لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۴، دورهٔ ۱۲، شمارهٔ ٤، صفحات: ۱۸-۱۲ .

مقاله پژوهشی

آیا فتودینامیک‌درمانی ضدمیکربی زیر حد کشنده منجر به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های Pseudomonas Aeruginosa می‌شود؟

نسیم کاشف [۱]
رقیه عفیفی راد [۲]
محمدرضا رزاقی [۳]

خلاصه

مقدمه: فتودینامیک‌درمانی ضد میکربی(APDT) روشی امیدبخش برای کشتن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. در این روش، حساسگر نوری در مجاورت طول موج خاصی از نور منجر به القاء واکنش‌های فتوتوکسیک می‌شود.

اگر APDT زیر حد کشنده باشد و نتواند موجب مرگ تمامی سلول‌های میکربی گردد، باکتری‌های باقی‌مانده در محل با استرس اکسیداتیو مواجه می‌شوند که می‌تواند منجر به افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها شود. لذا، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر APDT زیرحد کشنده بر حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های Pseudomonas Aeruginosa بود.

روش بررسی: چهل جدایهٔ بالینی P. aeruginosa (۲۰ جدایهٔ حساس به آنتی‌بیوتیک و ۲۰ جدایهٔ مقاوم به آنتی‌بیوتیک)، تحت تأثیر APDT با رنگ تولوئیدن‌بلو (با غلظت نهایی ۱۰۰µg/ml و چگالی انرژی ۲۳/۴J/cm^2) و متیلن‌بلو (با غلظت نهایی ۱ mg/ml و چگالی انرژی ۸۱/۹J/cm^2) قرار گرفتند. بعد از مواجهه، حساسیت آنتی‌بیوتیکی ارگانیسم‌های زنده نسبت به گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین شد و با گروه شاهد مقایسه گردید.

یافته‌ها: میانگین کاهش لگاریتمی کل سلول‌های زنده با رنگ متیلن‌بلو در جدایه‌های مقاوم ۱/۱۶±۰/۰۶ و در جدایه‌های حساس ۰/۹±۰/۲۴ و با رنگ تولوئیدن‌بلو در جدایه‌های مقاوم ۰/۴۵±۰/۳۹ و در جدایه‌های حساس ۰/۵۷±۰/۲۴ بود. باتوجه به آنکه کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده کمتر از ۳ بود، APDT اثر کشنده نداشت. در ۴۰ سویهٔ مورد مطالعه حساسیت به سیپروفلوکساسین پس از APDT با متیلن‌بلو افزایش یافت. این نتیجه برای آمیکاسین و سفتازیدیم نیز به‌دست آمد (P<۰/۰۵). بعد از APDT باتولوئیدن‌بلو الگوی حساسیت ضدمیکروبی ۴۰ سویه تغییری نکرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که مواجههٔ جدایه‌های P. aeruginosa با APDT زیر حد کشنده منجر به افزایش مقاومت این جدایه‌ها نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی نشد.

واژه‌های کلیدی: Pseudomonas Aeruginosa، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استرس اکسیداتیو، فتودینامیک‌درمانی ضد میکربی

۱. استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکربیولوژی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. کارشناس ارشد میکربیولوژی، بخش میکربیولوژی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استاد اورولوژی، مرکز تحقیقات کاربرد لیزر در علوم پزشکی، بیمارستان شهدای تجریش، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسندهٔ مسئول: نسیم کاشف، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۳۵۵۸
پست الکترونیک: kashefn@khayam.ut.ac.ir

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-09]

مقدمه

ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در عوامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی در سرتاسر جهان، بخصوص در بین جدایه‌های بیمارستانی، استفاده از داروهای موجود را در درمان عفونت‌های ناشی از این عوامل محدود کرده است[۱و۲]. بنابراین محققان به‌دنبال یافتن راهکارهای درمانی جدید ضد میکربی هستند که غیرتهاجمی و غیرسمی باشند. این راهکارها باید کارآمدتر و سریع‌تر از آنتی‌بیوتیک‌های رایج عمل کنند درعین‌حال عوامل بیماری‌زا نتوانند به‌راحتی نسبت به آن‌ها مقاوم شوند[۳]. یکی از این راهکارهای امیدبخش، فتودینامیک‌درمانی ضد میکربی (APDT) است.

