاوم شدن باکتری‌ها به ترکیبات ضد میکروبی موجود، تلاش برای رشد و بقا است و در صورتی که ترکیبی بر این دو موضوع، تأثیر منفی نگذارد مقاومت باکتریایی نیز پیش نخواهد آمد(۹). در مرحله بعد که ارزیابی توانایی ترکیبات منتخب در پیشگیری از تشکیل بیوفیلم می باشد، این مشتقات از ابتدا همراه با محیط کشت به سوسپانسیون باکتریایی افزوده شدند. هرچه مقدار جذب به دست آمده در این مرحله پایین‌تر از کنترل مثبت باشد بیانگر تشکیل بیوفیلم کم‌تر و در نتیجه اثر بخشی بهتر ماده منتخب می‌باشد. بر همین اساس با استفاده محاسبات آماری هر دو ترکیب لاوسون و NO_2-481 که میانگین جذب آن‌ها با کنترل مثبت تفاوت معنی‌داری داشت برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

درمرحله بعد به بررسی تقویت اثر احتمالی توبرامایسین در حضور لاوسون و ماده NO_2-481 با غلظت‌های مختلف پرداخته شد. مشاهده شد که در این آزمون نیز اختلاف معنی‌داری میان غلظت‌های مورد استفاده با کنترل مثبت وجود دارد، اما میانگین جذب‌های به‌دست آمده در حضور توبرامایسین، با عدم حضور آن تفاوت معنی‌داری ندارد که نشان‌دهنده عدم توانایی این آنتی‌بیوتیک در نفوذ به داخل بیوفیلم تشکیل شده است. بنابراین اثر مشاهده شده در کاهش میزان جذب تنها ناشی از نفوذ خوب مواد به داخل بیوفیلم بوده است. جهت اطمینان از این موضوع که آیا توبرامایسین نتوانسته به داخل بیوفیلم تشکیل شده نفوذ کند یا به نحوی در اثر وجود سایر مواد بی‌اثر شده است، آزمایش مجدداً با توبرامایسین و در غلظت MIC تکرار و مشاهده شد میزان جذب با کنترل مثبت تفاوتی نداشت (نمودار شماره ۶). این موضوع تأییدی بر عدم توانایی توبرامایسین در نفوذ به بیوفیلم تشکیل شده است.



نمودار شماره ۶: مقایسه میزان زنده مانی *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور و عدم حضور توبرامایسین (۲ µg/mL)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

سپس به بررسی میزان پیوسیانین، پیووردین، و پروتئاز تولید شده در حضور ترکیب منتخب (ماده NO_2-481) پرداخته شد. پیوسیانین (فنازین آبی) به دلیل اهمیت بالینی یکی از رایج‌ترین فنازین‌های مورد مطالعه است و از این رو به‌عنوان یک عامل بیماری‌زایی در نظر گرفته می‌شود. سمیت ناشی از این رنگدانه به دلیل توانایی آن در کاهش اکسیژن مولکولی و تشکیل سوپراکسید است که در نهایت منجر به تولید پراکسید هیدروژن می‌شود. سنتز پیوسیانین توسط QS کنترل می‌شود و این رنگدانه هم‌چنین به‌عنوان عامل کمک‌کننده به توسعه بیوفیلم شناخته شده است. پیووردین نیز رنگدانه دیگری است که توسط *سودوموناس آئروژینوزا* ترشح می‌شود. این سیدروفور فلورسنت با جداسازی ترانسفرین پستانداران و ایجاد فقر آهن در بافت‌های میزبان به بیماری‌زایی این باکتری کمک می‌کند. از سوی دیگر، ترشح اگزوپروتئازها یک ویژگی مهم *سودوموناس آئروژینوزای* پاتوژن است. پروتئازهای هیدرولیتیک با شکستن پروتئین‌های سلول‌های میزبان قدرت تهاجمی باکتری را افزایش می‌دهند(۱۸،۱۷). هر چه مقدار جذب و نشر به‌دست آمده کم‌تر از کنترل مثبت باشد بیانگر مهار بیش‌تر به ترتیب مسیر تولید پیوسیانین و پیوردین در باکتری است.

