مقاله پژوهشی

مهار پمپ افلاکس در سویه‌های کلینیکی سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از سرترالین برای شکست مقاومت باکتری به سیپروفلوکساسین

احمد صاحب‌الزمانی[۱]، مریم صدرنیا[۱،۲]، *مجید اکبری[۱،۳]، ساسان ساکی[۴]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴. گروه علوم آزمایشگاهی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Sahabzamani A, Sadrnia M, Akbari M, Saki S. [Efflux Inhibition in Clinical Isolates of Pseudomonas Aeruginosa Using Sertraline for Ciprofloxacin Resistance Breakdown (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences(JAMS). 2022; 25(3):382-393. https://doi.org/10.32598/JAMS.25.3.262.1

https://doi.org/10.32598/JAMS.25.3.262.1

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۹ اردیبهشت ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۱ خرداد ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف پمپ افلاکس در سودوموناس آئروجینوزا باعث مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون‌ها با اخراج آن از سلول سودوموناس می‌شود؛ بنابراین مهار این پمپ با کمک ترکیبات شیمیایی غیرفعال‌کننده فعالیت پمپ می‌تواند باعث مقابله با مقاومت دارویی باکتری شود. هدف از این پژوهش، ارزیابی استفاده از سرترالین به عنوان مهارکننده پمپ افلاکس در سودوموناس آئروجینوزا برای کاهش مقاومت دارویی است.

مواد و روش‌ها سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای ارزیابی‌شده در این پژوهش از نمونه‌های بالینی بیماران جداسازی و پس از شناسایی آن‌ها با روش‌های میکروب‌شناسی، مقاومت آن‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین با روش کربی بائر ارزیابی شد. حداقل غلظت ممانعت‌کننده سیپروفلوکساسین با روش سریال رقتی محیط مایع در میکروپلیت و حداقل غلظت کشنده دارو با کشت و نیز روش MTT برای سویه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروجینوزا و سوش استاندارد سودوموناس آئروجینوزای ۲۵۸۷۳ تعیین شد. بررسی شکست مقاومت با اضافه کردن سرترالین به محیط مولر هینتون آگار و تعیین قطر هاله سیپروفلوکساسین انجام شد. حضور پمپ افلاکس به روش فنوتیپی با استفاده از ماده دارویی سرترالین و روش سریال رقتی محیط مایع در میکروپلیت، روی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ارزیابی شد. وجود ژن مولد این پمپ به روش ژنوتایپی در سویه‌های مقاوم با انجام PCR تعیین شد. از سویه استاندارد PAO1 سودوموناس آئروجینوزا به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1401.011 به تصویب کمیته اخلاق دانشکده علوم‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد رسید.

یافته‌ها بر اساس نتایج کربی بائر، ۳ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین در نظر گرفته شد. حداقل غلظت ممانعت‌کننده سویه‌های مقاوم به دارو بین ۳۲ تا ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده دارو بین ۱۶ تا ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. با انجام الکتروفورز روی محصولات PCR مشخص شد سویه‌های مورد آزمایش، حاوی ژن mexA کدکننده پمپ افلاکس هستند. در محیط آگاردار بدون سرترالین، قطر هاله اطراف دیسک سیپروفلوکساسین صفر بود، اما پس از افزودن سرترالین، قطر هاله به ۲۵ میلی‌متر افزایش یافت. همچنین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد سیپروفلوکساسین در سویه‌ها قبل از اضافه کردن ۲ درصد سرترالین، ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که پس از اضافه کردن سرترالین به ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تبدیل شد.

نتیجه‌گیری سرترالین باعث کاهش حداقل غلظت ممانعت‌کننده دارو از طریق کاهش کارایی پمپ افلاکس در باکتری سودوموناس آئروجینوزا می‌شود و مقاومت باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین کاهش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها:
سودوموناس آئروجینوزا، سیپروفلوکساسین، پمپ افلاکس، سرترالین

* **نویسنده مسئول:**
دکتر مجید اکبری
نشانی: اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، گروه زیست‌شناسی./اراک، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی.
رایانامه: majakbari@yahoo.com

مقدمه

گسترش بیماری‌های عفونی و نیز افزایش مقاومت دارویی یکی از تهدیدهای جدی در درمان موفقیت‌آمیز بیماری‌های عفونی است. سویه‌های مقاوم پسودوموناس آئروجینوزا نقش برجسته‌ای در ایجاد عفونت‌های گوناگون و از جمله عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان دارند [۱]. معمولاً سودوموناس به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است که دلیل آن می‌تواند نفوذپذیری پایین غشای خارجی، وجود پمپ‌های افلاکس و تولید آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند بتا لاکتامازها باشد که درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را با دشواری زیادی روبه‌رو می‌کند [۲].

