

بررسی اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی (*Escherichia coli* (ATCC 25922) و سویه بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو با رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو

نسیم کاشف^۱گیتا روایی شریف آبادی^۲غلامرضا اسماعیلی جاوید^۳

خلاصه

مقدمه: غیرفعال سازی فتودینامیکی یکی از راهکارهای مقابله با پاتوژن های مقاوم به دارو است. در این روش از یک رنگ حساسگر نوری غیر سمی استفاده می شود که بر روی سلول های میکروبی قرار می گیرد و با طول موج خاصی از نور مرئی فعال می شود. هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی (*Escherichia coli* (ATCC 25922) و سویه بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو بود.

روش بررسی: اثر غلظت عامل حساسگر نوری ($50 \mu\text{g/ml}$ و 25 و $12/5$) و زمان تابش لیزر (10 و 20 و 30 دقیقه) بر اثر کشندگی غیرفعال سازی فتودینامیکی بررسی شد.

یافته ها: حساس سازی نوری متیلن بلو (غلظت $50 \mu\text{g/ml}$) با استفاده از نور قرمز لیزر ($163/8 \text{ J/cm}^2$) قادر به کاهش $53/1$ درصد و $37/6$ درصد در تعداد باکتری های زنده *E. coli* (ATCC 25922) و *E. coli* مقاوم به دارو (تعداد اولیه باکتری ها $10^5 - 10^4$ CFU/ml) بود. در حالی که تولوئیدین بلو در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ و دوز $46/8 \text{ J/cm}^2$ سبب کشته شدن $98/2$ درصد و $83/2$ درصد از باکتری های زنده *E. coli* (ATCC 25922) و *E. coli* مقاوم به دارو شد.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر سویه بالینی مقاوم به دارو حساسیت کمتری به اثر کشندگی غیرفعال سازی فتودینامیکی با واسطه تولوئیدین بلو در مقایسه با سویه استاندارد نشان داد. بنابراین، این امکان وجود دارد که کارایی غیرفعال سازی فتودینامیکی با تولوئیدین بلو تحت تأثیر مکانیسم های مقاومت به آنتی بیوتیک این سویه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: غیرفعال سازی فتودینامیکی، باکتری های مقاوم به دارو، متیلن بلو، تولوئیدین بلو

^۱ استادیار باکتری شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران

^۳ مربی پژوهش، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: نسیم کاشف، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۹۲۹۹۲، دورنما: ۰۲۱-۶۱۱۳۵۵۸
پست الکترونیک: Kashefn@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

میکروارگانیسم ها به خصوص باکتری ها نقش به سزایی در بیماریزایی برای انسان ها دارند. پس از گذشت حدود هفت دهه از کشف آنتی بیوتیک ها به دلیل مصرف بی رویه و نادرست این ترکیبات، سویه های میکروبی جدیدی به وجود آمده اند که با به کار بردن استراتژی هایی نظیر تولید آنزیم، تغییر سایت هدف و کاهش نفوذپذیری غشا، دیگر تحت تأثیر آنتی بیوتیک قرار نگرفته و نسبت به این مواد مقاوم گشته اند. همچنین وجود این میکروارگانیسم ها علاوه بر بالا بردن هزینه درمان، تهدید کننده حیات بیمارانی با نقص سیستم ایمنی HIV/AIDS و کسانی که پیوند دریافت کرده اند نیز می باشد. لذا، بررسی راهکارهایی که بتواند در درمان این سویه ها مؤثر واقع شود، ضروری است. یکی از این روش ها فتودینامیک تراپی می باشد که یک روش درمانی جدید در پزشکی محسوب می شود و در سال های اخیر به طور موفقیت آمیزی در درمان برخی سرطان ها و بیماری های بدخیم به کار برده می شود [۱ و ۲]. تأثیر این روش بر روی میکروارگانیسم ها در عفونت های موضعی در حال بررسی است و به

علت کاربرد آسان رنگ و نور به شکل موضعی، عفونت های سطحی از جمله زخم های عفونی قابلیت بالقوه درمان با فتودینامیک تراپی را دارا می باشند. استفاده از این روش سبب کاهش نیاز به آنتی بیوتیک های سیستمیک برای کنترل عفونت های پوستی و کاهش ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی می شود [۳].