در APDT از یک رنگ غیرسمی که حساسگر نوری نامیده می‌شود، استفاده می‌گردد. این رنگ در سلول‌ها جایگزین می‌شود و سپس با طول‌موج خاصی از نور فعال می‌گردد و درنهایت، در حضور اکسیژن گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند. این گونه‌های فعال اکسیژن قادرند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و سایر ترکیبات سلولی راتخریب‌کنند[۴و۵].

اگرقرار باشد APDT در بالین استفاده شود (به‌عنوان مثال در درمان یک عفونت موضعی)، این احتمال وجود دارد که حساسگر نوری در محل هدف در غلظت‌های کمتر از حد کشنده باقی بماند و بعداً با نوری غیراز منبع نوری درمانی دوباره فعال شود. بنابراین هر باکتری که در محل عفونت زنده و باقی مانده باشد، در معرض دوزهایی از APDT قرار می‌گیرد که کشنده نخواهد بود، اما باکتری‌های زنده‌مانده را در معرض استرس اکسیداتیو (گونه‌های فعال اکسیژن) قرار خواهد داد. این مسئله به‌خوبی روشن است که استرس اکسیداتیو منجر به افزایش موتاژنیسیته می‌شود[۶] که از نظر تئوری می‌تواند منجربه انتخاب طبیعی سویه‌های برتر[۷] و به‌دنبال آن افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر شود. این پدیده در ارتباط با سایر عوامل درمانی مورداستفاده درعفونت‌های باکتریایی دیده شده است[۸].

از سوی دیگر، استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک پیام محیطی، میزبانی مهم برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کند و منجربه شروع پاسخ‌های متفاوتی در آن‌ها می‌شود. استرس اکسیداتیو در میکروارگانیسم‌ها، به‌واسطهٔ مکانیسم‌های درک اکسیداسیون حس می‌شود. پروتئین‌های تنظیم‌کنندهٔ این استرس تنها به این استرس پاسخ نمی‌دهند، بلکه اثرات چندگانه‌ای در میکروارگانیسم‌ها دارند. ازآن‌جمله می‌توان به مکانیسم‌های درک اکسیداسیون در باکتری Pseudomonas Aeruginosa نام برد. اخیراً در این باکتری پروتئینی با نام OspR شناسایی شده است که علاوه‌بر پاسخ‌دهی به استرس اکسیداتیو، در تولید پیگمان، مقاومت به بتالاکتام‌ها و انتشار سودوموناس حین عفونت دخیل است[۹]. این نتایج پیشنهاد می‌کند که مواجهه با مقادیر مشخص از استرس اکسیداتیو ممکن است منجربه فعال‌شدن مسیرهای دفاعی در این باکتری شود و درنهایت این باکتری را نسبت به کشته‌شدن توسط عوامل ضدمیکربی یا سلول‌های ایمنی میزبان مقاوم‌تر کند. همچنین طبق مطالعهٔ Djoric و همکاران در سال ۲۰۱۵، استرس اکسیداتیو چه از منابع خارجی و چه از متابولیسم داخل سلول منشأ گرفته باشد، در باکتری Enterococcus Faecalis منجربه افزایش مقاومت ذاتی این باکتری به سفالوسپورین‌ها می‌شود. استرس اکسیداتیو (H2O2)، باعث فعال‌شدن یک سیستم پیام‌رسان در این باکتری می‌شود. این سیستم به‌عنوان شاخص مقاومت به سفالوسپورین‌ها در E.faecalis شناخته می‌شود[۱۰].