پمپ افلاکس باعث بیرون راندن آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول باکتری می‌شود. لِوی پمپ‌های افلاکس را در سال ۱۹۷۸ در E. coli شناسایی کرد. ۵ خانواده از سیستم‌های پمپ افلاکس باکتری‌ها شناسایی شده‌اند. بخشی از مقاومت دارویی مشاهده‌شده در باکتری‌ها در برابر داروهای مختلف مربوط به وجود همین پمپ‌هاست [۳، ۴]. یکی از راه‌های کاهش مقاومت باکتری، استفاده از مهارکننده‌های پمپ‌های افلاکس در باکتری‌ها است [۴]. مهارکننده‌های پمپ افلاکس عواملی هستند که با مهار کردن پمپ‌های افلاکس و اختلال در کارایی آن‌ها، باعث افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک درون باکتری شده و موجب عملکرد طبیعی آنتی‌بیوتیک و مرگ باکتری می‌شوند [۳، ۵].

مطالعات سال‌های اخیر نشان داد ترکیباتی که به داروهای غیرآنتی‌بیوتیک معروف شده‌اند و برای کنترل شرایط پاتولوژیک غیرعفونی مانند التهاب، افسردگی و بیماری‌های قلبی‌عروقی استفاده می‌شوند [۵]، فعالیت‌های ضدمیکروبی دارند. از جمله این گروه‌های دارویی می‌توان به داروهای ضدافسردگی [۶، ۷] ضدروان‌پریشی [۸، ۹] ضدفشار خون [۹، ۱۰]، آنتی هیستامین‌ها [۱۱]، ضداسپاسم [۱۲]، ضدالتهاب [۱۳] و داروهای قلبی‌عروقی [۱۴] اشاره کرد.

در برخی از این پژوهش‌ها گزارش شد برای مثال، کلرپرومازین جریان اتیدیوم بروماید علیه همه گونه‌های سالمونلا انتریکا، مایکوباکتریوم آویوم و مایکوباکتریوم اسمگماتیس را کاهش داده است [۱۴، ۱۵] یا گزارش شد وراپامیل، یک مسدودکننده کانال کلسیم، چندین پمپ خروجی باکتری از جمله p-glycoprotein را مهار می‌کند [۱۶، ۱۷] یا در پژوهشی دیگر کاتز و همکاران، فعالیت ضدباکتریایی پاروکستین، فموکستین و مشتقات آن‌ها را علیه S. aureus، E. coli بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این ترکیبات فعالیت پمپ‌های خروجی NorA، non-NorA و RND را مهار می‌کنند [۱۸].

به طور مشابه، هندریکس و همکاران، خواص ضدمیکروبی ۲ ضدافسردگی ۳ حلقه‌ای ایمی‌پرامین، آمی‌تریپتیلین و فنوتیازین‌ها علیه کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا را بررسی کردند [۱۹]. بر اساس این شواهد، برخی از داروهای ضدافسردگی، ازجمله سرترالین[1]، سیتالوپرام[2] و ونلافاکسین[3] نیز ویژگی‌های بالقوه ضدمیکروبی خود را به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها و تأثیر ترکیبات ضدافسردگی/آنتی‌بیوتیک بر مقاومت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها آشکار کرده‌اند. هدف از این پژوهش، استفاده از این ترکیب در مهار پمپ افلاکس مقاومت دارویی سیپروفلوکساسین در سودوموناس آئروجینوزاست.

مواد و روش‌ها

داروها و مواد شیمیایی

داروها و مواد شیمیایی شامل سرترالین (داروسازی اکسیر ۱۰۰ میلی‌گرمی)، سیپروفلوکساسین (شرکت Fluka)، دیسک آنتی‌بیوتیک ۵ واحدی سیپروفلوکساسین (پادتن تب No # 201127) و دی‌متیل سولفوکساید (حلال سرترالین CAS number: 67-68-5) بود.

سویه‌های باکتری

در این مطالعه مقطعی، سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای استفاده‌شده در این تحقیق از نمونه‌های بالینی در مراکز درمانی شهر اراک جدا شده بودند که با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و تشخیص‌های افتراقی معمول شناسایی شدند [۱، ۲۰].

محیط‌های کشت

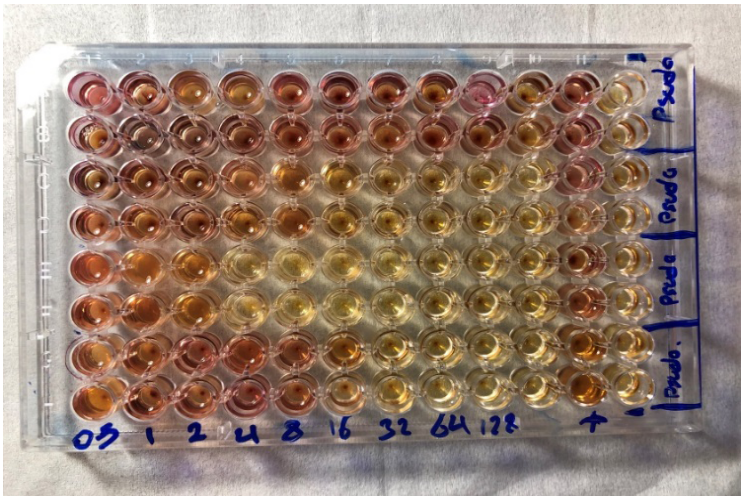
محیط‌های کشت شامل B.H.I براث (شرکت Quelab و No #759980)، بلاد آگار (شرکت Canda Lab و No#30505)، مولر هینتون براث (شرکت QUElab و No#46339) و مولر هینتون آگار (شرکت Candalab و No#209219) بود.

