

# آیا فتودینامیک درمانی ضد میکروبی زیر حد کشنده منجر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *Pseudomonas Aeruginosa* می‌شود؟

نسیم کاشف<sup>۱</sup>

رقیه عقیقی راد<sup>۲</sup>

محمد رضا رزاقی<sup>۳</sup>

## خلاصه

**مقدمه:** فتودینامیک درمانی ضد میکروبی (APDT) روشی امیدبخش برای کشتن باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک 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 میکروبی گردد، باکتری‌های باقی مانده در محل با استرس اکسیداتیو مواجه می‌شوند که می‌تواند منجر به افزایش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در این باکتری‌ها شود. لذا، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر APDT زیر حد کشنده بر حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *Pseudomonas Aeruginosa* بود.

**روش بررسی:** چهل جدایه بالینی *P. aeruginosa* (۲۰ جدایه حساس به آنتی بیوتیک و ۲۰ جدایه مقاوم به آنتی بیوتیک)، تحت تأثیر APDT با رنگ تولوئیدین بلو (با غلظت نهایی  $100 \mu\text{g/ml}$  و چگالی انرژی  $23/4 \text{ J/cm}^2$ ) و متیلن بلو (با غلظت نهایی  $1 \text{ mg/ml}$  و چگالی انرژی  $81/9 \text{ J/cm}^2$ ) قرار گرفتند. بعد از مواجهه، حساسیت آنتی بیوتیکی ارگانیزم‌های زنده نسبت به گروهی از آنتی بیوتیک‌ها تعیین شد و با گروه شاهد مقایسه گردید.

**یافته‌ها:** میانگین کاهش لگاریتمی کل سلول‌های زنده با رنگ متیلن بلو در جدایه‌های مقاوم  $1/16 \pm 0/06$  و در جدایه‌های حساس  $0/9 \pm 0/24$  و با رنگ تولوئیدین بلو در جدایه‌های مقاوم  $0/45 \pm 0/39$  و در جدایه‌های حساس  $0/57 \pm 0/24$  بود. با توجه به آنکه کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده کمتر از ۳ بود، APDT اثر کشنده نداشت. در ۴۰ سویه مورد مطالعه حساسیت به سیپروفلوکساسین پس از APDT با متیلن بلو افزایش یافت. این نتیجه برای آمیکاسین و سفتازیدیم نیز به دست آمد ( $P < 0/05$ ). بعد از APDT با تولوئیدین بلو الگوی حساسیت ضد میکروبی ۴۰ سویه تغییری نکرد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه جدایه‌های *P. aeruginosa* با APDT زیر حد کشنده منجر به افزایش مقاومت این جدایه‌ها نسبت به برخی از آنتی بیوتیک‌های مصرفی نشد.

**واژه‌های کلیدی:** *Pseudomonas Aeruginosa*، مقاومت آنتی بیوتیکی، استرس اکسیداتیو، فتودینامیک درمانی ضد میکروبی

۱. استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده 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

نویسنده مسئول: نسیم کاشف، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۳۵۵۸  
پست الکترونیک: kashfn@khayam.ut.ac.ir

## مقدمه

می‌کند که مواجهه با مقادیر مشخص از استرس اکسیداتیو ممکن است منجر به فعال شدن مسیریهای دفاعی در این باکتری شود و در نهایت این باکتری را نسبت به کشته شدن توسط عوامل ضد میکروبی یا سلول‌های ایمنی میزبان مقاوم‌تر کند. همچنین طبق مطالعه 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* منجر به افزایش مقاومت ذاتی این باکتری به سفالوسپورین‌ها می‌شود. استرس اکسیداتیو ( $H_2O_2$ )، باعث فعال شدن 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 ضد عفونی‌کننده‌ها 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، سوپراکسید دیسموتاز، تیوردوکسین، گلو تاردوکسین و مولکول‌های کوچکی چون گلوتاتیون و ملانین هستند [۹]. رنگدانه‌های این باکتری (پیوملانین، فنازین‌ها و پیوسیانین) نیز می‌توانند منجر به تحمل در مقابل استرس فتواکسیداتیو ناشی از APDT شوند [۱۱]. بنابراین ما با طراحی این مطالعه قصد داشتیم دریابیم که آیا APDT زیر حد کشنده که قادر نیست سودوموناس را به‌طور کامل از محیط پاک کند، اما منجر به مواجهه این باکتری با گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود، می‌تواند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی علیه این میکروارگانیسم را افزایش دهد؟