P.aeruginosa یک بیماری‌زای فرصت‌طلب در انسان محسوب می‌شود که به علت مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها در جوامع پزشکی مطرح است. این باکتری همچنین نسبت به APDT تا حدودی مقاومت دارد[۱۱]. این باکتری برای مقابله با استرس اکسیداتیو چندین سیستم دفاعی دارد که شامل پروتئین‌هایی چون کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، تیوردوکسین، گلوتاردوکسین و مولکول‌های کوچکی چون گلوتاتیون و ملانین هستند[۹]. رنگدانه‌های این باکتری (پیوملانین، فنازین‌ها و پیوسیانین) نیز می‌توانند منجر به تحمل درمقابل استرس فتواکسیداتیو ناشی از APDT شوند[۱۱]. بنابراین ما با طراحی این مطالعه قصد داشتیم دریابیم که آیا APDT زیرحد کشنده که قادر نیست سودوموناس را به‌طور کامل از محیط پاک کند، اما منجربه مواجههٔ این باکتری با گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود، می‌تواند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی علیه این میکروارگانیسم را افزایش دهد؟

روش بررسی

جدایه‌ها

۴۰ جدایهٔ P.aeruginosa از بیماران سوختگی بیمارستان شهید مطهری تهران در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین الگوی حساسیت ضدمیکربی جدایه‌ها قبل و بعد از آزمون‌های فتودینامیک‌درمانی‌ضدمیکروبی

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از شرکت پادتن طب خریداری شد. آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده عبارت‌انداز:

جنتامیسین GM 10 – ایمیپنم IPM 10 – آمیکاسین AN 30 – سیپروفلوکساسین CP 5 – سفتازیدیم CAZ 30 – پیپراسیلین/تازوباکتام PIT100/10.

الگوی حساسیت ضدمیکربی هر جدایه با استفاده از روش استاندارد انتشار

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-09]

از دیسک مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسهٔ استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین شـد[۱۲] که در زیر به‌اختصار بیان می‌شـود:
برای هر جدایه سوسپانسـیونی با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه و برروی محیـط مولرهینتون آگار کشـت داده شـد. دیسـک‌های آنتی‌بیوتیک برروی محیط گذاشـته شـدند. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس قطر هالهٔ عدم رشد اطراف هر دیسـک با خط‌کش اندازه‌گیری و ثبت شـد.

در تحقیقات، مقاومت چند دارویی (MDR) مقاومتی نسبت‌به حداقل ۳ کلاس از عوامل ضدمیکربی محسـوب می‌گردد [۱۳]. برهمین اساس جدایه‌ها به دوگروه مقاوم و حساس به دارو تقسیم شدند. هرگروه به‌طور مسـاوی دارای ۲۰ عضو بود.

پـس از انجـام آزمـون APDT برای هـر جدایه، دوباره حساسـیت آنتی‌بیوتیکـی هـر جدایه تعیین شـد تا اثر APDT بـر تغییر الگوی حساسـیت‌ضدمیکربی جدایه‌هابررسـی‌شـود.

فتودینامیک‌درمانی ضدمیکروبی

بـرای ایـن آزمـون، سـوسـپـانسـیـون بـاکـتـریـایـی بـا غـلـظـت 10^8 CFU/ml ×۲-۱ با تولوئیدین‌بلو O (تهیه‌شـده از شرکت سیگما، آمریـکا) در غلظت نهایی ۱۰۰ µg/ml انکوبه و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. پس از انکوباسیون در تاریکی و در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ دقیقه، سوسپانسـیون باکتریایـی در هر چاهک تحت تابش نور لیزر قرمز با طول‌مـوج ۶۳۰ نانومتر و توان خروجی $26\ mW/cm^2$ به‌مدت ۱۵ دقیقـه قـرار گرفت. انرژی مورد اسـتفاده در ایـن مطالعه J/cm^2 ۲۳/۴ بـود. منبع نوری یک لیزر دیـود ۱۰ میلی‌وات (MUSTANG، سـاخت کشور روسـیه) بود. درب پلیت‌ها در حین تابش به‌منظور حفظ شرایط اسـتریل بسته نگهداشته شـد. پس از تابش، ۱۰۰ میکرولیتر از هر چاهک برداشـته و در رقت‌های سـریال ۱۰ تایی بر روی آگار مغذی کشـت داده شد. پس از ۲۴ سـاعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، تعداد کلونی‌های رشدکرده بر سطح محیط، شمارش شدند. تمام آزمایشات سه‌بار تکرار شدند. گروه‌های کنترل نور (بدون حساسگر نوری) و کنترل دارو (بدون تابش نور) نیز بررسـی شـدند.