آزمایش انتشار از دیسک

آزمایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، طبق دستورالعمل استاندارد CLSI 2020، M100، 30th ed از روش انتشار از دیسک، کربی بائر و با دیسک‌های ۵ واحدی سیپروفلوکساسین (پادتن طب) انجام شد و جدایه‌هایی که هاله کمتر از 18mm داشتند، سوش‌های مقاوم در نظر گرفته شدند [۲۱].

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده به روش میکروبراث سریال

1. Sertraline (SR)
2. Citalopram (CIT)
3. Venlafaxine (VF)



تصویر ۱. تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده به روش میکرو براث سریال دایلوشن

دایلوشن در محیط مایع و تعیین حداقل غلظت کشنده دارو

بر اساس استاندارد CLSI 2018، M07، 11 th ed برای سویه‌ها، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد، سیپروفلوکساسین به روش میکرو براث سریال دایلوشن در محیط مایع CAMHB تعیین شد.

برای این کار، ابتدا ۱۰ برابر غلظت مورد نیاز سیپروفلوکساسین طبق دستورالعمل برای حداقل غلظت ممانعت‌کننده آماده شد [۲۲]. سریال دایلوشن از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت میکرودایلوشن تا ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام و چاهک‌های شماره ۱۱ (کنترل مثبت) و ۱۲ (کنترل منفی) در نظر گرفته شد (تصویر شماره ۱). همچنین با استفاده از رنگ حیاتی MTT، حداقل غلظت کشنده باکتری نیز مشخص شد [۲۳].

ارزیابی هم‌افزایی سرترالین و سیپروفلوکساسین در in vitro:

آماده‌سازی محلول استوک سرترالین

برای این کار، ۱۰ برابر مقدار مؤثر از سرترالین (۲۵۰ میلی‌گرم) در ۱۰ میکروگرم محلول دی‌متیل سولفوکساید (حلال) تهیه و برای آنتی‌بیوگرام رقیق شد.

روش ارزیابی دیسک دیفیوژن

تأثیر سرترالین روی افزایش قطر هاله در روش کربی بائر بررسی شد. ابتدا ۲ گرم سرترالین به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون آگار استریل‌شده، در دمای ۴۰ درجه (قبل از بسته شدن محیط) اضافه شده و محیط کاملاً یکنواخت و هموژن شد. مولر هینتون آگار در پلیت‌های ۶ سانتی‌متری تقسیم شده و سپس جدایه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروجینوزا روی آن کشت داده شدند.

روش ارزیابی به روش میکرو براث سریال دایلوشن در محیط مایع

در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط استریل مولر هینتون براث ۲ گرم درصد سرترالین حل‌شده اضافه شد. برای اثبات تأثیر سرترالین بر پمپ افلاکس سیپروفلوکساسین به روش فنوتیپی حداقل غلظت ممانعت‌کننده سیپروفلوکساسین قبل از اضافه کردن سرترالین و بعد از اضافه کردن آن سنجیده شد.

ارزیابی مولکولی

استخراج دی‌ان‌ای

برای استخراج دی‌ان‌ای جدایه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین سودوموناس آئروجینوزا از روش پیشنهادی Trkov and Avgus-tin، 2003 استفاده شد که به طور خلاصه، باکتری‌ها در محیط BHI براث (Bath. N:...، Exp. D 2025، QUElab) کشت داده شده و برای حداقل ۱۲ ساعت انکوبه شدند. ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت در دور ۱۳۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رونشین به آهستگی برداشته و دور ریخته شد. سپس ته‌نشین در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر در سطح ملکولی (Molecular Grade Water) حل شد، ویال مربوطه در آب در حال جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ و بعد از آن ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. رسوب ایجادشده در ویال در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به آهستگی حل و جهت انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۴]. غلظت محصول به‌دست‌آمده با دستگاه نانو دراپ تعیین شد.