در این بخش کاهش میزان پیوسیانین تولید شده در حضور ماده NO_2-481 معنی‌دار نمی‌باشد اما در مورد پیووردین این کاهش نسبت به کنترل مثبت، معنی‌دار بود. در آزمایش بررسی میزان پروتئاز تولید شده توسط باکتری در حضور ماده NO_2-481 نیز هرچه مقدار جذب به دست آمده بیش‌تر از کنترل مثبت باشد بیانگر مهار بیش‌تر تولید پروتئاز توسط ماده NO_2-481 در غلظت‌های زیر MIC می‌باشد. به عبارت دیگر چون در این آزمایش، جذب ثبت شده مربوط به پروتئین‌های شیر خشک بدون چربی است، هر چه مقدار پروتئاز بیش‌تر باشد، پروتئین‌های بیش‌تری تجزیه شده و جذب کم‌تر می‌شود(۱۹) در این‌جا نیز ماده NO_2-481 فعالیت بهتری نسبت به کنترل مثبت نشان نداد. در مطالعه‌ای که توسط Qais و همکاران (۲۰۲۱) منتشر شد نشان داده شد که پلومباژین (Plumbagin)، یک ۱و۴-نفتوکینون، می‌تواند باعث مهار طیف وسیع بیوفیلم‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی (*کروموباکتریوم وایولاسئوم*، *سراشیا مارسه سنس*، و *سودوموناس آئروژینوزا*) شود به طوری که بیش از ۷۰ درصد مهار تشکیل بیوفیلم توسط *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 در بالاترین غلظت زیر MIC آزمایش شده (۱۲۵ µg/mL) مشاهده شد. هم‌چنین مشخص شد که این ترکیب می‌تواند باعث کاهش معنی‌دار و وابسته به دوز تولید پیوسیانین، پیووردین و پروتئاز در این باکتری شود(۱۷). ترکیب لاوسون با حدود ۸۰ درصد کاهش و ترکیب NO_2-481 با حدود ۹۰ درصد کاهش اثرات ضد بیوفیلمی قوی تری نسبت به پلومباژین داشته‌اند.

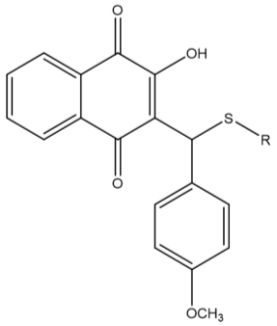
پیش‌تر نیز در مطالعه‌ای که توسط Gupta و همکاران (۲۰۱۷) منتشر شده بود تأثیر این ترکیب بر دو سویه دیگر *سودوموناس آئروژینوزا* (MTCC 424 و MTCC 2488) بررسی شد. نتایج آن‌ها نشان داد که پلومباژین قادر است در حدود ۶۰ درصد تولید بیوفیلم این دو سویه را کاهش دهد. در عین حال، ترکیب مذکور بر روی تخریب بیوفیلم تشکیل شده، به تنهایی و در ترکیب با جنتامایسین، اثر معنی‌داری داشت که این موضوع ارزش این ترکیب را دوچندان می‌کند. هم‌چون مطالعه قبلی، نتایج ارزیابی تأثیر پلومباژین بر فاکتورهای بیماری‌زای پروتئاز، پیووردین و پیوسیانین، به تنهایی و در ترکیب با جنتامایسین، حکایت از کاهش معنادار هر سه فاکتور داشت(۱۸).