تمـام این مراحل برای رنـگ متیلن‌بلو با غلظت نهایی ۱ mg/ml و با چگالـی انرژی معادل $81/9\ J/cm^2$ نور قرمـز با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر انجام شـد. منبـع نوری برای فعال‌سـازی متیلن‌بلو، لیـزر دیود با توان خروجی ۳۵ mW بود (Lasotronic، سـاخت کشـور سـوئیس).

برای به‌دسـت آوردن چگالی انرژی دسـتگاه‌های لیزر از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$\text{Power Density}(W/cm^2) = \text{Power}(W)/\text{Area of irradiation}(cm^2)$$
$$\text{Energy Density}\ (J/cm^2) = \text{Power Density}(W/cm^2) \times \text{Time}(s)$$

آنالیز آماری

داده‌ها با اسـتفاده از برنامهٔ نرم‌افزاری SPSS ۱۹ تجزیه‌وتحلیل شـدند و برای بررسـی معنی‌داری اختلافات مشاهده‌شـده از T-Test و آزمون Wilcoxon اسـتفاده شـد. مقادیر $P< ۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

فتودینامیک‌درمانی ضدمیکربی برروی ۴۰ جدایهٔ P.aeruginosa

در این مطالعه غلظت رنگ و چگالی انرژی مورد اسـتفاده برای هیچ‌یک از جدایه‌ها به‌تنهایی اثر کشنده نداشت.

برای هرجدایه آزمون APDT با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو انجام شد. براساس جدول ۱، APDT با رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو در غلظت رنگ و چگالی انرژی به‌کاررفته در این مطالعه، سـبب کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری‌های زندهٔ حسـاس به دارو شـد. میانگین کاهش لگاریتمی تعداد سـلول‌های زنده برای رنگ متیلن‌بلـو و تولوئیدن‌بلو به‌ترتیب ۰/۹ و ۰/۵۷ بود.

جدول۱: میانگین کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زندهٔ حسـاس به دارو پس از APDT با متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو

رنگ‌ها	گروه‌ها	(CFU/ml) میانگین $\log_{10}$ ± انحراف معیار	P. value
متیلن‌بلو	کنترل	٦/٩١±٠/٢٨	٠/٠٠١
	آزمایش	٦/٠١±٠/٢٧	
تولوئیدن‌بلو	کنترل	٧/٠٢±٠/١٣	٠/٠٠١
	آزمایش	٦/٤٥±٠/٢٤	

گـروه ها عبارت‌انـداز کنترل و آزمایش که برروی گـروه آزمایش با دو رنـگ متیلن‌بلو (۱mg/ml و چگالی انرژی $81/9\ J/cm^2$) و تولوئیدن‌بلو (۱۰۰µg/ml و چگالـی انـرژی $23/4 J/cm^2$) فتودینامیک‌درمانـی ضدمیکربـی انجام شـد. مقادیر P (حاصل از T-Test) نسـبت به گروه کنترل مقایسه و بیان شده‌اند.

