

Rearrangement of the oxidative stress response of *Pseudomonas aeruginosa* under combined osmotic and fluoroquinolone stress: Enzymatic and proteomic alterations

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen with a remarkable capacity to adapt to environmental stresses and antibiotic exposure. However, the combined effects of osmotic stress and fluoroquinolones on the reorganization of oxidative stress responses, particularly in multidrug-resistant (MDR) strains, remain incompletely understood. Therefore, the present study aimed to investigate phenotypic, enzymatic, and protein-level alterations in the antioxidant defense system of *P. aeruginosa* under combined osmotic and fluoroquinolone stress conditions.

In this study, three clinical MDR strains and one reference strain were exposed to ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin. Fluoroquinolones were applied at sub-inhibitory concentrations corresponding to one-quarter and one-half of the minimum inhibitory concentration (MIC), while osmotic stress was induced using 0.3 M and 0.5 M sodium chloride. Changes in MIC, phenotypic antibiotic susceptibility, bacterial growth, antioxidant enzyme activities including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), as well as the expression levels of OxyR, KatA, and SodB proteins, were evaluated.

The results demonstrated that the combination of osmotic stress and sub-inhibitory concentrations of fluoroquinolones led to increased minimum inhibitory concentrations, reduced phenotypic susceptibility, and the induction of responses associated with adaptive antibiotic tolerance in multidrug-resistant strains. These conditions were accompanied by a relative reduction in bacterial growth and significant increases in antioxidant enzyme activities and the levels of the investigated proteins. The most pronounced changes were observed in MDR strains exposed to 0.5 M osmotic stress, whereas the reference strain exhibited more limited responses.

The findings indicate that osmotic stress enhances antibiotic tolerance in *P. aeruginosa* through the upregulation of OxyR-associated oxidative defense components and the strengthening of the cellular antioxidant system. These findings are more appropriately interpreted within the framework of stress-associated adaptive tolerance and do not provide direct evidence for the development of stable genetic antibiotic resistance. Such adaptive responses may contribute to the survival, persistence, and ecological fitness of multidrug-resistant strains in clinical environments.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, osmotic stress, fluoroquinolones, sub-MIC, oxidative stress, OxyR, multidrug resistance (MDR)

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen responsible for severe healthcare-associated infections, particularly among immunocompromised patients and individuals with cystic fibrosis. Its extraordinary capacity to adapt to hostile environments, including antimicrobial exposure and physicochemical stressors, contributes substantially to persistence, treatment failure, and multidrug resistance. Exposure to sub-inhibitory antibiotic concentrations (sub-MIC), which frequently occurs during therapeutic administration and environmental exposure, has been shown to trigger adaptive responses affecting biofilm formation, membrane permeability, efflux activity, oxidative defense, and antibiotic tolerance.

Osmotic stress represents another clinically relevant environmental challenge encountered by *P. aeruginosa* in host-associated niches, including respiratory secretions, chronic wounds, and hyperosmotic therapeutic environments. Although the independent effects of osmotic stress and sub-MIC antibiotic exposure have been investigated, their combined influence on oxidative stress response remains incompletely understood, particularly in multidrug-resistant strains.

Oxidative stress responses regulated through OxyR-associated pathways and antioxidant defense systems including catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase are essential determinants of bacterial adaptation during environmental stress. Therefore, the present study investigated the combined effects of osmotic stress and fluoroquinolone treatment on phenotypic susceptibility, growth behavior, antioxidant enzyme activity, and oxidative defense protein expression in MDR and reference strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods

Three clinical MDR strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the reference strain ATCC 27853 were obtained from microbiological collections. Multidrug resistance status was confirmed using CLSI-recommended disk diffusion procedures.

Ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin were evaluated under $\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, and $1\times$ MIC treatment conditions. Osmotic stress was induced using sodium chloride concentrations of 0.3 M and 0.5 M, whereas non-stressed conditions served as controls.

Minimum inhibitory concentrations were determined using broth microdilution according to CLSI recommendations before and after treatment exposure under different osmotic conditions.

Phenotypic susceptibility was assessed using disk diffusion assays. Changes in inhibition zone diameter and relative reductions following treatment were calculated.

Growth kinetics were evaluated using optical density measurements at 600 nm, and growth performance was quantified by calculating the area under the growth curve over a 12-hour period. Activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase were determined spectrophotometrically using established biochemical assays.

Total proteins were extracted using cell lysis procedures and quantified using BCA assays. SDS-PAGE and Western blot analyses were performed to evaluate OxyR, KatA, SodB, and auxiliary antioxidant proteins. Relative band intensities were quantified densitometrically.

All experiments were performed in triplicate. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation and analyzed using appropriate parametric statistical approaches with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results

Combined exposure to osmotic stress and fluoroquinolone treatment increased MIC values in MDR strains, with the highest values observed under $\frac{1}{2}$ MIC pretreatment combined with 0.5 M NaCl exposure.

Phenotypic susceptibility progressively decreased following treatment exposure, particularly under increasing osmotic stress conditions. The greatest reduction in inhibition zone diameter was observed under ciprofloxacin treatment combined with severe osmotic stress, whereas selected treatment conditions demonstrated strain-dependent variation.

Growth declined progressively with increasing osmotic stress intensity. Mean AUC values decreased from 0.5240 under non-stressed conditions to 0.4785 under 0.5 M NaCl exposure, corresponding to approximately 8.7% overall growth inhibition. Growth responses varied among

strains, with MDR-Strain 1 exhibiting the largest reduction and MDR-Strain 1 demonstrating comparatively limited changes. Statistical analyses demonstrated significant effects of antibiotic type and significant strain $\times$ antibiotic interactions.

Antioxidant enzyme activities increased under combined stress conditions. Under $1\times$ MIC combined with 0.5 M NaCl; SOD activity reached 52.33 ± 2.08 in MDR strains compared with 36.25 ± 1.16 in the reference strain. Similar increases were observed for catalase and glutathione peroxidase activities. GPx demonstrated stronger strain dependency than SOD and CAT and remained elevated in MDR strains even under lower-intensity treatment conditions.

Western blot analysis demonstrated treatment-associated alterations in antioxidant defense proteins. Relative increases reached approximately 210% for OxyR, 185% for KatA, and 195% for SodB under selected treatment conditions. MDR strains consistently demonstrated larger responses than the reference strain, whereas AhpC expression decreased under selected experimental conditions.

Multivariate analyses demonstrated highly significant effects of fluoroquinolone concentration and osmotic stress intensity on OxyR expression, with F values of 1085.78 and 614.76 and partial eta squared values of 0.923 and 0.872, respectively. Two-way interactions were not statistically significant; however, the concentration $\times$ osmotic stress $\times$ strain interaction remained significant. Similar statistical patterns were observed for KatA and SodB.

Discussion

The present findings demonstrate that combined osmotic and antibiotic stress induces extensive adaptive remodeling in *Pseudomonas aeruginosa*, particularly among MDR strains. Increased MIC values together with reduced inhibition zone diameters indicate that osmotic stress substantially modifies bacterial responses to fluoroquinolone exposure and promotes adaptive tolerance under sub-inhibitory conditions.