## روش بررسی

### جدایه‌ها

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

### تعیین الگوی حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها قبل و بعد از آزمون‌های فتودینامیک درمانی ضد میکروبی

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از شرکت پادتن طب خریداری شد. آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده عبارت‌اند از:

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

الگوی حساسیت ضد میکروبی هر جدایه با استفاده از روش استاندارد انتشار

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 [۲۰]. بنابراین محققان به دنبال یافتن راهکارهای درمانی جدید ضد میکروبی هستند که غیرتهاجمی و غیرسمی باشند. این راهکارها باید کارآمدتر و سریع‌تر از آنتی‌بیوتیک‌های رایج عمل کنند در عین حال عوامل بیماری‌زا نتوانند به راحتی نسبت به آن‌ها مقاوم شوند [۳]. یکی از این راهکارهای امیدبخش، فتودینامیک درمانی ضد میکروبی (APDT) است.

در APDT از یک رنگ غیرسمی که حساسگر نوری نامیده می‌شود، استفاده می‌گردد. این رنگ در سلول‌ها جایگزین می‌شود و سپس با طول موج خاصی از نور فعال می‌گردد و در نهایت، در حضور اکسیژن گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند. این گونه‌های فعال اکسیژن قادرند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و سایر ترکیبات سلولی را تخریب کنند [۵۴].

اگر قرار 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 زنده مانده را در معرض استرس اکسیداتیو (گونه‌های فعال اکسیژن) قرار خواهد داد. این مسئله به خوبی روشن است که استرس اکسیداتیو منجر به افزایش موتاژنیسیته می‌شود [۶] که از نظر تئوری می‌تواند منجر به انتخاب طبیعی سویه‌های برتر [۷] و به دنبال آن افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر شود. این پدیده در ارتباط با سایر عوامل درمانی مورد استفاده در عفونت‌های باکتریایی دیده شده است [۸].

از سوی دیگر، استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک پیام محیطی، میزبانی مهم برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کند و منجر به شروع پاسخ‌های متفاوتی در آن‌ها می‌شود. استرس اکسیداتیو در میکروارگانیسم‌ها، به‌واسطه مکانیسم‌های درک اکسیداسیون حس می‌شود. پروتئین‌های تنظیم‌کننده این استرس تنها به این استرس پاسخ نمی‌دهند، بلکه اثرات چندگانه‌ای در میکروارگانیسم‌ها دارند. از آن جمله می‌توان به مکانیسم‌های درک اکسیداسیون در باکتری *Pseudomonas Aeruginosa* نام برد. اخیراً در این باکتری پروتئینی با نام OspR شناسایی شده است که علاوه بر پاسخ‌دهی به استرس اکسیداتیو، در تولید پیگمان، مقاومت به بتالاکتام‌ها و انتشار سودوموناس حین عفونت دخیل است [۹]. این نتایج پیشنهاد

### آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS ۱۹ تجزیه و تحلیل شدند و برای بررسی معنی‌داری اختلافات مشاهده شده از T-Test و آزمون Wilcoxon استفاده شد. مقادیر  $P < 0/05$  از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شدند.

### یافته‌ها

#### فتودینامیک درمانی ضد میکروبی بر روی جدایه P.aeruginosa

در این مطالعه غلظت رنگ و چگالی انرژی مورد استفاده برای هیچ یک از جدایه‌ها به تنهایی اثر کشنده نداشت.

برای هر جدایه آزمون APDT با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو انجام شد. براساس جدول ۱، APDT با رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو در غلظت رنگ و چگالی انرژی به کاررفته در این مطالعه، سبب کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری‌های زنده حساس به دارو شد. میانگین کاهش لگاریتمی تعداد سلول‌های زنده برای رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو به ترتیب ۰/۹ و ۰/۵۷ بود.

جدول ۱: میانگین کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده حساس به دارو پس از APDT با متیلن بلو و تولوئیدین بلو

رنگ‌ها	گروه‌ها	(CFU/ml) میانگین $\pm$ انحراف معیار	P. value
متیلن بلو	کنترل	$6/91 \pm 0/28$	۰/۰۰۱
	آزمایش	$6/01 \pm 0/27$	
تولوئیدین بلو	کنترل	$7/02 \pm 0/13$	۰/۰۰۱
	آزمایش	$6/45 \pm 0/24$	

گروه‌ها عبارت‌اند از کنترل و آزمایش که بر روی گروه آزمایش با دو رنگ متیلن بلو (۱ mg/ml) و چگالی انرژی  $81/9 \text{ J/cm}^2$  و تولوئیدین بلو (۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$ ) و چگالی انرژی  $23/4 \text{ J/cm}^2$  فتودینامیک درمانی ضد میکروبی انجام شد. مقادیر P (حاصل از T-Test) نسبت به گروه کنترل مقایسه و بیان شده‌اند.