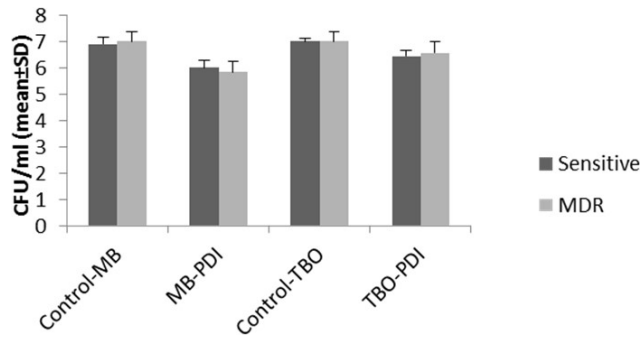
جدول۲، فتودینامیک‌درمانی ضد میکربی با رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو را در غلظـت رنـگ و چگالـی انـرژی به‌کاررفته در ایـن مطالعه برروی باکتری‌های مقاوم به دارو نشان می‌دهد. APDTسبب کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری‌های زندهٔ مقاوم به دارو شـد. میانگین کاهش لگاریتمی تعداد سـلول‌های زنده برای رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو به‌ترتیب ۱/۱ و ۰/۴۵ بود.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-09]

جدول۲: میانگین کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زندهٔ مقاوم به دارو پس از APDT با متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو

رنگ‌ها	گروه‌ها	(CFU/ml) میانگین Log_{10} ± انحراف معیار	P. value
متیلن‌بلو	کنترل	۷/۰۲±۰/۳۶	۰/۰۰۱
	آزمایش	۵/۸۵±۰/۳۹	
تولوئیدن‌بلو	کنترل	۷/۰۲±۰/۳۶	۰/۰۰۱
	آزمایش	۶/۵۷±۰/۴۲	

گروه‌ها عبارت‌اند از کنترل و آزمایش که برروی گروه آزمایش با دو رنگ متیلن‌بلو (۱ mg/ml و دوز نوری ۸۱/۹ J/cm^2) وتولوئیدن‌بلو (۱۰۰ µg/ml و چگالی انرژی ۲۳/۴J/cm^2) فتودینامیک‌درمانی ضدمیکربی انجام شده است. مقادیر P (حاصل از T-Test) نسبت به گروه کنترل مقایسه و بیان شده‌اند.



نمودار۱: مقایسهٔ کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زندهٔ حساس و مقاوم به دارو پس از فتودینامیک‌درمانی ضدمیکربی با متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو

در یک جمع‌بندی کلی و باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده (نمودار ۱) می‌توان گفت که بین جدایه‌های حساس و مقاوم به داروی مورد آزمون درپاسخ به APDT تفاوت معناداری وجود نداشت ($P>0/05$).

درصورتی‌که کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده بیشتر یا مساوی ۳ باشد[۱۴]، APDT اثرکننده خواهد داشت. باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده چون کاهش لگاریتمی جدایه‌های مورد مطالعه پس از APDT با هردو رنگ بین ۰/۴۵-۱/۱ بود، بنابراین اثر APDT در این جدایه‌ها زیر حد کشنده تلقی شد.

اثر فتودینامیک‌درمانی ضد میکربی زیر حد کشنده بر الگوی حساسیت ضد میکربی جدایه‌ها

جدول ۳ و ۴ الگوی حساسیت ضدمیکربی جدایه‌ها را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین 10 GM – ایمیپنم 10 IPM – آمیکاسین 30 AN – سیپروفلوکساسین 5 CP – سفتازیدیم CAZ 30 – پیپراسیلین / تازوباکتام 100/10 PIT، قبل و بعداز APDT با دورنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد اثر APDT زیر حد کشنده بر الگوی حساسیت ضدمیکربی جدایه‌ها باتوجه به تفاوت جدایه‌ها و نوع رنگ مختلف بود. در ۴۰ جدایهٔ مورد مطالعه، حساسیت به سیپروفلوکساسین پس از APDT با متیلن‌بلو افزایش یافت. این نتیجه برای آمیکاسین و سفتازیدیم نیز به‌دست آمد (اختلاف معنی‌دار $P<0/05$). این درحالی‌است که مقاومت به جنتامیسین افزایش یافت. بعد از APDT باتولوئیدن‌بلو الگوی حساسیت ضدمیکروبی ۴۰ سویه تغییری نکرد.