Although osmotic stress reduced overall bacterial growth, antioxidant responses were simultaneously enhanced, suggesting the activation of compensatory defense mechanisms. Increased activities of SOD, CAT, and GPx together with elevated expression of OxyR-associated proteins indicate coordinated activation of oxidative defense pathways during combined environmental stress.

The relatively uniform induction of SodB across treatment conditions suggests that superoxide detoxification may represent an early and generalized protective response. In contrast, CAT and particularly GPx demonstrated stronger strain-dependent regulation, indicating that different antioxidant components contribute unequally to adaptation under combined stress.

The stronger responses consistently observed in MDR strains suggest that pre-existing resistance mechanisms may facilitate physiological rewiring during environmental stress exposure. Enhanced oxidative defense activation may therefore contribute not only to transient stress adaptation but also to persistence under clinically relevant multidimensional stress conditions.

Reduced AhpC expression under selected treatment conditions may further indicate redistribution of cellular resources toward dominant oxidative defense pathways during severe stress exposure. Collectively, these findings support a model in which osmotic stress and fluoroquinolone exposure act cooperatively to reshape oxidative defense networks and promote adaptive survival responses.

Conclusion

In conclusion, osmotic stress substantially modifies bacterial responses to fluoroquinolone exposure by promoting oxidative defense activation and adaptive tolerance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. These effects are particularly pronounced in MDR strains, which exhibit stronger antioxidant activation and greater capacity for stress-associated physiological remodeling. The coordinated induction of OxyR-associated defense systems together with enhanced antioxidant enzyme activity suggests that oxidative defense pathways represent central components of bacterial adaptation during combined environmental and antimicrobial stress. These findings emphasize the importance of considering environmental stress conditions when interpreting antimicrobial susceptibility and designing therapeutic strategies for multidrug-resistant infections.

Future investigations should focus on the regulatory networks underlying stress-induced tolerance and identify potential intervention targets capable of disrupting adaptive oxidative defense responses.

بازآرایی پاسخ استرس اکسیداتیو *Pseudomonas aeruginosa* در مواجهه با تنش ترکیبی اسمزی و

فلوروکینولون: تغییرات آنزیمی و پروتئینی

چکیده

Pseudomonas aeruginosa به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب، توانایی بالایی در سازگاری با تنش‌های محیطی و مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. با این حال، تأثیر هم‌زمان تنش اسمزی و فلوروکینولون‌ها بر بازآرایی پاسخ استرس اکسیداتیو، به ویژه در سویه‌های مقاوم به چند دارو، هنوز به طور کامل شناخته نشده است. هدف این مطالعه بررسی تغییرات فنوتیپی، آنزیمی و پروتئینی سیستم آنتی‌اکسیدانی در *P. aeruginosa* تحت شرایط تنش ترکیبی اسمزی و فلوروکینولونی بود.

در این پژوهش، سه سویه بالینی مقاوم به چند دارو و یک سویه مرجع در معرض فلوروکینولون‌های سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین قرار گرفتند. آنتی‌بیوتیک‌ها در غلظت‌های زیرمهارى معادل یک‌چهارم و یک‌دوم حداقل غلظت مهارى و تنش اسمزی با استفاده از ۰.۰۳ و ۰.۰۵ مولار کلرید سدیم اعمال شد. سپس حداقل غلظت مهارى، حساسیت فنوتیپی، رشد باکتری، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز و همچنین بیان پروتئین‌های OxyR، KatA و SodB ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ترکیب تنش اسمزی و غلظت‌های زیرمهارى فلوروکینولون‌ها موجب افزایش حداقل غلظت مهارى، کاهش حساسیت فنوتیپی و القای پاسخ‌های مرتبط با تحمل تطبیقی آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مقاوم به چند دارو شد. این شرایط با کاهش نسبی رشد باکتری و افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح پروتئین‌های مورد بررسی همراه بود. بیشترین تغییرات در سویه‌های مقاوم به چند دارو تحت تنش اسمزی ۰.۰۵ مولار مشاهده شد، در حالی که سویه مرجع پاسخ محدودتری نشان داد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تنش اسمزی از طریق افزایش اجزای دفاع اکسیداتیو مرتبط با OxyR و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول، تحمل آنتی‌بیوتیکی *P. aeruginosa* را افزایش می‌دهد. این یافته‌ها بیشتر در چارچوب تحمل تطبیقی وابسته به استرس تفسیر می‌شوند و شواهد مستقیمی برای ایجاد مقاومت ژنتیکی پایدار فراهم نمی‌کنند. این سازوکارها می‌توانند در بقاء، سازگاری و تداوم سویه‌های مقاوم به چند دارو در محیط‌های بالینی نقش مهمی ایفا کنند.

کلمات کلیدی

سودوموناس آئروژینوزا، تنش اسمزی، فلوروکینولون‌ها، غلظت زیرمهراری، استرس اکسیداتیو، OxyR، مقاومت چنددارویی

مقدمه

Pseudomonas aeruginosa یک باکتری گرم منفی فرصت طلب و از مهم ترین پاتوژن های چالش برانگیز در پزشکی معاصر است که به ویژه در جمعیت های آسیب پذیر، بار قابل توجهی از عفونت، ناتوانی و مرگ و میر را به سیستم های بهداشتی تحمیل می کند (۱). این پاتوژن یکی از علل اصلی عفونت های بیمارستانی نظیر پنومونی وابسته به ونتیلاتور، سپسیس، عفونت های دستگاه ادراری و عفونت های زخم و سوختگی به شمار می رود و در بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، از طریق کلونیزاسیون مزمن ریوی و تشکیل بیوفیلم، نقش تعیین کننده ای در پیشرفت بیماری و کاهش بقا ایفا می کند (۱، ۳). بیماران دچار نقص ایمنی یا تحت درمان های تهاجمی نیز به طور خاص در معرض عفونت های شدید و اغلب غیرقابل کنترل ناشی از *P. aeruginosa* قرار دارند (۲). توان بالای این باکتری در سازگاری با فشارهای محیطی، شیمیایی و ضد میکروبی، همراه با شیوع فزاینده سویه های مقاوم به چند دارو (MDR)، آن را به یکی از جدی ترین تهدیدهای جهانی در حوزه مقاومت آنتی بیوتیکی تبدیل کرده است و ضرورت بررسی مکانیسم های تطبیقی و دفاعی آن را برجسته می سازد (۱، ۲).