اساس این روش استفاده از یک رنگ حساسگر نوری همراه با تابش نور است. پس از تابش، رنگ در حالت برانگیخته با برخورد به مولکول اکسیژن منجر به تولید رادیکال های واکنشگر اکسیژن نظیر یون هیدروکسیل، سوپراکسید و اکسیژن نوزاد می شود که سبب اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین های غشای سیتوپلاسمی و اسید نوکلئیک می گردد و آسیب وارده به مرگ میکروارگانیسم منتهی می شود. از آنجایی که رادیکال های آزاد کاملاً غیراختصاصی عمل می کنند و جایگاه های مختلفی را در سلول غیرفعال می سازند، تاکنون در باکتری ها مقاومتی به این روش مشاهده نشده است [۴]. از محاسن دیگر این روش می توان به کوتاه بودن زمان از بین رفتن باکتری،

باکتری‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس سوسپانسیونی از باکتری‌ها در بافر PBS مطابق با لوله نیم مک فارلند تهیه شد و با رقیق سازی، تعداد نهایی CFU/ml 10^4 - 10^5 از باکتری‌ها به دست آمد. سوسپانسیون باکتری‌ها با رنگ MB/TBO در غلظت‌های $12/5 \mu\text{g/ml}$ و ۲۵ و ۵۰ مجاور و نیم ساعت در تازیکی انکوبه گردید و سپس سه مرتبه با دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و شستشو با PBS انجام شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه در پلیت ۹۶ خانه تحت تابش لیزر قرار گرفت (تابش دهی برای هر نمونه در زمان‌های ۱۰-۲۰-۳۰ دقیقه انجام شد). برای حفظ شرایط استریل، درب پلیت در زمان تابش دهی بسته بود. پس از تهیه رقت‌های سریال ۱۰ تایی از هر چاهک ۵۰ میکرولیتر بر روی محیط نوترینت آگار برده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس تعداد کلونی‌های رشد کرده بر سطح محیط شمارش شد (تمام آزمون‌ها سه مرتبه تکرار شدند).

گروه‌های کنترل در این آزمایش عبارت‌اند از: یک گروه فاقد محلول رنگ و نور لیزر (L-P-)، یک گروه دارای محلول رنگ و بدون تابش نور لیزر (L-P+) و گروه دیگر تابش نور لیزر بدون وجود رنگ (L+P) (به جای رنگ از محلول PBS استفاده شد).

آنالیز آماری:

مقادیر به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین $\log_{10}$ بیان شدند. مقایسه بین میانگین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون One-Way ANOVA بررسی گردید. مقادیر $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

شکل‌های ۱ و ۲ اثر کشندگی غیرفعال سازی فتودینامیکی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و سویه بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو را با استفاده از رنگ متیلن بلو و شکل‌های ۳ و ۴ اثر کشندگی غیرفعال سازی فتودینامیکی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و سویه بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو را با استفاده از رنگ تولوئیدین بلو در غلظت‌های مختلف و دوزهای متفاوت نور لیزر نشان می‌دهند.

حساس سازی نوری متیلن بلو (غلظت $50 \mu\text{g/ml}$) با استفاده از نور قرمز لیزر ($163/8 \text{ J/cm}^2$) قادر به کاهش ۵۳/۱ درصد و ۳۷/۶ درصد در تعداد باکتری‌های زنده *E. coli* (ATCC 25922) و *E. coli* مقاوم به دارو (تعداد اولیه باکتری‌ها 10^4 - 10^5 CFU/ml) بود. درحالی‌که تولوئیدین بلو در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ و دوز 2 J/cm^2 ۴۶/۸ لیزر، سبب کشته شدن ۹۸/۲ درصد و ۸۳/۲ درصد از باکتری‌های زنده *E. coli* (ATCC 25922) و *E. coli* مقاوم به

تخریب فاکتورهای ویروالانس و کاهش هزینه درمان اشاره کرد [۵] و [۶].