جدول ۲، فتودینامیک درمانی ضد میکروبی با رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو را در غلظت رنگ و چگالی انرژی به کاررفته در این مطالعه بر روی باکتری‌های مقاوم به دارو نشان می‌دهد. APDT سبب کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری‌های زنده مقاوم به دارو شد. میانگین کاهش لگاریتمی تعداد سلول‌های زنده برای رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو به ترتیب ۱/۱ و ۰/۴۵ بود.

از دیسک مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین شد [۱۲] که در زیر به اختصار بیان می‌شود: برای هر جدایه سوسپانسیون با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک بر روی محیط گذاشته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک با خط کش اندازه‌گیری و ثبت شد.

در تحقیقات، مقاومت چند دارویی (MDR) مقاومتی نسبت به حداقل ۳ کلاس از عوامل ضد میکروبی محسوب می‌گردد [۱۳]. بر همین اساس جدایه‌ها به دو گروه مقاوم و حساس به دارو تقسیم شدند. هر گروه به طور مساوی دارای ۲۰ عضو بود.

پس از انجام آزمون APDT برای هر جدایه، دوباره حساسیت آنتی بیوتیکی هر جدایه تعیین شد تا اثر APDT بر تغییر الگوی حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها بررسی شود.

#### فتودینامیک درمانی ضد میکروبی

برای این آزمون، سوسپانسیون باکتریایی با غلظت  $10^8 \times 10^2$  CFU/ml با تولوئیدین بلو O (تهیه شده از شرکت سیگما، آمریکا) در غلظت نهایی  $100 \mu\text{g/ml}$  انکوبه و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. پس از انکوباسیون در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه، سوسپانسیون باکتریایی در هر چاهک تحت تابش نور لیزر قرمز با طول موج ۶۳۰ نانومتر و توان خروجی  $26 \text{ mW/cm}^2$  به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. انرژی مورد استفاده در این مطالعه  $15 \text{ J/cm}^2$  بود. منبع نوری یک لیزر دیود ۱۰ میلی‌وات (MUSTANG، ساخت کشور روسیه) بود. درب پلیت‌ها در حین تابش به منظور حفظ شرایط استریل بسته نگهداشته شد. پس از تابش، ۱۰۰ میکرولیتر از هر چاهک برداشته و در رقت‌های سریال ۱۰ تایی بر روی آگار مغذی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلونی‌های رشد کرده بر سطح محیط، شمارش شدند. تمام آزمایشات سه بار تکرار شدند. گروه‌های کنترل نور (بدون حساسگر نوری) و کنترل دارو (بدون تابش نور) نیز بررسی شدند.

تمام این مراحل برای رنگ متیلن بلو با غلظت نهایی ۱ mg/ml و با چگالی انرژی معادل  $81/9 \text{ J/cm}^2$  نور قرمز با طول موج ۶۶۰ نانومتر انجام شد. منبع نوری برای فعال‌سازی متیلن بلو، لیزر دیود با توان خروجی ۳۵ mW بود (Lasotronic، ساخت کشور سوئیس).

برای به دست آوردن چگالی انرژی دستگاه‌های لیزر از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$\text{Power Density (W/cm}^2\text{)} = \text{Power (W)} / \text{Area of irradiation (cm}^2\text{)}$$

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

در یک جمع‌بندی کلی و با توجه به نتایج به دست‌آمده (نمودار ۱) می‌توان گفت که بین جدایه‌های حساس و مقاوم به داروی مورد آزمون در پاسخ به APDT تفاوت معناداری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

در صورتی که کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده بیشتر یا مساوی ۳ باشد [۱۴]، APDT اثرکشنده خواهد داشت. با توجه به نتایج به دست‌آمده چون کاهش لگاریتمی جدایه‌های مورد مطالعه پس از APDT با هر دو رنگ بین ۰/۴۵-۱/۱ بود، بنابراین اثر APDT در این جدایه‌ها زیر حد کشنده تلقی شد.