جدول۳: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها قبل و بعد از فتودینامیک‌درمانی ضد میکربی زیر حد کشنده با رنگ متیلن‌بلو

نمونهٔ آنتی‌بیوتیک	درصد جدایه‌ها قبل از APDT		درصد جدایه‌ها بعد از APDT		p value
	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	
جنتامیسین	۴۷/۵	۵۲/۵	۳۵	۶۵	۰/۰۰۸
ایمیپنم	۴۵	۵۵	۶۰	۴۰	۰/۳۱۷
آمیکاسین	۵۰	۵۰	۶۲/۵	۳۷/۵	۰/۰۲۵
سیپروفلوکساسین	۴۵	۵۵	۶۰	۴۰	۰/۰۳۴
سفتازیدیم	۴۷/۵	۵۲/۵	۶۰	۴۰	۰/۰۲۵
پیپراسیلین /تازوباکتام	۵۰	۵۰	۴۰	۶۰	۰/۳۱۷

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-09]

جدول۴: الگوی حساسیت ضدمیکربی جدایه‌ها قبل و بعداز فتودینامیک‌درمانی ضد میکربی زیر حد کشنده با رنگ تولوئیدن‌بلو

نمونهٔ آنتی‌بیوتیک	درصد جدایه‌ها قبل از APDT		درصد جدایه‌ها بعداز APDT		p value
	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	
جنتامیسین	٤٧/٥	٥٢/٥	٤٢/٥	٥٧/٥	۰/۳۱۷
ایمیپنم	۴۵	۵۵	۴۵	۵۵	۰/۱۵۷
آمیکاسین	۵۰	۵۰	٤٧/٥	٥٢/٥	۰/٦٥٥
سیپروفلوکساسین	۴۵	۵۵	٥٢/٥	٤٧/٥	۰/۲۵۷
سفتازیدیم	٤٧/٥	٥٢/٥	٤٧/٥	٥٢/٥	۱/۰۰۰
پیپراسیلین/تازوباکتام	۵۰	۵۰	۴۰	۶۰	۰/۱۵۷

داده‌ها به‌صورت درصد می‌باشد و توسط آزمون آماری ویلکاکسون بیان شده‌اند.

بحث

فتودینامیک‌درمانی ضدمیکربی (APDT) روشی امیدبخش برای کشتن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. در این روش حساسگر نوری در مجاورت طول‌موج خاصی از نور، منجر به القاء واکنش‌های فتوتوکسیک می‌شود. اما مسئلهٔ نگران‌کننده درارتباط با کاربرد هر درمان ضدمیکربی غیرآنتی‌بیوتیکی این است که مواجههٔ باکتری‌ها با غلظت‌های زیر حد کشنده باعث ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شود.

در مطالعهٔ حاضر، ۴۰ جدایهٔ P.aeruginosa با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو تیمار شدند و سپس در مجاورت منبع نوری مناسب برای حداکثر جذب هر رنگ قرار گرفتند. پس از آن میزان کشندگی APDT و همچنین اثر آن بر الگوی حساسیت ضد میکربی جدایه‌ها بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد میانگین کاهش لگاریتمی باکتری‌ها با رنگ متیلن‌بلو در جدایه‌های مقاوم به دارو ۰/۰۶±۱/۱ و در جدایه‌های حساس به دارو ۰/۰۴±۰/۸۹ بود. میانگین کاهش لگاریتمی باکتری‌ها با رنگ تولوئیدن‌بلو در جدایه‌های مقاوم به دارو ۰/۳۹±۰/۴۵ و در جدایه‌های حساس به دارو ۰/۲۴±۰/۵۷ مشاهده شد. همچنین تفاوت چندانی در میزان کشندگی APDT درجدایه‌های مقاوم و حساس به دارو مشاهده نشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده چون کاهش لگاریتمی جدایه‌های مورد مطالعه پس ازAPDT باهر دو رنگ، بین ۰/۴۵-۱/۱ (کمتر از ۳ لگاریتم) بود، اثرAPDT در این جدایه‌ها زیر حدکشنده‌تلقی‌شد.