فلوروکینولون ها، از جمله سیپروفلوکساسین (CIP)، نروفلوکساسین (NOR) و اوپلوکساسین (OFX)، از پرکاربردترین آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های ناشی از *P. aeruginosa* محسوب می شوند و سیپروفلوکساسین به طور تاریخی یکی از مؤثرترین اعضای این خانواده علیه این پاتوژن بوده است (۴). این داروها با مهار آنزیم های توپوایزومراز نوع II شامل DNA gyrase و topoisomerase IV، فرایندهای حیاتی همانندسازی و ترمیم DNA را مختل کرده و منجر به مرگ سلولی می شوند (۴). با این حال، مصرف گسترده و گاه غیربهبینه فلوروکینولون ها، به افزایش نگران کننده مقاومت در سویه های بالینی *P. aeruginosa* به ویژه سویه های MDR، انجامیده است (۵). گزارش ها نشان می دهد که بسیاری از ایزوله های MDR مقاومت هم زمان به چند فلوروکینولون را بروز می دهند و این امر گزینه های درمانی را به شدت محدود می سازد (۵). این پدیده حاصل برهم کنش مکانیسم های متعددی از جمله افزایش فعالیت پمپ های افلوکس چنددارویی، تغییر نفوذپذیری غشای خارجی و فعال سازی پاسخ های تطبیقی درون سلولی است (۴).

در این میان، غلظت های زیرمهراری آنتی بیوتیک ها (sub-MICs) به عنوان سطوحی از دارو که قادر به مهار کامل رشد باکتری نیستند، اما همچنان به عنوان یک فشار انتخابی مؤثر عمل می کنند، توجه فزاینده ای را به خود جلب کرده اند (۶). مواجهه با sub-MIC ها می تواند شبکه های تنظیمی و مسیرهای استرسی را فعال کرده و با ایجاد تغییرات فیزیولوژیک و فنوتیپی، زمینه را برای سازگاری، افزایش تحمل آنتی بیوتیکی و کاهش حساسیت فنوتیپی فراهم سازد (۶، ۷). شواهد نشان می دهد که این شرایط می تواند به افزایش MIC، القای مقاومت تطبیقی پایدار و حتی مقاومت متقاطع نسبت به آنتی بیوتیک های دیگر منجر شود (۶، ۸). از این رو، بررسی اثرات sub-MIC ها نقش مهمی در درک کاهش حساسیت آنتی بیوتیکی در مواجهه های بعدی ایفا می کند.

تنش اسمزی ناشی از تغییرات غلظت نمک ها، به ویژه NaCl، یکی از عوامل محیطی کلیدی در فیزیولوژی و سازگاری باکتری ها محسوب می شود (۹). این نوع تنش در محیط های بیمارستانی، ساختارهای بیوفیلمی و ریه بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک اهمیت ویژه ای دارد؛ شرایطی که *P. aeruginosa* به طور مداوم با فشارهای اسمزی مواجه است (۱۰، ۱۱). تنش اسمزی می تواند از طریق تغییر در نفوذپذیری غشا، برهم زدن تعادل ردوکس و افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS)، پاسخ های تطبیقی و حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری را تحت تأثیر قرار دهد (۱۲). با وجود این، اثرات هم زمان تنش اسمزی و مواجهه آنتی بیوتیکی تاکنون کمتر به صورت نظام مند بررسی شده است.

استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از نقاط تلاقی اصلی پاسخ‌های سلولی به تنش‌های محیطی شناخته می‌شود، زیرا هم تنش‌های آنتی‌بیوتیکی و هم تنش اسمزی می‌توانند تولید ROS را افزایش دهند (۱۳). تجمع ROS نظیر سوپراکسید و پراکسید هیدروژن موجب آسیب به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی شده و در صورت عدم مهار، بقای سلولی را به خطر می‌اندازد (۱۴). *P. aeruginosa* برای بقا در چنین شرایطی به شبکه‌ای کارآمد از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی متکی است که شامل آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیدازها و همچنین تنظیم‌کننده‌های کلیدی نظیر OxyR می‌شود (۱۵).

OxyR به عنوان حسگر و تنظیم‌کننده مرکزی پاسخ به پراکسید هیدروژن، بیان مجموعه‌ای از ژن‌های دفاعی را در پاسخ به تغییرات وضعیت ردوکس القا می‌کند و نقش مهمی در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ایفا می‌نماید (۱۶، ۱۷، ۱۸). شواهد روبه‌افزایش نشان می‌دهد که فعال‌سازی مسیرهای دفاع اکسیداتیو می‌تواند به افزایش تحمل آنتی‌بیوتیکی و بقای فنوتیپی در مواجهه با داروها منجر شود (۱۹، ۲۰). با این حال، اغلب این مطالعات در شرایط تنش منفرد انجام شده‌اند و نقش بازآرایی سیستم‌های دفاع اکسیداتیو، به‌ویژه مسیر OxyR، در مواجهه با تنش‌های ترکیبی همچنان به‌طور کامل روشن نشده است.

اگرچه مطالعات متعددی به بررسی اثرات غلظت‌های زیرمهار آنتی‌بیوتیک‌ها پرداخته‌اند و نشان داده‌اند که این غلظت‌ها می‌توانند باعث افزایش تنوع ژنتیکی، جهش و انتقال افقی ژن‌های مقاومت شوند (۲۱)، اما درک ما از نحوه تعامل هم‌زمان این غلظت‌های زیرمهار با سایر تنش‌های محیطی، به‌ویژه تنش اسمزی، همچنان محدود باقی مانده است.

بر این اساس، هدف این مطالعه بررسی بازآرایی پاسخ استرس اکسیداتیو *P. aeruginosa* در مواجهه با تنش ترکیبی اسمزی و فلوروکینولونی است. در این پژوهش، با اتخاذ یک رویکرد چندسطحی، تغییرات حساسیت آنتی‌بیوتیکی، سازگاری فیزیولوژیک و فعالیت آنزیم‌های کلیدی مرتبط با دفاع اکسیداتیو در سویه‌های MDR و سویه مرجع ATCC مورد ارزیابی و مقایسه قرار می‌گیرد. انتظار می‌رود نتایج این مطالعه به درک دقیق‌تر نقش تنش‌های ترکیبی در تنظیم پاسخ‌های اکسیداتیو و تحمل آنتی‌بیوتیکی *P. aeruginosa* کمک کرده و چارچوب مفهومی مناسبی برای تفسیر رفتار تطبیقی این پاتوژن در شرایط بالینی فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و طراحی مطالعه

ایزوله‌های بالینی *P. aeruginosa* مورد استفاده در این مطالعه از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در سه مرکز درمانی منتخب در شهر تهران (دو مرکز دولتی و یک مرکز خصوصی) تهیه شدند. پس از جداسازی اولیه، شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از آزمون‌های استاندارد میکروبیولوژیک و تأیید مولکولی با PCR انجام شد. ایزوله‌هایی که مطابق تعریف استاندارد Magiorakos و همکاران دارای مقاومت نسبت به حداقل یک عامل در سه رده مختلف آنتی‌بیوتیکی بودند، به عنوان سویه‌های MDR انتخاب شدند. از میان این ایزوله‌ها، سه سویه دارای مقاومت هم‌زمان به سیپروفلوکساسین، نروفلوکساسین و افلوکساسین برای ادامه مطالعه انتخاب شدند. این سه سویه بالینی MDR، همگی مقاومت هم‌زمان به سیپروفلوکساسین، نروفلوکساسین و افلوکساسین را نشان دادند. با توجه به مقاومت هم‌زمان به هر سه فلوروکینولون، این سویه‌ها به صورت MDR-Strain 1، MDR-Strain 2 و MDR-Strain 3 در جداول و شکل‌های مقاله نام‌گذاری شده‌اند. سویه استاندارد حساس *P. aeruginosa* ATCC 27853 به عنوان کنترل کیفی در تمامی مراحل آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. طراحی مطالعه به صورت آزمایشگاهی-مقایسه‌ای و تحت شرایط کنترل شده انجام شد.