آزمایش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۶ میکرولیتر از دی‌ان‌ای الگو، ۸ میکرولیتر مستر میکس (پیشگام.ایران)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت است، حجم مخلوط واکنش با استفاده از ۹ میکرولیتر آب دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شده بود.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمر مربوطه

MexR Forward MexR Reverse	GTTCGTTGCATAGCGTTGTCCTCA TTGATAACCGGC-CATCGAGCTAAA	MexR	bp 170	Saito, K., H. Yoneyama, and T. Nakae

PCR در ترموسایکلر حرارتی تحت شرایط زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای آنیلینگ (Annealing= در دمای ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت ۳۰ سیکل) ..۵۵.. درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و گسترش (Elongation= در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه انجام شد. سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزای ATCC به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۵]. پرایمرهای طراحی‌شده در پژوهش در جدول شماره ۱ مشخص شده است. محصولات PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز به همراه نمونه کنترل و کنترل منفی الکتروفورز شده و در دستگاه ژل داک مشاهده شدند.

نتایج

نتایج دیسک دیفیوژن

به روش کربی بائر، همه سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای مطالعه‌شده مورد ارزیابی حساسیت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین قرار گرفتند. در جدول شماره ۳، صرفاً سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین ارائه شده‌اند. از سویه استاندارد ATCC27853 برای مقایسه استفاده شد. نتایج در جدول شماره ۲ مشخص شده است.

نتایج تأثیر سرترالین در روش دیسک دیفیوژن

در این روش، قبل از افزودن سرترالین، قطر هاله وجود نداشت (تصویر شماره ۲)، اما پس از افزودن سرترالین، قطر هاله به ۲۵ میلی‌متر افزایش یافت.

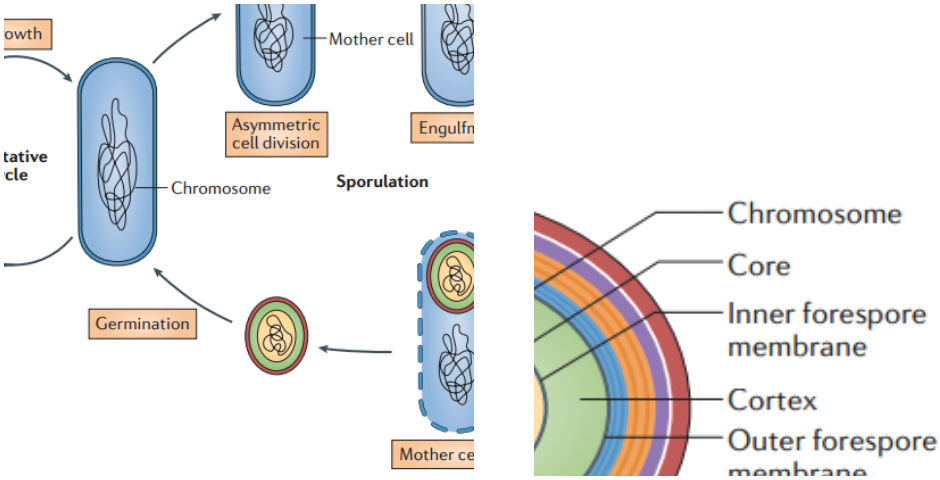
بر اساس استاندارد CLSI. M100 قطر هاله سیپروفلوکساسین به میزان ۲۵ میلی‌متر نشانگر حساسیت کامل باکتری نسبت به

جدول ۲. نتایج دیسک دیفیوژن، حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده داروی جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا

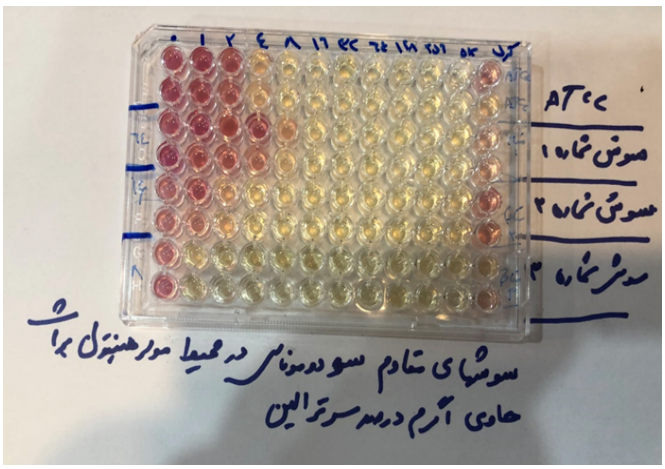
MBC در مولر هینتون آگار	حداقل غلظت ممانعت‌کننده درمولر هینتون براث	دیسک دیفیوژن در مولر هینتون آگار	سوش‌های سودوموناس
۶۴	۳۲	۱۰	سوش شماره ۱
۳۲	۱۶	۸	سوش شماره ۲
۸	۴	۱۴	سوش شماره ۳
۱	۰/۵	۲۴	ATCC27853

جدول ۳. نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده داروی جدایه‌های قبل و بعد از تأثیر سرترالین ($\mu g/mL^{-1}$ µM)