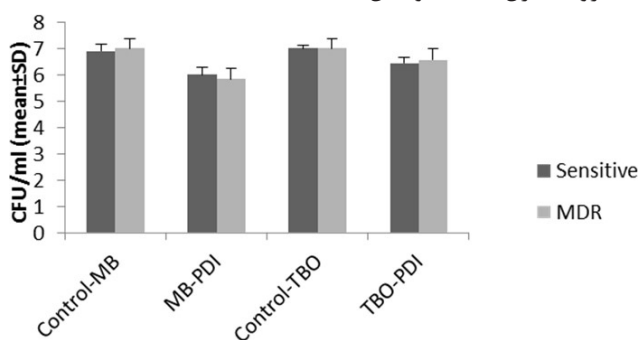
### اثر فتودینامیک‌درمانی ضد میکروبی زیر حد کشنده بر الگوی حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها

جدول ۳ و ۴ الگوی حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین GM 10 - ایمپینم IPM 10 - آمیکاسین AN 30 - سیپروفلوکساسین CP 5 - سفتازیدیم CAZ 30 - پیپراسیلین / تازوباکتام PIT 100/10، قبل و بعد از APDT با دورنگ متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد اثر APDT زیر حد کشنده بر الگوی حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها با توجه به تفاوت جدایه‌ها و نوع رنگ مختلف بود. در ۴۰ جدایه مورد مطالعه، حساسیت به سیپروفلوکساسین پس از APDT با متیلن‌بلو افزایش یافت. این نتیجه برای آمیکاسین و سفتازیدیم نیز به دست آمد (اختلاف معنی‌دار  $P < 0.05$ ). این در حالی است که مقاومت به جنتامیسین افزایش یافت. بعد از APDT با تولوئیدین‌بلو الگوی حساسیت ضد میکروبی ۴۰ سویه تغییری نکرد.

جدول ۲: میانگین کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده مقاوم به دارو پس از APDT با متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو

P. value	میانگین $\pm$ انحراف معیار (CFU/ml)	گروه‌ها	رنگ‌ها
۰/۰۰۱	۷/۰۲۲±۰/۳۶	کنترل	متیلن‌بلو
	۵/۸۵±۰/۳۹	آزمایش	
۰/۰۰۱	۷/۰۲۲±۰/۳۶	کنترل	تولوئیدین‌بلو
	۶/۵۷±۰/۴۲	آزمایش	

گروه‌ها عبارت‌اند از کنترل و آزمایش که بر روی گروه آزمایش با دو رنگ متیلن‌بلو (۱ mg/ml و دوز نوری  $81/9 J/cm^2$ ) و تولوئیدین‌بلو ( $100 \mu g/ml$  و چگالی انرژی  $23/4 J/cm^2$ ) فتودینامیک‌درمانی ضد میکروبی انجام شده است. مقادیر P (حاصل از T-Test) نسبت به گروه کنترل مقایسه و بیان شده‌اند.



نمودار ۱: مقایسه کاهش لگاریتمی تعداد باکتری‌های زنده حساس و مقاوم به دارو پس از فتودینامیک‌درمانی ضد میکروبی با متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو

جدول ۳: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها قبل و بعد از فتودینامیک‌درمانی ضد میکروبی زیر حد کشنده با رنگ متیلن‌بلو

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

جدول ۴: الگوی حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها قبل و بعد از فتودینامیک درمانی ضد میکروبی زیر حد کشنده با رنگ تولوئیدین بلو

p value	درصد جدایه‌ها بعد از APDT		درصد جدایه‌ها قبل از APDT		نمونه آنتی بیوتیک
	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	
۰/۳۱۷	۵۷/۵	۴۲/۵	۵۲/۵	۴۷/۵	جنتامیسین
۰/۱۵۷	۵۵	۴۵	۵۵	۴۵	ایمپینم
۰/۶۵۵	۵۲/۵	۴۷/۵	۵۰	۵۰	آمیکاسین
۰/۲۵۷	۴۷/۵	۵۲/۵	۵۵	۴۵	سیپروفلوکساسین
۱/۰۰۰	۵۲/۵	۴۷/۵	۵۲/۵	۴۷/۵	سفتازیدیم
۰/۱۵۷	۶۰	۴۰	۵۰	۵۰	پیپراسیلین/تازوباکتام

داده‌ها به صورت درصد می‌باشد و توسط آزمون آماری ویلکاکسون بیان شده‌اند.

## بحث

جنتامیسین ۵۲/۵ درصد، ایمپینم ۵۵ درصد، آمیکاسین ۵۰ درصد، سیپروفلوکساسین ۵۵ درصد، سفتازیدیم ۵۲/۵ درصد و پیپراسیلین/تازوباکتام ۵۰ درصد.