در تحقیق حاضر الگوی حساسیت ضد میکربی با روش انتشار از دیسک انجام شد. درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به شرح زیر می‌باشد: جنتامیسین ۵۲/۵ درصد، ایمیپنم ۵۵ درصد، آمیکاسین ۵۰ درصد، سیپروفلوکساسین ۵۵ درصد، سفتازیدیم ۵۲/۵ درصد و پیپراسیلین/ تازوباکتام۵۰درصد.

الگوی حساسیت ضدمیکربی هر جدایه بعد از APDT نیز تعیین شد. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون نشان داد که اثر زیر حد کشنده APDT بر الگوی حساسیت ضدمیکربی، وابسته به جدایه و حساسگر نوری مورد استفاده بود. به‌عنوان مثال حساسیت به جنتامیسین پس از APDT با متیلن‌بلو کاهش یافت. درحالی‌که حساسیت به آمیکاسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین بعد از آزمون APDT با متیلن‌بلو افزایش یافت. همچنین پس از APDT باتولوئیدن‌بلو، تغییری در الگوی‌حساسیت‌ضدمیکربی‌جدایه‌هامشاهده‌نشد.

کاشف و همکاران (۲۰۱۳) اثر زیر حد کشندهٔ APDT را با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو بر الگوی حساسیت ضدمیکربی ۴۰ جدایهٔ Staphylococcus Aureus بررسی کردند. در این مطالعه افزایش مقاومت به اریترومایسین و آموکسی‌سیلین-کلاوولانات و کاهش مقاومت به اگزاسیلین و پیپراسیلین بعد ازآزمون APDT با تولوئیدن‌بلو دیده شد. همچنین APDT با متیلن‌بلو منجربه افزایش مقاومت به اریترومایسین و آمیکاسین و کاهش مقاومت به اگزاسیلین و پیپراسیلین شد[۱۵]. مک‌ماهون و همکاران نیز در مطالعه‌ای دیگر (۲۰۰۸) اثر زیر حد کشندهٔ APDT با حساسگر نوری روغن درخت چای را بر الگوی حساسیت ضدمیکروبی S.aureus (مقاوم به متی‌سیلین) بررسی کردند. در این مطالعه نیز افزایش

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-09]

مقاومت به فوزیدیک‌اسید، ونکومایسین و لینزولید مشاهده شد[۸].

در مطالعهٔ حاضر، برای تعیین الگوی حساسیت ضد میکربی از روش انتشار از دیسک (Disk Diffusion) استفاده شد. این روش برای نشان دادن تغییرات جزئی در حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها مناسب نیست. لذا بهتر است در مطالعات آینده از روش رقیق‌سازی در آبگوشت (Broth Microdilution) و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک (Minimal Inhibitory Concentration) استفاده شود. به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای که کاشف و همکاران (۲۰۱۴) برروی ۵ جدایهٔ Acinetobacter Baumannii انجام دادند، APDT با دو رنگ متیلن‌بلو وتولوئیدن‌بلو سبب کاهش حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامیسین شد. نکتهٔ جالب توجه در این مطالعه این بود که باکتری‌ها بعد از APDT همچنان نسبت به این ۳ آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند، اما حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای هر ۳ آنتی‌بیوتیک ۴ مرتبه کاهش یافت[۱۶]. در مطالعهٔ Cassidy و همکاران (۲۰۱۰) نیز برای تعیین اثر APDT زیر حد کشنده بر حساسیت جدایه‌های بالینی S.Aureus و P.Aeruginosa از روش رقیق‌سازی در آبگوشت استفاده شد. در این مطالعه APDT با دو رنگ TMP و متیلن‌بلو انجام گرفت و نتایج آن نشان داد که APDT زیر حد کشنده حساسیت آنتی‌بیوتیکی را در ۹۵ درصد از جدایه‌های P.aeruginosa و ۱۰۰ درصد از جدایه‌های S.aureus کاهش نداد[۱۷].