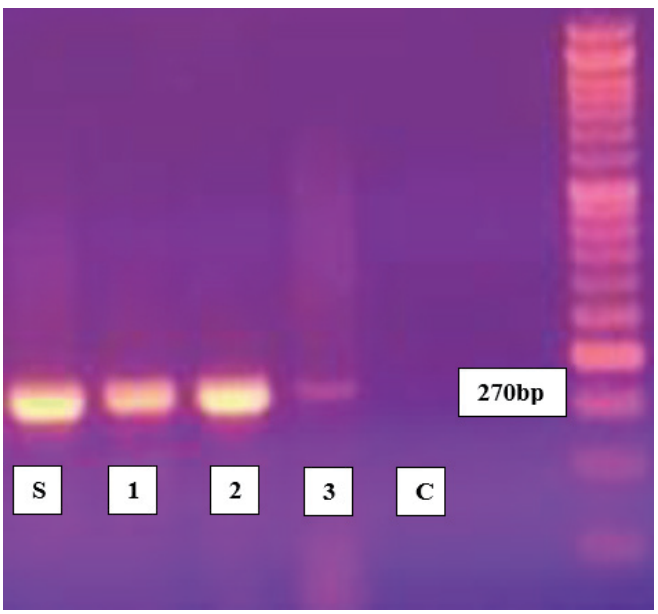
حداقل غلظت کشنده بعد از اضافه کردن سرترالین	حداقل غلظت کشنده قبل از اضافه کردن سرترالین	حداقل غلظت ممانعت‌کننده بعد از اضافه کردن سرترالین	حداقل غلظت ممانعت‌کننده قبل از اضافه کردن سرترالین	سوش‌های سودوموناس
۱	۳۲	۲	۶۴	سوش شماره ۱
۲	۱۶	۴	۳۲	سوش شماره ۲
۱	۴	۲	۸	سوش شماره ۳



تصویر ۲. نتایج تأثیر سرترالین در روش دیسک دیفیوژن قبل و بعد از افزودن سرترالین



تصویر ۳. نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده بعد از تأثیر MTT



تصویر ۴. نتایج بررسی PCR پمپ افلاکس در سویه‌ها، S: کنترل مثبت (سویه استاندارد PAO1 سودوموناس آئروجینوزا)، ۱-۳ : سویه‌های مقاوم به دارو، C: کنترل منفی

دارو است [۲۱]، یعنی اینکه با افزودن سرترالین، باکتری کاملاً مقاوم به دارو، به حساس تبدیل شد.

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده سویه‌های مقاوم

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده و حداقل غلظت کشنده سیپروفلوکساسین برای سویه‌های مقاوم به داروی سودوموناس آئروجینوزا و سوش استاندارد سودوموناس آئروجینوزای ۲۵۸۷۳ در جدول شماره ۲ قابل مشاهده است.

نتایج استفاده از MTT نیز منطبق با نتایج کشت درباره حداقل غلظت کشنده تعیین بود (تصویر شماره ۳ و جدول شماره ۳).

برای سودوموناس‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین قبل و بعد از رشد روی محیط واجد سرترالین حداقل غلظت ممانعت‌کننده انجام شد و نتایج طبق جدول شماره ۳ است.

نتایج PCR

تعیین غلظت ژنوم تخلیص‌شده نشان داد نسبت دی‌ان‌ای به پروتئین و مواد آلی جداشده بیشتر از ۱/۸ بوده و برای سنجش بسیار مناسب است (نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ بر اساس نانوگرم بر میکرولیتر). نتایج بررسی وجود ژن پمپ افلاکس نشان داد سوش‌های مقاوم همه پمپ افلاکس داشتند. سویه استاندارد PAO1 سودوموناس آئروجینوزا که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده بود نیز باند ۲۷۰ را ارائه کرد (تصویر شماره ۴).

بحث

در این تحقیق، اثر سرترالین در شکست مقاومت سودوموناس به سیپروفلوکساسین اثبات شد. استفاده از روش درمان ترکیبی با عوامل ضدمیکروبی به دلیل ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR) رایج شده است [۲۶، ۲۷]. یکی از راهبردها، تولید داروها به صورت ترکیبی است، زیرا هم‌افزایی می‌تواند از ظهور مقاومت اکتسابی جلوگیری کرده، اثربخشی را افزایش، سمیت را کاهش و طیف وسیع‌تری از فعالیت‌ها را نسبت به رژیم‌های تک‌درمانی ارائه دهد.

مطالعات قبلی نشان داد درمان ترکیبی ضدمیکروبی در برابر بیماری‌های صعب‌العلاج مانند سل و عفونت HIV مؤثر است، زیرا این میکروب‌ها به دلیل مقاومت یا عدم کارایی به تک‌درمانی پاسخ نمی‌دهند [۲۸]؛ بنابراین شناسایی چنین ترکیباتی ممکن است مفید باشد و هزینه و مدت درمان دارویی ضدمیکروبی را کاهش دهد. انگیزه انتخاب این مواد برای مطالعات هم‌افزایی، استفاده طولانی‌مدت و مطالعات قبلی روی داروهای ضدافسردگی و داروهای ضدروان‌پریشی بود [۱۸، ۱۹].