الگوی حساسیت ضد میکروبی هر جدایه بعد از APDT نیز تعیین شد. نتایج به دست آمده از این آزمون نشان داد که اثر زیر حد کشنده APDT بر الگوی حساسیت ضد میکروبی، وابسته به جدایه و حساسگر نوری مورد استفاده بود. به عنوان مثال حساسیت به جنتامیسین پس از APDT با متیلن بلو کاهش یافت. در حالی که حساسیت به آمیکاسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین بعد از آزمون APDT با متیلن بلو افزایش یافت. همچنین پس از APDT با تولوئیدین بلو، تغییری در الگوی حساسیت ضد میکروبی جدایه‌ها مشاهده نشد.

کاشف و همکاران (۲۰۱۳) اثر زیر حد کشنده APDT را با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو بر الگوی حساسیت ضد میکروبی ۴۰ جدایه Staphylococcus Aureus بررسی کردند. در این مطالعه افزایش مقاومت به اریترومایسین و آموکسی سیلین-کلاولانات و کاهش مقاومت به اگزاسیلین و پیپراسیلین بعد از آزمون APDT با تولوئیدین بلو دیده شد. همچنین APDT با متیلن بلو منجر به 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 کشنده APDT با حساسگر نوری روغن درخت چای را بر الگوی حساسیت ضد میکروبی S.aureus (مقاوم به متی‌سیلین) بررسی کردند. در این مطالعه نیز افزایش

فتودینامیک درمانی ضد میکروبی (APDT) روشی امیدبخش برای کشتن باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک است. در این روش حساسگر نوری در مجاورت طول موج خاصی از نور، منجر به القاء واکنش‌های فتوتوکسیک می‌شود. اما مسئله نگران کننده در ارتباط با کاربرد هر درمان ضد میکروبی غیر آنتی بیوتیکی این است که مواجهه باکتری‌ها با غلظت‌های زیر حد کشنده باعث ایجاد مقاومت‌های آنتی بیوتیکی شود.

در مطالعه حاضر، ۴۰ جدایه P.aeruginosa با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو 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 میکروبی جدایه‌ها بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد میانگین کاهش لگاریتمی باکتری‌ها با رنگ متیلن بلو در جدایه‌های مقاوم به دارو  $0.1 \pm 0.06$  و در جدایه‌های حساس به دارو  $0.89 \pm 0.04$  بود. میانگین کاهش لگاریتمی باکتری‌ها با رنگ تولوئیدین بلو در جدایه‌های مقاوم به دارو  $0.45 \pm 0.139$  و در جدایه‌های حساس به دارو  $0.57 \pm 0.24$  مشاهده شد. همچنین تفاوت چندانی در میزان کشندگی APDT در جدایه‌های مقاوم و حساس به دارو مشاهده نشد. با توجه به نتایج به دست آمده چون کاهش لگاریتمی جدایه‌های مورد مطالعه پس از APDT با هر دو رنگ، بین  $0.45 - 1.1$  (کمتر از ۳ لگاریتم) بود، اثر APDT در این جدایه‌ها زیر حد کشنده تلقی شد.

در تحقیق حاضر الگوی حساسیت ضد میکروبی با روش انتشار از دیسک انجام شد. درصد مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها به شرح زیر می‌باشد:

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه ما نشان داد که مواجهه 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 علاوه بر در نظر گرفتن تغییرات فنوتیپی ناشی از APDT زیر حد کشنده، اثر آن بر بیان ژن‌ها (از جمله 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

مقاومت به فوزیدیک‌اسید، ونکومایسین و لینزولید مشاهده شد [۸]. در مطالعه حاضر، برای تعیین الگوی حساسیت ضد میکروبی 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 آبگوش (Broth Microdilution) و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک (Minimal Inhibitory Concentration) استفاده شود. به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای که کاشف و همکاران (۲۰۱۴) بر روی ۵ جدایه *Acinetobacter Baumannii* انجام دادند، APDT با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو سبب کاهش حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامیسین شد. نکته 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 مطالعه 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 آبگوش 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* کاهش‌نداد [۱۷].

با توجه به این مطالعات، چنین به نظر 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 منجر به مقاومت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها شود. البته این امر به عوامل متفاوتی از جمله نوع حساسگر نوری، سویه باکتری و میزان مواجهه با استرس اکسیداتیو بستگی دارد.

## 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-care settings. Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. *American Journal of Infection Control* 2002; 30: 1-46.
15. Kashef N, Akbarizare M, Kamrava SK. Effect of sub-lethal photodynamic inactivation on the antibiotic susceptibility and 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.