شناسایی فنوتیپی و تأیید گونه

شناسایی فنوتیپی شامل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، حرکت، سیتрат، اکسیداسیون-تخمیر (OF)، محیط TSI، آزمون‌های MR-VP، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، تولید پیوسیانین در محیط King A و بررسی بوی اختصاصی بود. نتایج با

استفاده از منابع مرجع از جمله *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* تطبیق داده شد (۲۲، ۲۳). سویه مرجع ATCC 27853 به عنوان کنترل کیفی و صرفاً برای اعتبارسنجی آزمون‌ها استفاده شد.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و MIC

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ابتدا با روش انتشار دیسکی و مطابق دستورالعمل CLSI تعیین شد. سپس حداقل غلظت مهارکننده (MIC) برای سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین با روش رقت در آگار اندازه‌گیری گردید. رقت‌های دوبرابری متوالی (0.015–64 µg/mL) تهیه و سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰.۵ مک‌فارلند بر روی محیط مولر-هینتون تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد قابل مشاهده تعیین گردید (۲۴، ۲۵).

سویه ATCC 27853 به عنوان کنترل کیفی به کار رفت و بر اساس مقادیر MIC، غلظت‌های ۱/۴، ۱/۲ و ۱ MIC× برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. در این مطالعه، غلظت‌های ۱/۴ و ۱/۲ MIC به عنوان سطوح زیرمهراری (sub-MIC) برای بررسی پاسخ‌های تطبیقی، تغییرات حساسیت آنتی‌بیوتیکی و فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی باکتری مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر این، غلظت ۱ MIC× نیز به عنوان یک سطح مقایسه‌ای در طراحی آزمایش لحاظ شد تا پاسخ‌های باکتری در شرایط مهراری کامل با شرایط زیرمهراری مقایسه شود.

ارزیابی حساسیت فنوتیپی با روش انتشار دیسک

به منظور بررسی تغییرات الگوی حساسیت فنوتیپی سویه‌های *P. aeruginosa* تحت تأثیر تیمارهای ترکیبی، از روش انتشار دیسک در آگار (Disk Diffusion) مطابق با روش Bauer-Kirby و بر اساس دستورالعمل‌های به‌روز شده مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (۲۶) استفاده گردید. بدین منظور، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت استاندارد ۰.۵ مک‌فارلند (معادل ۱.۵ × ۱۰^۸ CFU/mL) در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد و سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر-هینتون آگار (MHA) با ضخامت ۴ میلی‌متر با استفاده از سواب استریل به‌صورت یکنواخت تلقیح گردید. سپس دیسک‌های استاندارد حاوی سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم) و افلوکساسین (۵ میکروگرم) بر روی سطح محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۵ ± ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸–۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد (شامل قطر دیسک) با استفاده از کولیس دیجیتالی با دقت ۰.۱ میلی‌متر در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری و میانگین آن محاسبه گردید. نتایج بر اساس استانداردهای کمیته CLSI به‌صورت حساس (S)، نیمه‌حساس (I) و مقاوم (R) تفسیر و ثبت شدند (۲۴، ۲۷).

پیش‌تیمار با غلظت‌های زیرمهراری (sub-MIC):

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های زیرمهراری آنتی‌بیوتیک بر حساسیت فنوتیپی، ابتدا سویه‌های باکتری در محیط کشت مایع مولر-هینتون برات (MHB) حاوی غلظت‌های ۱/۴ و ۱/۲ MIC از هر یک از سه فلوروکینولون، تحت سطوح مختلف تنش اسمزی (۰، ۰.۳، ۰.۵ و ۰.۵ مولار NaCl) به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شیکر) دور ۱۵۰ rpm) انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با سانتریفیوژ (۴۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری و سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شسته شدند تا اثر باقیمانده دارو حذف گردد. پس از شستشو، سوسپانسیون باکتریایی مجدداً به کدورت ۰.۵ مک‌فارلند تنظیم و آزمون انتشار دیسک بر اساس روش فوق انجام شد. گروه کنترل شامل باکتری‌هایی بود که در شرایط مشابه اما بدون افزودن آنتی‌بیوتیک و NaCl انکوبه شدند. همچنین به منظور بررسی پاسخ‌های وابسته به زمان، رشد باکتری‌ها طی بازه ۰ تا ۱۲ ساعت با اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر پایش شد و مساحت زیر منحنی رشد (AUC_{0-12 h}) به عنوان شاخص پتانسیل رشد و سازگاری سلولی محاسبه گردید.

کلیه آزمایش‌ها برای سه سویه بالینی MDR و سویه مرجع ATCC 27853 در سه تکرار مستقل انجام گردید و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. داده‌های مربوط به تولید ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه کنترل بدون تیمار نرمال‌سازی و به صورت درصد تغییرات گزارش گردیدند.

طراحی تیمارهای آزمایشی و اعمال تنش ترکیبی

طراحی آزمایش به صورت فاکتوریل انجام شد تا اثرات مستقل و متقابل تنش اسمزی و تیمارهای آنتی‌بیوتیکی بر پاسخ‌های سلولی *P. aeruginosa* بررسی شود. برای القای تنش اسمزی، محیط‌های کشت حاوی ۰، ۰۰۳ و ۰۰۵ مولار NaCl تهیه شدند. غلظت‌های ۰۰۳ و ۰۰۵ مولار بر اساس مطالعات پیشین و به منظور ایجاد سطوح متوسط و شدید تنش اسمزی انتخاب شدند (۲۸، ۲۹) تا پاسخ سلول‌ها در شرایط فشار اسمزی فزاینده ارزیابی شود.

پس از اعمال شرایط اسمزی، باکتری‌ها در معرض غلظت‌های مختلف فلوروکینولون‌ها شامل $\frac{1}{4}$ MIC، $\frac{1}{2}$ MIC و ۱ MIC قرار گرفتند. غلظت‌های زیرمهار ۱/۴ و ۱/۲ MIC برای بررسی پاسخ‌های تطبیقی، تغییرات تحمل آنتی‌بیوتیکی و فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی سلولی مورد استفاده قرار گرفتند، در حالی که غلظت ۱ MIC به عنوان سطح مهار مرجع برای مقایسه پاسخ باکتری در شرایط مهار کامل در نظر گرفته شد. این طراحی امکان مقایسه پاسخ‌های سلولی در شرایط زیرمهار و مهار و همچنین بررسی تغییرات ناشی از تنش ترکیبی را فراهم ساخت.