یافته‌های ما نشان داد برخی از سویه‌های باکتریایی که قبلاً به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند با افزودن سرترالین حساس شدند. در مطالعه ترکیبی حاضر، هم‌افزایی بین سیپروفلوکساسین (آنتی‌بیوتیک) و سرترالین (غیرآنتی‌بیوتیک) مشاهده شد. قطر مناطق بازدارنده با افزودن غلظت سرترالین افزایش یافت.

در تحقیق حاضر، افزودن سرترالین در غلظت استفاده‌شده ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر همراه با آنتی‌بیوتیک، رشد باکتری‌ها را کاملاً متوقف کرد، اما به عنوان یکی از محدودیت‌های تحقیق، تعیین کمیت هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک سرترالین در این غلظت امکان‌پذیر نشد.

سازوکار دقیق فعالیت ضدباکتریایی سرترالین هنوز مشخص نیست و نیاز به مطالعات مولکولی دارد. اثبات شده که سرترالین یک مهارکننده انتخابی بازجذب سروتونین و یک مهارکننده پمپ بازجذب در انسان است [۲۸، ۲۹]؛ بنابراین می‌تواند به عنوان مهارکننده پمپ خروجی در باکتری‌ها عمل کند. با این حال، برای تأیید اینکه فعالیت ضدباکتریایی سرترالین به دلیل مهار پمپ جریان است، استفاده از باکتری با پمپ‌های جریان مولکولی مشخص شده و مطالعات با مهارکننده‌های پمپ‌های جریان شناخته‌شده مانند اتیدیوم بروماید مورد نیاز است [۲۸].

از زمانی که نقش پمپ‌های افلاکس به عنوان سازوکار مقاومت در برابر چندین ضدمیکروبی شناخته شد، منابع قابل‌توجهی به تولید موادی اختصاص داده شده است که می‌توانند این سیستم را مهار کنند.

علیرغم چندین مطالعه آزمایشگاهی، این داروها عمدتاً به دلایل بی‌ثباتی و سمیت سرم، هرگز از نظر بالینی آزمایش نشده‌اند [۳۰]. در Phe-Arg-ß-naphthylamide، P. aeruginosa باعث افزایش فعالیت کینولون‌ها، کاهش دفع آن‌ها از سلول باکتری و کاهش حداقل غلظت بازدارنده آن‌ها می‌شود [۳۱].

میچل و همکاران، چندین پپتید سنتز کردند که ناحیه TM4 SMR- سودوموناس را هدف قرار دادند. دامنه TM4 برای مونتاژ هومودایمر و به عنوان یک پمپ کاربردی مهم است. آن‌ها نشان دادند که پپتیدهای سنتزشده نه تنها می‌توانند جریان را کاهش دهند، بلکه می‌توانند فعالیت زیست‌کشی سایر ترکیبات را نیز بهبود بخشند [۳۲].

علاوه بر مواد سنتزی، ده‌ها محصول طبیعی و گیاهی برای استفاده به عنوان مهارکننده پمپ جریان آزمایش شده‌اند. در حالی که برخی فعالیت مهاری نشان داده‌اند، مطالعات بالینی هنوز انجام نشده است [۳۳]. از زمانی که نقش پمپ‌های افلاکس به عنوان سازوکار مقاومت در برابر چندین ضدمیکروبی شناخته شد، منابع قابل‌توجهی به تولید موادی اختصاص داده شده است که می‌توانند این سیستم را مهار کنند [۳۴، ۳۵]

در Phe-Arg-ß-naphthylamide، P. aeruginosa باعث

افزایش فعالیت کینولون‌ها، کاهش دفع آن‌ها از سلول باکتری و کاهش حداقل غلظت بازدارنده آن‌ها می‌شود [۳۶]. با وجود چندین کاندیدای بالقوه به عنوان مهارکننده‌های پمپ افلاکس در P. aeruginosa، دستیابی به یک داروی مؤثر هنوز موضوع مطالعات متعددی است. شناخت این متغیرها و چگونگی ارتباط ترکیبات با این سازوکارهای نفوذ مختلف اهمیت ویژه‌ای در مبارزه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی P. aeruginosa دارد [۳۷].

اثبات شده است که این مهارکننده‌های پمپ افلاکس نیز می‌توانند بر تولید بیوفیلم تأثیر بگذارند، چراکه رابطه نزدیکی بین ترشح مولکوهایی که تولید بیوفیلم را تحریک می‌کنند و کوئوروم سنسینگ وجود دارد [۳۸].