از سوی دیگر، Han و همکاران اثر ترکیب ژوگلون (Juglone) را روی *سودوموناس آئروژینوزا* سویه ATCC 10145 بررسی کردند. Han و همکاران در نهایت به این نتیجه رسیدند که این ترکیب می‌تواند سبب آتروفی و آسیب به غشای سلول باکتری و به‌دنبال آن کلاپس و خروج حجم زیادی از محتوای سلولی از جمله پروتئین‌ها و نوکلئیک اسید شود. هم‌چنین مشخص

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

شد که قرار گرفتن *سودوموناس آئروژینوزا* در معرض ژوگلون سبب افزایش معنی‌دار گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود که به نوبه خود باعث افزایش غیر طبیعی میزان استرس اکسیداتیو می‌گردد. به‌همین‌ترتیب، این ترکیب توانست میزان تشکیل بیوفیلم‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و سلول‌های داخل بیوفیلم را وابسته به غلظت، به صورت معنی‌دار مهار نماید(۲۰).

Novais و همکاران ۱۲ مشتق ۱و۴-نفتوکینون را سنتز و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای اهمیت بالینی، از جمله دو سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853 و ATCC 15442) بررسی کردند. نتایج نشان داد که اکثر ترکیبات در برابر این دو باکتری، فعال بودند. هم‌چنین اثر کلیه نفتوکینون‌های فعال، بر تشکیل بیوفیلم سویه مولد بیوفیلم (ATCC 15442)، بررسی شد که نشان داد ترکیبات 9e، 9f، 9j، و 9k (تصویر شماره ۳) دارای خاصیت مهارکنندگی بیوفیلم می‌باشند و در این میان ترکیب 9j با مهار تقریباً ۶۵ درصد پیشتاز بود. از این گذشته دو ترکیب 9e و 9k در غلظت‌های بالاتر قادر به کاهش میزان بیوفیلم بالغ تشکیل شده بودند(۲۱). که باز هم ترکیب لاوسون (۸۰ درصد کاهش) و ترکیب NO_2-481 (۹۰ درصد کاهش) اثرات ضد بیوفیلمی قوی‌تری نسبت به این ترکیبات داشته اند.



9e: R=4-ClC_6H_4
9f: R=4-FC_6H_4
9j: R=4-$CH_3OC_6H_4$
9k: R=4-$CH_3SC_6H_4$

تصویر شماره ۳: ساختار شیمیایی مشتقات ۱و۴-نفتوکینونی مؤثر بر سویه مولد بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در مطالعه Novais و همکاران

هم‌چنین، در مطالعه‌ای که توسط Lemos و همکاران انجام شد نشان داده شد که سایکوروبرین (Psychorubrin)، یک پیرانونفتوکینون طبیعی که در گیاهان مختلفی یافت می‌شود خصوصیات ضد میکروبی بالقوه‌ای دارد و می‌تواند در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مختلف از جمله *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر باشد(۲۲). با توجه به بروز مقاومت در پاتوژن‌ها نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو، یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید، امری ضروری است. در این میان اختلال در سیستم QS، می‌تواند یک راهکار مناسب برای خنثی کردن خاصیت بیماری زایی باکتری، بدون نیاز به از بین بردن آن باشد.

در مجموع به نظر می‌رسد که بسیاری از نفتوکینون‌ها، ترکیبات ضد میکروبی مؤثری در برابر بسیاری از پاتوژن‌ها باشند. در این مطالعه به بررسی اثرات ضد *سودوموناس* ترکیب لاوسون (اصلی‌ترین ترکیب موجود در عصاره برگ گیاه حنا) و برخی مشتقات صناعی آن پرداخته شد. برخلاف انتظار، از میان ترکیبات مذکور، تنها یکی از این مشتقات (ترکیب NO_2-481) اثرات قابل توجهی از خود نشان داد. درک این موضوع که رابطه ساختمان و اثر ترکیبات نفتوکینونی چگونه است نیازمند مطالعات بیش‌تر می‌باشد. هم‌چنین هرگونه استفاده بالینی از این ترکیبات نیازمند بررسی مطالعات سمیت سلولی و مطالعات حیوانی در مرحله اول و مطالعات بالینی در مرحله بعدی می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش برگرفته از پایان نامه دکتری حرفه ای داروسازی آقای مهران قانعی است. بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد از این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.MUMS.PHARMACY.REC.1397.008 تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