ارزیابی رشد باکتری

رشد باکتری‌ها تحت تیمارهای مختلف با اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر طی بازه ۰ تا ۱۲ ساعت پایش شد. مساحت زیر منحنی رشد (AUC_{0-12h}) به عنوان شاخص پتانسیل رشد و سازگاری سلولی محاسبه گردید. بر اساس نتایج رشد و مقادیر MIC، تیمار $\frac{1}{2}$ MIC فلوروکینولون همراه با ۰۰۵ مولار NaCl به عنوان قوی‌ترین محرک پاسخ تطبیقی انتخاب شد. انتخاب غلظت $\frac{1}{2}$ MIC بر اساس ماهیت زیرمهار این سطح انجام گرفت، زیرا این غلظت امکان بررسی پاسخ‌های سازگاری سلولی در حضور فشار دارویی را بدون ایجاد مهار کامل رشد فراهم می‌کند. همچنین، غلظت ۰۰۵ مولار NaCl به عنوان بالاترین سطح تنش اسمزی اعمال شده، شرایط مناسبی برای ارزیابی پاسخ سلول‌ها تحت فشار اسمزی شدیدتر فراهم ساخت. بر این اساس، ترکیب $\frac{1}{2}$ MIC و ۰۰۵ مولار NaCl به عنوان شرایط منتخب برای انجام آزمون‌های تکمیلی شامل بررسی پاسخ استرس اکسیداتیو، سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ارزیابی تغییرات پروتئین‌های دفاعی در نظر گرفته شد (۳۰، ۳۱).

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPx با استفاده از کیت‌های تجاری و روش‌های رنگ‌سنجی استاندارد اندازه‌گیری شد. جذب نوری به ترتیب در طول موج‌های ۵۶۰، ۴۲۰ و ۳۴۰ یا ۴۱۲ نانومتر ثبت گردید (۳۲). تمامی آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام شدند و نتایج به صورت U/mg protein (میانگین $\pm$ انحراف معیار) گزارش گردیدند (۳۳).

استخراج پروتئین و آماده‌سازی نمونه‌ها

سلول‌ها پس از تیمار با سانتریفیوژ ($10,000 \times g$)، ۱۰ دقیقه، ۴°C (جمع‌آوری شدند و در بافر لیز حاوی Tris-HCl 50 mM، SDS (1%)، EDTA (1 mM)، NaCl (150 mM)، pH 7.5 و مهارکننده‌های پروتئازای معلق شدند (۳۴). لیز سلولی با سونیکاتور پروبی (20 kHz)، ۱۵۰ W در چهار سیکل ۳۰ ثانیه‌ای انجام شد. پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت برای آنالیزهای بعدی استفاده شد (۳۵).

غلظت پروتئین با روش Bradford یا BCA تعیین و در صورت لزوم نمونه‌ها با روش متانول-کلروفرم خالص‌سازی شدند (۳۶). کیفیت استخراج با SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی Coomassie تأیید شد.

وسترن بلات

برای بررسی تغییرات نسبی پروتئین‌های مرتبط با پاسخ دفاع آنتی‌اکسیدانی، از روش وسترن بلات استفاده شد. پروتئین‌های کل سلولی پس از استخراج و دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، با استفاده از SDS-PAGE بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ بر اساس وزن مولکولی جداسازی و سپس به غشای PVDF منتقل شدند. پس از انتقال، غشاها با محلول بلوکه‌کننده مناسب در بافر TBST جهت کاهش اتصال غیراختصاصی تیمار شدند. شناسایی پروتئین‌های هدف شامل OxyR، KatA و SodB با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی انجام شد. پس از انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه‌شده با HRP، باندهای پروتئینی با روش شیمی‌لومینسانس آشکارسازی شدند.

برای کنترل بارگذاری و نرمال‌سازی داده‌ها، پروتئین GroEL به‌عنوان کنترل داخلی (Loading control) مورد استفاده قرار گرفت. شدت نسبی باندها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ کمی‌سازی شد و پس از نرمال‌سازی نسبت به باند متناظر GroEL، مقادیر حاصل برای مقایسه بین تیمارهای مختلف به‌کار رفت. تمامی آزمایش‌ها در حداقل سه تکرار زیستی و سه تکرار فنی انجام شدند و نتایج به‌صورت تغییرات نسبی شدت باند نسبت به گروه کنترل گزارش گردید (۳۸،۳۷).

تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها در حداقل سه تکرار زیستی و سه تکرار فنی انجام شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ و آزمونهای تحلیل واریانس چندعاملی (Factorial ANOVA) برای داده‌های رشد، ROS، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان پروتئین‌ها انجام گرفت. آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه‌های چندگانه بین گروه‌ها به‌کار رفت. سطح معنی‌داری آماری برابر با $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

به منظور ارزیابی اثر عوامل آزمایشی شامل غلظت آنتی‌بیوتیک، شدت تنش اسمزی، نوع سویه و زمان پیش‌تیمار، علاوه بر آزمون معنی‌داری آماری، شاخص‌های اندازه اثر و برازش مدل نیز محاسبه گردیدند. ضریب تعیین (R^2) نشان‌دهنده نسبت واریانس متغیر وابسته است که توسط مدل آماری شامل عوامل اصلی و اثرات متقابل آنها تبیین می‌شود. مقادیر R^2 نزدیک به ۱ بیانگر برازش مناسب مدل هستند.

همچنین برای تعیین اندازه اثر هر عامل از شاخص مجذور اتای جزئی (η^2p) استفاده شد که از رابطه $\eta^2p = SS_{effect} / (SS_{effect} + SS_{error})$ محاسبه می‌شود. این شاخص سهم نسبی هر عامل را در تغییرات متغیر وابسته نشان می‌دهد. بر اساس معیارهای Cohen (1988)، مقادیر ۰،۰۱، ۰،۰۶ و ۰،۱۴ به‌ترتیب بیانگر اثر کوچک، متوسط و بزرگ هستند.

در تحلیل واریانس، آماره F از تقسیم میانگین مجذورات عامل مورد بررسی (MS_{effect}) بر میانگین مجذورات خطا (MS_{error}) محاسبه شد. مقادیر بزرگتر F نشان‌دهنده سهم بیشتر عامل مورد مطالعه در ایجاد تغییرات مشاهده‌شده نسبت به تغییرات تصادفی بوده و معنی‌داری آن بر اساس مقدار p متناظر ارزیابی گردید.

ملاحظات اخلاقی

تمامی مراحل پژوهش مطابق با اصول ایمنی زیستی سطح BSL-2 انجام شد. نمونه‌ها به‌صورت ناشناس پردازش شدند و هیچ‌گونه اطلاعات هویتی بیماران ثبت یا گزارش نشد.