نتیجه‌گیری

در این تحقیق شکست مقاومت سودوموناس آئروجینوزا به سیپروفلوکساسین با مهار پمپ افلاکس در سویه‌های کلینیکی با استفاده از سرترالین به روش فنوتیپی و ژنوتیپی اثبات شد. سرترالین حداقل غلظت مهارکننده سیپروفلوکساسین را از طریق غیرفعال کردن پمپ افلاکس در باکتری سودوموناس آئروجینوزا کاهش و مقاومت باکتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین تغییر داد. با توجه به اثر بسیار مناسب سرترالین پیشنهاد می‌شود مطالعات فراتر روی موش آزمایشگاهی انجام شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1401.011 به تصویب کمیته اخلاق دانشکده علوم‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد رسید.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول در گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در پژوهش و آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی مرکز تحقیقات عفونی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Reynolds D, Kollef M. The epidemiology and pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections: An update. Drugs. 2021; 81(18):2117-31. [DOI:10.1007/s40265-021-01635-6] [PMID] [PMCID]

[2] Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa: new approaches to an old problem. J Med Microbiol. 2019; 68(1):1-10. [DOI:10.1099/jmm.0.000873] [PMID]

[3] Ma D, Cook DN, Hearst JE, Nikaido H. Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. Trends Microbiol. 1994; 2(12):489-93. [DOI:10.1016/0966-842X(94)90654-8] [PMID]

[4] Nasim F, Qureshi IA. Role of structural biology methods in drug discovery. In: Tripathi T, Dubey VK, editors. Advances in protein molecular and structural biology methods. United States: Elsevier; 2022. [DOI:10.1016/B978-0-323-90264-9.00022-2]

[5] Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie. 2005; 87(12):1137-47. [DOI:10.1016/j.biochi.2005.04.012] [PMID]

[6] Munoz-Bellido JL, Munoz-Criado S, Garcıa-Rodrıguez JA. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: Selective serotonin reuptake inhibitors. Int J Antimicrob Agents. 2000; 14(3):177-80. [DOI:10.1016/S0924-8579(99)00154-5] [PMID]

[7] Martinez-Martinez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodríguez-Martínez J, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6(5):685-711. [DOI:10.1586/14787210.6.5.685] [PMID]

[8] Dastidar SG, Jairaj J, Mookerjee M, Chakrabarty AN. Studies on antimicrobial effect of the antihistaminic phenothiazine trimeprazine tartrate. Acta Microbiol Immunol Hung. 1997; 44(3):241-7. [PMID]

[9] Dutta NK, Mazumdar K, DasGupta A, Dastidar SG. In vitro and in vivo efficacies of amlodipine against Listeria monocytogenes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28(7):849-53. [DOI:10.1007/s10096-009-0703-y] [PMID]

[10] Kristiansen JE, Mortensen ID, Gaarslev K. The antibiotic effect of the anti-depressive drug femoxetine and its stereo-isomeric analogs on diarrhoea producing enterobacteriaceae. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B. 1986; 94(2):103-6. [DOI:10.1111/j.1699-0463.1986.tb03027.x]

[11] Chattopadhyay D, Dastidar SG, Chakrabarty AN. Antimicrobial properties of methdilazine and its synergism with antibiotics and some chemotherapeutic agents. Arzneimittelforschung. 1988; 38(7):869-72. [PMID]

[12] Karak P, Kumar KA, Mazumdar K, Mookerjee M, Dastidar SG. Antibacterial potential of an antispasmodic drug dicyclomine hydrochloride. Indian J Med Res. 2003; 118:192-6. [PMID]

[13] Mazumdar K, Dastidar SG, Park JH, Dutta NK. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: An antibacterial drug target. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28(8):881-91. [DOI:10.1007/s10096-009-0739-z] [PMID]

[14] Mazumdar K, Ganguly K, Kumar KA, Dutta NK, Chakrabarty AN, Dastidar SG. Antimicrobial potentiality of a new non-antibiotic: The cardiovascular drug oxyfedrine hydrochloride. Microbiol Res. 2003; 158(3):259-64. [DOI:10.1078/0944-5013-00204] [PMID]

[15] Bailey AM, Paulsen IT, Piddock LJ. RamA confers multidrug resistance in Salmonella enterica via increased expression of acrB, which is inhibited by chlorpromazine. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(10):3604-11. [DOI:10.1128/AAC.00661-08] [PMID] [PMCID]

[16] Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes drrA and drrB of Mycobacterium tuberculosis. Biochem J. 2002; 367(1):279-85. [DOI:10.1042/bj20020615] [PMID] [PMCID]

[17] Lee EW, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(12):3733-8. [DOI:10.1128/AAC.47.12.3733-3738.2003] [PMID] [PMCID]

[18] Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM, Hansen JB, Kristiansen JE. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. 2003; 22(3):254-61. [DOI:10.1016/S0924-8579(03)00220-6] [PMID]