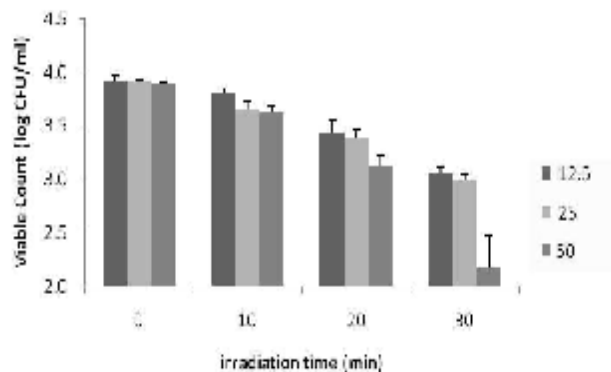
در حال حاضر، ترکیبات فوتوایزینیوم مانند تولوئیدین بلو و متیلن بلو به صورت بالینی برای درمان ضدمیکروبی استفاده می‌شوند [۷]. سمیت کم این رنگ‌ها بر روی سلول‌های انسانی به همراه توانایی بالای آن‌ها در تولید اکسیژن واکنشگر سبب شده این رنگ‌ها به عنوان رنگ‌های فعال نوری ضدمیکروبی مورد توجه قرار گیرند [۸]. بار مثبت این ترکیبات در pH فیزیولوژیک این امکان را می‌دهد که رنگ در غشای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی قرار گیرد [۹]. متیلن بلو و تولوئیدین بلو به عنوان رنگ‌های حساس به نور بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند استرپتوکوکسی، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus monocytogenes*، *Vibrio Listeria vulnificus* مؤثر هستند [۱۰-۱۳].

گزارش‌های اندکی از تأثیر این دو رنگ بر باکتری‌های مقاوم به دارو در دست است. در این مطالعه اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و سویه بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو با استفاده از دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو بررسی شد.

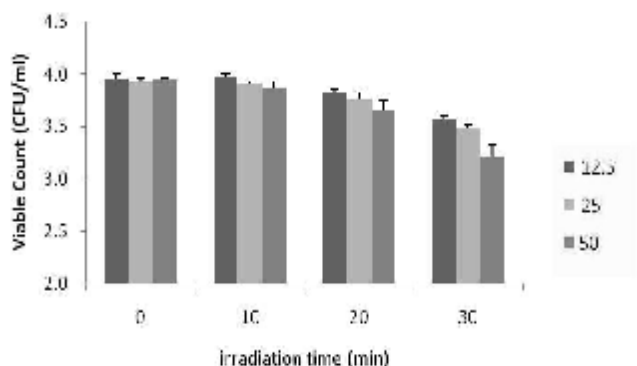
روش بررسی

سویه باکتری: سویه بالینی *E. coli* از زخم پای بیمار دیابتی جدا گردید و سویه *E. coli* (ATCC 25922) به عنوان سویه استاندارد و حساس به آنتی‌بیوتیک از شرکت پادتن طب تهیه شد. الگوی حساسیت ضدمیکروبی برای سویه بالینی با روش استاندارد انتشار دیسک مطابق با توصیه‌های CLSI تعیین شد [۱۴]. این سویه به آموکسی کلاو ($30 \mu\text{g}$)، پیپراسیلین ($100 \mu\text{g}$)، سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$)، ایمی پنم ($10 \mu\text{g}$)، جنتامایسین ($10 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$)، لووفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$)، نورفلوکساسین ($10 \mu\text{g}$)، داکسی سایکلین ($30 \mu\text{g}$) و سولفامتوکسازول ($25 \mu\text{g}$) مقاوم و به آمیکاسین ($30 \mu\text{g}$) نیمه حساس بود.

متیلن بلو (MB) و تولوئیدین بلو (TBO) از شرکت Sigma خریداری شد. محلول متیلن بلو و تولوئیدین بلو برای هر آزمایش در بافر فسفات استریل (pH= ۷/۴) به صورت تازه، آماده و با فیلتراسیون استریل و در تاریکی نگهداری می‌شد. یک لیزر دیود ۳۵ mW (Lasotronic -UK) که نوری با طول موج ۶۶۰ نانومتر ساطع می‌کند، برای تابش نمونه‌های حاوی MB استفاده شد. برای تابش نمونه‌های حاوی TBO از یک لیزر دیود ۱۰ mW (MUSTANG - Russia) که نوری با طول موج ۶۳۰ نانومتر ساطع می‌کند، استفاده شد. فاصله دستگاه لیزر و سطح پلیت به گونه‌ای تنظیم شد که میزان تابش 91 mW cm^{-2} باشد.