باتوجه به این مطالعات، چنین به‌نظر می‌رسد که باکتری‌هایی که تحت تأثیر APDT زیر حد کشنده قرار گرفته‌اند و به‌طور کامل از محیط پاک نشده‌اند در مواجهه با گونه‌های فعال اکسیژن (استرس اکسیداتیو)، پاسخ‌هایی را از خود بروز می‌دهند که می‌تواند منجربه مقاومت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها شود. البته این امر به عوامل متفاوتی ازجمله نوع حساسگر نوری، سویهٔ باکتری و میزان مواجهه با استرس اکسیداتیو بستگی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعهٔ ما نشان داد که مواجههٔ جدایه‌های P.aeruginosa با APDT زیر حد کشنده منجر به افزایش مقاومت این جدایه‌ها نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی نشد.

پیشنهادها

با توجه به آنکه تاکنون اثر APDT زیر حد کشنده بر باکتری‌ها از جنبه‌های مولکولی بررسی نشده است، بهتر است در مطالعات آینده برای روشن شدن این مطلب علاوه‌بر درنظر گرفتن تغییرات فنوتیپی ناشی از APDT زیر حد کشنده، اثر آن بر بیان ژن‌ها (ازجمله ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی) نیز مطالعه گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت‌های دانشگاه تهران و مرکز تحقیقات کاربرد لیزر در علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-09]

References:

1. Colsky AS, Kirsner RS, Kerdel FA. Analysis of antibiotic susceptibilities of skin wound flora in hospitalized dermatology patients. The crisis of antibiotic resistance has come to the surface. Arch Dermatol 1998; 134: 1006-9.

2. Tenover FC, McGowan JE, Jr. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. Am J Med Sci 1996; 311: 9-16.

3. Taylor PW, Stapleton PD, Paul Luzio J. New ways to treat bacterial infections. Drug Discovery Today 2002; 7: 1086-91.

4. Shackley DC, Whitehurst C, Clarke NW, Betts C, Moore JV. Photodynamic therapy. J R Soc Med 1999; 92: 562-5.

5. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 196-203.

6. Moody CS, Hassan HM. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79: 2855–9.

7. Hassett DJ, Cohen MS. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. Faseb J 1989; 3: 2574–82.

8. McMahon MA, Tunney MM, Moore JE, Blair IS, Gilpin DF, McDowell DA. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (Melaleuca alternifolia). Lett. Appl. Microbiol. 2008; 47: 263–8.

9. Lan L, Murray TS, Kazmierczak BI, He C. Pseudomonas aeruginosa OspR is an oxidative stress sensing regulator that affects pigment production, antibiotic resistance and dissemination during infection. Mol Microbiol. 2010; 75(1): 76–91.

10. Djorić D, Kristich CJ. Oxidative stress enhances cephalosporin resistance of Enterococcus faecalis through activation of a two-component signaling system. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(1): 159-69.

11. Orlandi VT, Bolognese F, Chiodaroli L, Tolker-Nielsen T, Barbieri P. Pigments influence the tolerance of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to photodynamically induced oxidative stress.Microbiology 2015; 161(12): 2298-309.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. In: CLSI document M02-A11. 11th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

13. Falagas ME, P.K. Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 12): 1619-29. Standards for

14. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-caresettings. Recommendations of the healthcare infection controlpractices advisory committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSAhand hygiene task force. American Journal of Infection Control 2002; 30: 1-46.

15. Kashef N, Akbarizare M, Kamrava SK. Effect of sub-lethal photodynamicinactivation on the antibiotic susceptibilityand biofilm formation of clinical Staphylococcus aureus isolates Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2013; 10: 368-73.

16. Kashef N, Yahyaei M. Photodynamic inactivation decreases the minimal inhibitory concentration of antibiotics against Acinetobacter Baumannii from patients with respiratory tract infections. Lasers in Medicine 2014; 11: 8-13.

17. Cassidy CM, Donnelly RF, Tunney MM. Effect of sub-lethal challenge with Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates. J Photochem Photobiol B. 2010; 99(1): 62-6.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-09]