نتایج

تغییرات حداقل غلظت مهار (MIC) فلوروکینولون‌ها تحت تنش اسمزی و تیمارهای زیرمهار

داده‌های جدول ۱ نشان می‌دهد که در هر سه فلوروکینولون مورد بررسی، میانگین MIC با افزایش سطح تیمار زیرمهماری و تشدید تنش اسمزی، روند افزایشی قابل‌توجهی داشته است. در شرایط بدون تنش اسمزی، کمترین میانگین MIC مربوط به سیپروفلوکساسین با مقدار 20.13 ± 1.47 میکروگرم بر میلی‌لیتر در سطح ۱ برابر MIC بود. بیشترین میانگین MIC نیز در نورفلوکساسین با مقدار 29.47 ± 2.18 میکروگرم بر میلی‌لیتر در سطح $1/2$ MIC مشاهده شد.

بیشترین تأثیر تنش اسمزی بر افزایش MIC در سطح $1/2$ MIC همراه با 0.5 مولار کلرید سدیم مشاهده شد. در این شرایط، میانگین MIC سیپروفلوکساسین به 159.23 ± 8.34 ، نورفلوکساسین به 194.56 ± 9.87 و افلوکساسین به 173.70 ± 8.62 میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. این مقادیر نسبت به شرایط بدون تنش اسمزی، به‌ترتیب 71.06 ، 65.08 و 69.01 درصد افزایش نشان دادند که بیانگر نقش چشمگیر تنش اسمزی در تشدید تحمل آنتی‌بیوتیکی است.

در میان فلوروکینولون‌های مورد بررسی، نورفلوکساسین در تمامی سطوح تیمار و تنش اسمزی بالاترین مقادیر MIC را به خود اختصاص داد. این اختلاف در شرایط تنش شدید ناشی از حضور 0.5 مولار کلرید سدیم آشکارتر بود. به‌عنوان نمونه، در سطح $1/2$ MIC همراه با 0.5 مولار کلرید سدیم، مقدار MIC نورفلوکساسین برابر با 194.56 ± 9.87 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که به‌طور معنی‌داری از افلوکساسین با مقدار 173.70 ± 8.62 و سیپروفلوکساسین با مقدار 159.23 ± 8.34 میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر بود. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود و مقدار p کمتر از 0.0001 به دست آمد.

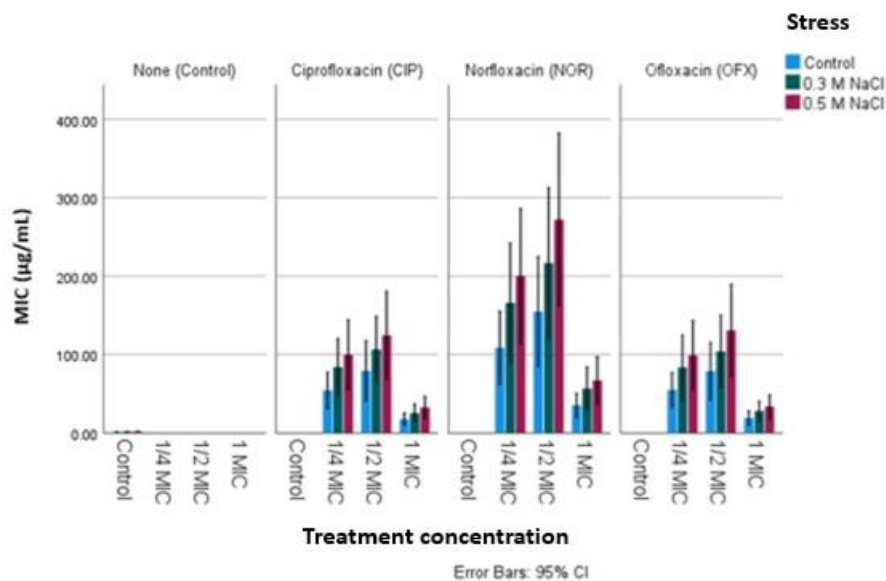
نتایج حاضر نشان می‌دهد نورفلوکساسین در مقایسه با دو فلوروکینولون دیگر، افزایش MIC بیشتری را تحت تنش ترکیبی اسمزی و دارویی نشان داد. این پدیده احتمالاً با وابستگی بیشتر این دارو به سامانه‌های افلوکس وابسته به استرس اسمزی، از جمله سامانه MexEF-OprN، مرتبط است.

در مقابل، سویه مرجع ATCC 27853 در تمامی شرایط آزمایشی مقدار MIC کمتر از 2 میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد. اگرچه داده‌های مربوط به این سویه ارائه نشده‌اند، نتایج حاصل حساسیت بالای آن را به فلوروکینولون‌ها حتی در حضور تنش اسمزی تأیید می‌کند.

جدول ۱: میانگین $\pm$ انحراف معیار حداقل غلظت‌های بازدارنده (میکروگرم در میلی‌لیتر) سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین علیه سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو (MDR) تحت پیش‌تیمارهای زیر MIC و سطوح مختلف تنش اسمزی

Pre-treatment concentration	Osmotic stress (NaCl)	Ciprofloxacin (Mean $\pm$ SD)	Norfloxacin (Mean $\pm$ SD)	Ofloxacin (Mean $\pm$ SD)
1 $\times$ MIC	No stress	20.13 ± 1.47	29.47 ± 2.18	22.49 ± 1.68
1 $\times$ MIC	0.3 M	32.56 ± 1.92	43.85 ± 2.76	33.69 ± 2.03

Pre-treatment concentration	Osmotic stress (NaCl)	Ciprofloxacin (Mean $\pm$ SD)	Norfloxacin (Mean $\pm$ SD)	Ofloxacin (Mean $\pm$ SD)
1 $\times$ MIC	0.5 M	40.21 $\pm$ 2.24	51.38 $\pm$ 3.04	41.70 $\pm$ 2.41
¼ MIC	No stress	62.34 $\pm$ 4.15	82.76 $\pm$ 5.22	72.90 $\pm$ 4.56
¼ MIC	0.3 M	98.45 $\pm$ 5.31	124.56 $\pm$ 6.82	110.26 $\pm$ 5.78
¼ MIC	0.5 M	118.90 $\pm$ 6.42	148.23 $\pm$ 7.61	131.90 $\pm$ 6.93
½ MIC	No stress	92.78 $\pm$ 5.56	117.34 $\pm$ 6.95	102.69 $\pm$ 5.88
½ MIC	0.3 M	127.45 $\pm$ 7.02	157.89 $\pm$ 8.25	141.80 $\pm$ 7.45
½ MIC	0.5 M	159.23 $\pm$ 8.34	194.56 $\pm$ 9.87	173.70 $\pm$ 8.62



شکل ۱- میانگین حداقل غلظت مهاری آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، نروفلوکساسین و اوفلوکساسین در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* تحت غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک و سطوح متفاوت استرس اسمزی

Figure 1- Mean minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* strains under different antibiotic concentrations and varying osmotic stress levels.

نمایش گرافیکی داده‌ها در نمودار میله‌ای خوشه‌ای (شکل ۱) افزایش تدریجی MIC را با تشدید هم‌زمان تیمارهای زیرمهماری آنتی‌بیوتیک و تنش اسمزی نشان می‌دهد. در تمامی شرایط آزمایشی، سویه کنترل ATCC 27853 مقادیر MIC بسیار پایین‌تری (کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به سویه‌های MDR داشت.