References

1. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 2000; 54(1): 49-79.
2. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin Infect Dis 2001; 33(8): 1387-1392.
3. Gomez S, Bureau L, John K, Chêne E-N, Débarre D, Lecuyer S. Substrate stiffness impacts early biofilm formation by modulating *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility. Elife 2023; 12: 1-34.
4. Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9(1): 34-39.
5. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc 2018; 81(1): 7-11.
6. Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. Biocatal Agric Biotechnol 2016; 7: 56-66.
7. Wojnicz D, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Kicia M, Tichaczek-Goska D. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. Urol Res 2012; 40(6): 683-697.
8. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv 2019; 37(1): 177-192.
9. Tajani AS, Tehranizadeh ZA, Pourmohammad A, Pourmohammad A, Iranshahi M, Farhadi F, et al. Anti-quorum sensing and antibiofilm activity of coumarin derivatives against Pseudomonas aeruginosa PAO1: Insights from in vitro and in silico studies. Iran J Basic Med Sci 2023; 26(4): 445-452 (Persian).
10. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 2001; 55(1): 165-199.
11. Soheili V, Tajani AS, Ghodsi R, Bazzaz BSF. Anti-PqsR compounds as next-generation antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*: A review. Eur J Med Chem 2019; 172: 26-35.
12. Mone NS, Syed S, Ravichandiran P, Satpute SK, Kim AR, Yoo DJ. How Structure–Function Relationships of 1, 4-Naphthoquinones Combat Antimicrobial Resistance in Multidrug-Resistant (MDR) Pathogens. Chem Med Chem 2023; 18(2): 1-24.
13. Dweck AC. Natural ingredients for colouring and styling. Int J Cosmet Sci 2002; 24(5): 287-302.
14. de Oliveira AS, Brighente IM, Lund RG, Llanes LC, Nunes RJ, Bretanha LC, et al. Antioxidant and antifungal activity of naphthoquinones dimeric derived from lawsone. J Biosci Med 2017; 5(2): 39-48.
15. Golmakaniyoon S, Askari VR, Abnous K, Zarghi A, Ghodsi R. Synthesis, characterization and in-vitro evaluation of novel naphthoquinone derivatives and related imines: Identification of new anticancer leads. Iran J Pharm Res 2019; 18(1): 16-29 (Persian).
16. Tajani AS, Jangi E, Davodi M, Golmakaniyoon S, Ghodsi R, Soheili V, et al. Anti-quorum sensing potential of ketoprofen and its derivatives against *Pseudomonas aeruginosa*: insights to in silico and in vitro studies. Arch Microbiol 2021; 203(8): 5123-5132.
17. Qais FA, Khan MS, Ahmad I, Husain FM, Al-Kheraif AA, Arshad M, et al. Plumbagin

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]

inhibits quorum sensing-regulated virulence and biofilms of Gram-negative bacteria: in vitro and in silico investigations. Biofouling 2021; 37(7): 724-739.

18. Gupta P, Sarkar A, Sandhu P, Daware A, Das M, Akhter Y, et al. Potentiation of antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a study with plumbagin and gentamicin. J Appl Microbiol 2017; 123(1): 246-261.
19. Soltani S, Fazly Bazzaz BS, Hadizadeh F, Roodbari F, Soheili V. New Insight into Vitamins E and K1 as Anti-Quorum-Sensing Agents against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2021; 65(6): 1-10.
20. Han Q, Yan X, Zhang R, Wang G, Zhang Y. Juglone inactivates *Pseudomonas aeruginosa* through cell membrane damage, biofilm blockage, and inhibition of gene expression. Molecules 2021; 26(19): 1-17.
21. Novais JS, Moreira CS, Silva ACJ, Loureiro RS, Figueiredo AMS, Ferreira VF, et al. Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram-negative bacteria in biofilms. Microb Pathog 2018; 118: 105-114.
22. Lemos AS, Campos LM, Melo L, Guedes MC, Oliveira LG, Silva TP, et al. Antibacterial and antibiofilm activities of psychorubrin, a pyranonaphthoquinone isolated from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). Front Microbiol 2018; 9: 1-11.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-13]