شکل ۳: غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با واسطهٔ تولوئیدین بلو در *Escherichia coli* (ATCC 25922) در غلظت‌های مختلف رنگ (۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ µg/ml) و زمان‌های ۱۰-۲۰-۳۰ دقیقه تابش لیزر



شکل ۴: غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با واسطهٔ تولوئیدین بلو در سویهٔ بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو در غلظت‌های مختلف رنگ (۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ µg/ml) و زمان‌های ۱۰-۲۰-۳۰ دقیقه تابش لیزر

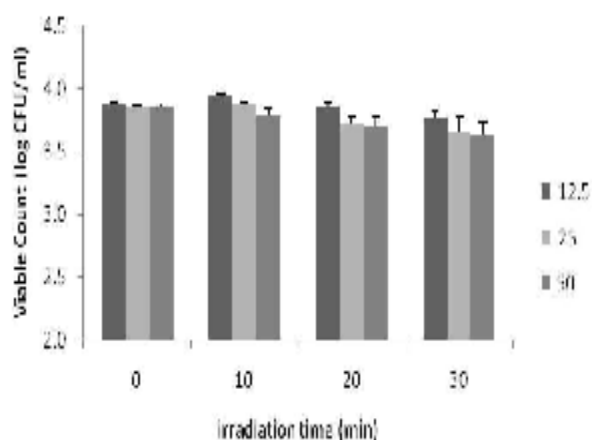
بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر کشندگی غیرفعال‌سازی فتودینامیکی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و سویهٔ بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو با استفاده از دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو به عنوان عامل حساسگر نوری و پرتودهی با نور قرمز بررسی شد. مطالعهٔ ما نشان داد که غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با رنگ تولوئیدین بلو به شکل کارآمد باعث کشته شدن *E. coli* مقاوم به دارو و *E. coli* حساس به آنتی بیوتیک می‌شود.

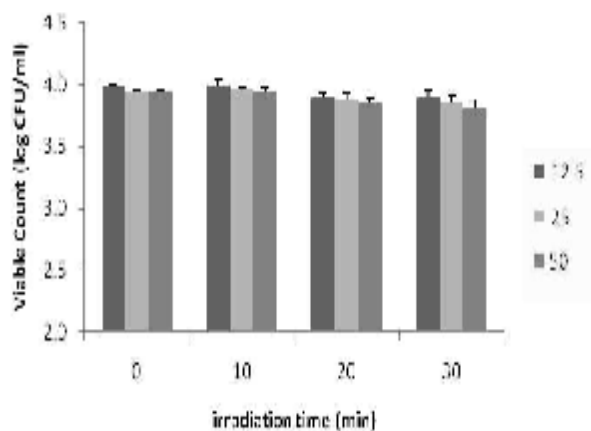
تنگ و همکاران نشان دادند که تولوئیدین بلو به‌طور یکسان *E. coli* تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز وسیع الطیف و *Escherichia coli* (ATCC 25922) را از بین می‌برد [۱۵] درحالی‌که در مطالعهٔ حاضر سویهٔ بالینی مقاوم به دارو حساسیت کمتری به اثر کشندگی غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با واسطهٔ تولوئیدین بلو در مقایسه با سویهٔ

دارو شد. به‌طور کلی، اثر کشندگی غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با واسطهٔ تولوئیدین بلو در غلظت و دوز مشابه بر سویهٔ استاندارد در مقایسه با سویهٔ مقاوم به دارو بیشتر بود.

وقتی غلظت $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ از متیلن بلو با دوزهای متفاوت نور لیزر (54.6 J/cm^2 ، 109.2 و 163.8) استفاده شد، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد باکتری‌های سوسپانسیون اولیه در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). این مطلب در مورد غلظت $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ از تولوئیدین بلو با زمان تابش ۱۰ دقیقه نیز مشاهده شد. غلظت‌های مختلف متیلن بلو و تولوئیدین بلو در تاریکی به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل هیچ اثر سمی روی ارگانیسم‌های مورد بررسی نداشتند. همچنین دوزهای متفاوت نور لیزر به تنهایی قادر به اثر باکتری کشی نبودند.



شکل ۱: غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با واسطهٔ متیلن بلو در *Escherichia coli* (ATCC 25922) در غلظت‌های مختلف رنگ (۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ µg/ml) و زمان‌های ۱۰-۲۰-۳۰ دقیقه تابش لیزر



شکل ۲: غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با واسطهٔ متیلن بلو در سویهٔ بالینی *Escherichia coli* در غلظت‌های مختلف رنگ (۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ µg/ml) و زمان‌های ۱۰-۲۰-۳۰ دقیقه تابش لیزر

متیلن بلو و تولوئیدین بلو (به شکل موضعی یا تزریق درون رگی) در تشخیص جراحی کاربرد فراوان دارند و به طور معمول به شکل محلول ۱ درصد استفاده می‌شوند [۱۹ و ۱۸] که به ترتیب معادل با غلظت ۲۷ mM و ۳۳ است [۲۰]. این غلظت‌ها ۲۰۰ برابر بیشتر از غلظت گزارش شده در این مطالعه است که احتمال ایمنی در درمان را نشان می‌دهد.