بیشترین مقادیر MIC در سویه‌های MDR در شرایط تیمار MIC ½ همراه با ۰.۵ مولار NaCl مشاهده شد؛ از این رو، این شرایط به‌عنوان تیمار منتخب برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید.

تغییر حساسیت فنوتیپی (آزمون انتشار دیسک)

پیش از اعمال تیمار، میانگین قطر هاله عدم رشد در شرایط کنترل (بدون NaCl) برابر با 12.07 ± 1.59 میلی‌متر بود. با افزایش شدت تنش اسمزی تا ۰.۵ مولار NaCl، این مقدار به 10.22 ± 1.65 میلی‌متر کاهش یافت. نتایج تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) اثرات اصلی سویه، آنتی‌بیوتیک، غلظت و تنش اسمزی را از نظر آماری معنی‌دار نشان داد ($p < 0.001$) برای همه موارد؛ با ضریب تعیین R^2 برابر با ۰.۹۳. مقدار η^2 جزئی بالا برای عامل تنش اسمزی برابر با ۰.۷۲۰ به‌دست آمد. بیشترین قطر هاله عدم رشد در سویه ۲ تیمار شده با سیپروفلوکساسین برابر با 13.59 ± 0.97 میلی‌متر و کمترین مقدار در سویه ۳ تیمار شده با نورفلوکساسین برابر با 8.67 ± 1.07 میلی‌متر مشاهده شد.

پس از اعمال تیمار sub-MIC، کاهش بیشتری در قطر هاله عدم رشد ثبت شد. میانگین کلی قطر هاله در شرایط کنترل از 8.42 ± 2.18 میلی‌متر به 7.12 ± 1.33 میلی‌متر در حضور ۰.۵ مولار NaCl کاهش یافت. نتایج تحلیل واریانس مجدد، معنی‌دار بودن اثرات اصلی و تعاملات دوعاملی، از جمله تعامل غلظت $\times$ تنش اسمزی را نشان داد ($p < 0.001$)، با مقدار R^2 برابر با ۰.۹۵۷. مقدار η^2 جزئی بالا برای عامل غلظت برابر با ۰.۹۲۸ به‌دست آمد.

در این شرایط، سویه ۲ تیمار شده با سیپروفلوکساسین بیشترین قطر هاله عدم رشد (8.96 ± 2.46 میلی‌متر) و سویه ۳ تیمار شده با نورفلوکساسین کمترین مقدار (6.52 ± 0.85 میلی‌متر) را نشان داد.

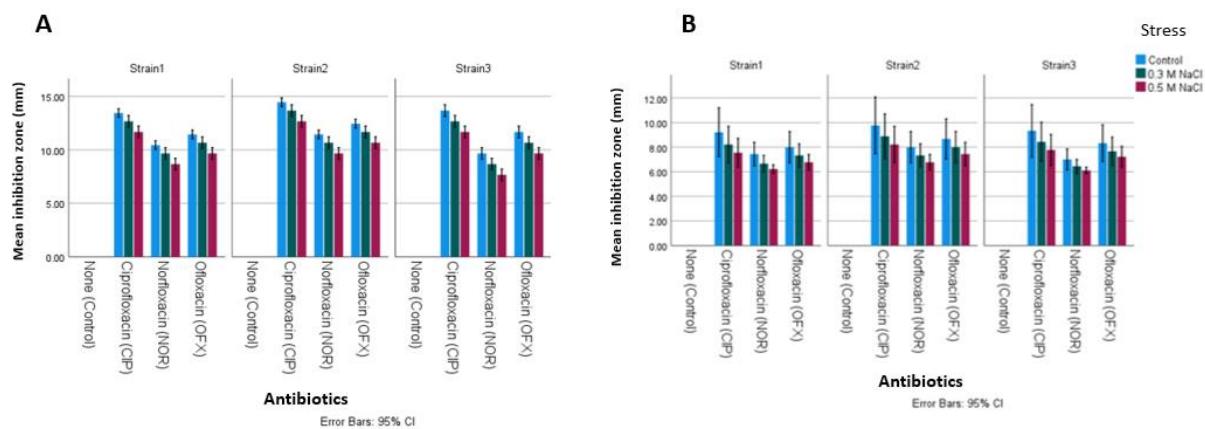
مقایسه مقادیر پیش و پس از تیمار sub-MIC نشان داد که میانگین کلی قطر هاله عدم رشد به میزان ۲۲.۳٪ کاهش یافت (جدول ۲). بیشترین میزان کاهش مربوط به سیپروفلوکساسین در شرایط تنش اسمزی ۰.۵ مولار (۲۴.۳٪) و کمترین میزان کاهش مربوط به افلوکساسین در شرایط کنترل (۴.۷٪) بود. در برخی تیمارهای محدود، از جمله افلوکساسین در غلظت MIC ½ همراه با ۰.۵ مولار NaCl، افزایش جزئی قطر هاله عدم رشد ثبت شد.

جدول ۲: تغییرات قطر هاله عدم رشد در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* قبل و بعد از تیمار sub-MIC تحت سطوح مختلف تنش اسمزی به همراه درصد کاهش

Table 2. Changes in inhibition zone diameter in *Pseudomonas aeruginosa* strains before and after sub-MIC treatment under different osmotic stress levels along with percentage reduction

Antibiotic	Concentration (MIC)	Osmotic stress (NaCl)	Mean before $\pm$ SD	Mean after $\pm$ SD	Change (Δ)	Reduction (%)
Ciprofloxacin	$\frac{1}{4}$	Control	13.67 $\pm$ 0.58	11.67 $\pm$ 0.58	-2.00	14.6
Ciprofloxacin	$\frac{1}{4}$	0.5 M	12.33 $\pm$ 0.58	9.33 $\pm$ 0.58	-3.00	24.3
Norfloxacin	$\frac{1}{2}$	0.3 M	7.33 $\pm$ 0.58	6.33 $\pm$ 0.58	-1.00	13.6
Ofloxacin	$\frac{1}{4}$	Control	9.67 $\pm$ 0.58	9.22 $\pm$ 0.67	-0.45	4.7
Ofloxacin	$\frac{1}{2}$	0.5 M	6.67 $\pm$ 0.58	7.22 $\pm$ 0.67	+0.55	—

در تحلیل تغییرات قطر هاله عدم رشد، ضریب تعیین مدل ($R^2=0.93$) نشان داد که ۹۳ درصد از تغییرات مشاهده شده توسط عوامل وارد شده در مدل آماری تبیین شده است که بیانگر برازش بسیار مناسب مدل می باشد. همچنین مقدار $\eta^2p=0.720$ برای تنش اسمزی نشان دهنده اندازه اثر بسیار بزرگ این عامل بر قطر هاله عدم رشد است؛ به طوری که بخش عمده ای از تغییرات مشاهده شده به اثر تنش اسمزی نسبت داده می شود.