[19] Hendricks O, Butterworth TS, Kristiansen JE. The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. 2003; 22(3):262-4. [DOI:10.1016/S0924-8579(03)00205-X] [PMID]

[20] Haynes WC. Pseudomonas aeruginosa—its characterization and identification. J Gen Microbiol. 1951; 5(5 S):939-50. [DOI:10.1099/00221287-5-5-939] [PMID]

[21] Cusack TP, Ashley EA, Ling CL, Roberts T, Turner P, Wangrangsimakul T, et al. Time to switch from CLSI to EUCAST? A Southeast Asian perspective. Clin Microbiol Infect. 2019; 25(7):910-1. [DOI:10.1016/j.cmi.2019.03.007] [PMID] [PMCID]

[22] Inbasekaran D, Sankari M, Girija AS. The Antimicrobial effect of Isoamyl Cyanoacrylate: An In-vitro study. Res J Pharm Technol. 2019; 12(8):3899-902. [DOI:10.5958/0974-360X.2019.00671.1]

[23] Houdkova M, Rondevaldova J, Doskocil I, Kokoska L. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. Fitoterapia. 2017; 118:56-62. [DOI:10.1016/j.fitote.2017.02.008] [PMID]

[24] Trkov M, Avguštin G. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of Salmonella enterica. Int J Food Microbiol. 2003; 80(1):67-75. [DOI:10.1016/S0168-1605(02)00138-1] [PMID]

[25] Linget C, Stylianou DG, Dell A, Wolff RE, Piémont Y, Abdallah MA. Bacterial siderophores: The structure of a desferriferribactin produced by Pseudomonas fluorescens ATCC 13525. Tetrahedron Lett. 1992; 33(27):3851-4. [DOI:10.1016/S0040-4039(00)74802-7]

[26] Jawetz E. The use of combinations of antimicrobial drugs. Annu Rev Pharmacol. 1968; 8:151-70. [DOI:10.1146/annurev.pa.08.040168.001055] [PMID]

[27] Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 2000; 406(6797):775-81. [DOI:10.1038/35021219] [PMID]

[28] Ayaz M, Subhan F, Ahmed J, Khan AU, Ullah F, Ullah I, et al. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. J Biol Res (Thessalon). 2015; 22(1):4. [DOI:10.1186/s40709-015-0028-1] [PMID] [PMCID]

[29] Petersen I, Gilbert RE, Evans SJ, Man SL, Nazareth I. Pregnancy as a major determinant for discontinuation of antidepressants: An analysis of data from The Health Improvement Network. J Clin Psychiatry. 2011; 72(7):979-85. [DOI:10.4088/JCP.10m06090blu] [PMID]

[30] Bacinschi N, Tudor E, Tărăburcă M. [Energy metabolism inhibitors - a new group of antituberculous drugs (Romanian)]. Ştiinţe Medicale. 2021; 71(3):55-63. [DOI:10.52692/1857-0011.2021.3-71.30]]

[31] Rejiba S, Aubry A, Petitfrere S, Jarlier V, Cambau E. Contribution of ParE mutation and efflux to ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. J Chemother. 2008; 20(6):749-52. [DOI:10.1179/joc.2008.20.6.749] [PMID]

[32] Mitchell CJ, Stone TA, Deber CM. Peptide-based efflux pump inhibitors of the small multidrug resistance protein from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 63(9):e00730-19. [DOI:10.1128/AAC.00730-19] [PMID] [PMCID]

[33] Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. J Antimicrob Chemother. 2007; 59(6):1247-60. [DOI:10.1093/jac/dkl460] [PMID]

[34] Aínsa JA, Blokpoel MC, Otal I, Young DB, De Smet KA, Martín C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium tuberculosis. J Bacteriol. 1998; 180(22):5836-43. [DOI:10.1128/JB.180.22.5836-5843.1998] [PMID] [PMCID]

[35] Hulen C, Racine PJ, Feuilloley M, Elomri A, Lomri NE. Effects of verapamil and two bisbenzylisoquinolines, curine and guattegaumerine extracted from isolona hexaloba, on the Inhibition of ABC transporters from pseudomonas aeruginosa. Antibiotics. 2022; 11(5):700. [DOI:10.3390/antibiotics11050700] [PMID] [PMCID]

[36] Coban AY, Ekinci B, Durupinar B. A multidrug efflux pump inhibitor reduces fluoroquinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates. Chemotherapy. 2004; 50(1):22-6. [DOI:10.1159/000077280] [PMID]

[37] Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CD, Tuon FF, Faoro H. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in pseudomonas aeruginosa. Int J Mol Sci. 2022; 23(24):15779. [DOI:10.3390/ijms232415779] [PMID] [PMCID]

[38] Liu Y, Yang L, Molin S. Synergistic activities of an efflux pump inhibitor and iron chelators against Pseudomonas aeruginosa growth and biofilm formation. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(9):3960-3. [DOI:10.1128/AAC.00463-10] [PMID] [PMCID]