مطالعه ما نشان داد که سویه بالینی مقاوم به دارو حساسیت کمتری به اثر کشندگی غیرفعال سازی فتودینامیکی با واسطه تولوئیدین بلو در مقایسه با سویه استاندارد دارد. بنابراین غیرفعال سازی فتودینامیکی با واسطه تولوئیدین بلو در سویه‌های دیگر مقاوم به دارو نیازمند مطالعات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت‌های دانشگاه تهران و مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران.

استاندارد نشان داد. حساسیت کم سویه بالینی *Escherichia coli* مقاوم به دارو به غیرفعال سازی فتودینامیکی با واسطه تولوئیدین بلو در مقایسه با *Escherichia coli* (ATCC 25922) می‌تواند ناشی از مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک این سویه باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تولوئیدین بلو که دارای ساختاری کاتیونی و آمفی‌پاتیک است می‌تواند به عنوان سوپسترای برای پمپ‌های دفع داروی RND در *E. coli* باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که عملکرد این پمپ‌ها می‌تواند موجب کاهش غلظت رنگ در داخل سلول شود و موجب کاهش کارایی فتودینامیک تراپی شود [۱۶].

متیلن بلو به عنوان یک عامل حساسگر نوری مؤثر در کاهش تعداد باکتری‌های *E. coli* مورد بررسی در این مطالعه نبود. مقایسه تأثیر غیرفعال سازی فتودینامیکی با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو بر روی باکتری‌ها نشان داد که تولوئیدین بلو نسبت به متیلن بلو رنگ بسیار قوی‌تری است. لیپوفیل بودن متیلن بلو و تولوئیدین بلو به ترتیب ۰/۱- و ۰/۳۱- است [۱۷]، بنابراین این احتمال وجود دارد که غلظت تولوئیدین بلو به طور قابل توجهی در باکتری بیشتر از متیلن بلو باشد و بعد از تابش نور باعث کشته شدن بیشتر میکروارگانیسم‌ها شود.

References

1. Nakonechny F, Firer M, Nitzan Y, Nisnevitch M. Intracellular antimicrobial photodynamic therapy: a novel technique for efficient eradication of pathogenic bacteria. *J Photochem Photobiol* 2010; 86: 1350-5.
2. Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2000; 1: 212-9.
3. Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S. Pre-clinical invitro and invivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5(1): 31-8.
4. Peloi LS, Soares RR, Biondo CE, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci* 2008; 33(2): 231-7.
5. Miroslava S, Petra O, Daniela H, Gabriel C. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by methylene blue in incorporated in ZSM-5 zeolite channels under red LED light. *Acta Chimica Slovaca* 2010; 3: 41- 50.
6. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000; 72: 676-80.
7. Wainwright M. The use of dyes in modern biomedicine. *Biotech Histochem* 2003; 78: 147-55.
8. Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2: 263-72.
9. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 468-81.
10. Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 39: 17-22.
11. O'Neill J, Wilson M, Wainwright M. Comparative antistreptococcal activity of photobactericidal agents. *J Chemother* 2003; 15: 329-34.
12. Romanova NA, Brovko LY, Moore L, Pometun E, Savitsky AP, Ugarova NN, Griffiths MW. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria*

- monocytogenes by using ATP bioluminescence. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 6393–8.
13. Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 895–902.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, ninth edition. CLSI document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
15. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 196-203.
16. Tang HM, Hamblin MR, Yow CMN. A comparative invitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother* 2007; 13: 87–91.
17. Phoenix DA, Harris F. Phenothiazinium-based photosensitizers: Antibacterials of the future. *Trends Mol Med* 2003; 9: 283–5.
18. Creagh TA, Gleeson M, Travis D, Grainger R, McDermott TE, Butler MR. Is there a role for invivo methylene blue staining in the prediction of bladder tumor recurrence? *Br J Urol* 1995; 75: 477-9.
19. Mashberg A. Final evaluation of tolonium chloride rinse for screening of high-risk patients with asymptomatic squamous carcinoma. *J Am Dent Assoc* 1983; 106: 319-23.
20. Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DRA, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 160: 177-81.