شکل ۲- نمودار مقایسه‌ای میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* قبل و بعد از تیمار sub-MIC تحت تأثیر فلوروکینولون‌ها و سطوح تنش اسمزی

Figure 2- Comparative diagram of the mean inhibition zone diameter of *Pseudomonas aeruginosa* strains before and after sub-MIC treatment under the influence of fluoroquinolones and osmotic stress levels.

نمودار مقایسه‌ای (شکل ۲) تغییرات قطر هاله عدم رشد را قبل و بعد از تیمار sub-MIC تحت تأثیر فلوروکینولون‌ها و سطوح مختلف تنش اسمزی به صورت بصری نشان می‌دهد و روند کاهشی کلی را تأیید می‌کند.

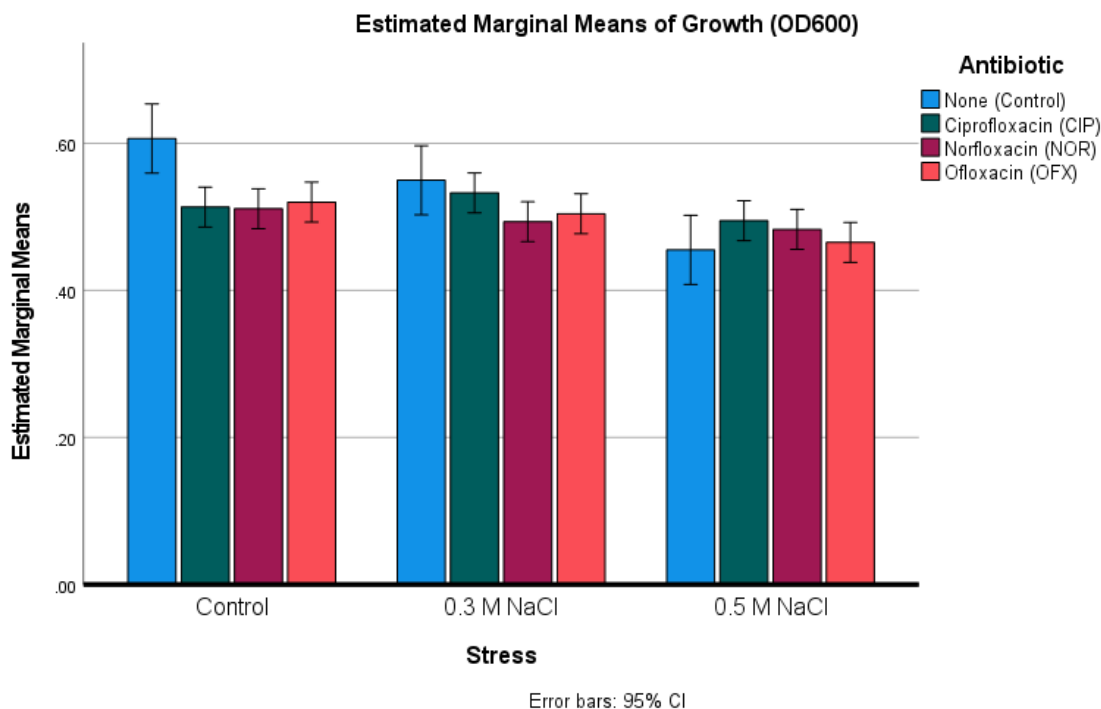
تأثیر بر رشد یا زنده‌مانی

نتایج نشان داد که میانگین شاخص رشد با افزایش شدت تنش اسمزی به طور پیشرونده کاهش یافت. همبستگی معکوس بین کاهش شاخص رشد (از ۰,۵۲۴۰ در شرایط بدون تنش به ۰,۴۷۸۵ در حضور ۰,۵ مولار NaCl) و افزایش MIC از (۲۴,۰۳ در شرایط ۱ MIC بدون تنش به ۱۷۵,۸۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شرایط ۱/۲ MIC + ۰.۵ M NaCl) نشان‌دهنده آن است که کاهش رشد با افزایش تحمل آنتی‌بیوتیکی همراه است (جدول ۱ و ۳). شاخص رشد از ۰,۵۲۴۰ در شرایط بدون تنش به ۰,۴۷۸۵ در حضور تنش اسمزی شدید کاهش یافت که معادل مهار ۸,۷ درصدی رشد است. میان سویه‌ها تفاوت‌های جزئی مشاهده شد؛ سویه یک بیشترین کاهش را از ۰,۵۴۳۲ به ۰,۴۴۶۵ نشان داد و سویه دو کمترین تغییر را از ۰,۵۲۲۱ به ۰,۴۹۵۵ تجربه کرد. تحلیل واریانس چهارطرفه مدل کلی را معنی‌دار نشان داد. اثر اصلی آنتی‌بیوتیک نیز معنی‌دار بود و اوفلوکساسین کمترین مقادیر شاخص رشد را به ویژه در تنش شدید نشان داد. تعامل دوجانبه سویه و آنتی‌بیوتیک نیز معنی‌دار بود و تفاوت پاسخ سویه‌ها به داروها را مشخص کرد. اثرات اصلی سویه و زمان پیش تیمار معنی‌دار نبودند (جدول ۳).

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار مساحت زیر منحنی رشد سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* تحت سطوح مختلف تنش اسمزی

Table 3. Mean and standard deviation of area under the growth curve of *Pseudomonas aeruginosa* strains under different levels of osmotic stress

MDR-Strain	No stress (Mean ± SD)	0.3 M NaCl (Mean ± SD)	0.5 M NaCl (Mean ± SD)	Overall mean (Mean ± SD)
MDR-Strain1	0.5432 ± 0.0743	0.5152 ± 0.0681	0.4465 ± 0.0762	0.502 ± 0.084
MDR-Strain2	0.5221 ± 0.0930	0.5158 ± 0.0830	0.4955 ± 0.0645	0.511 ± 0.082
MDR-Strain3	0.5068 ± 0.0950	0.5113 ± 0.0574	0.4936 ± 0.0772	0.504 ± 0.078
Overall	0.5240 ± 0.084	0.5141 ± 0.067	0.4785 ± 0.073	0.506 ± 0.077



شکل ۳- میانگین‌های حاشیه‌ای رشد (OD600) بر اساس تعامل نوع آنتی‌بیوتیک و شدت تنش اسمزی در سویه‌های مقاوم

Pseudomonas aeruginosa

Figure 3. Marginal means of growth (OD600) based on the interaction of antibiotic type and osmotic stress intensity in resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains.

نمودار میانگین‌های حاشیه‌ای رشد (شکل ۳)، تعامل نوع آنتی‌بیوتیک و شدت تنش اسمزی را نشان می‌دهد و کاهش پیش‌رونده رشد را تأیید می‌کند. این تغییرات نمایانگر اثر تنش‌های ترکیبی بر رشد کلی باکتری است.

تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

به منظور ارزیابی مستقیم پاسخ اکسیداتیو باکتری، میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سویه‌های مقاوم *Pseudomonas aeruginosa* تحت شرایط تنش اسمزی و مواجهه با فلوروکینولون‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش شدت تنش اسمزی، میزان ROS روند افزایشی داشت؛ به طوری که میانگین کلی ROS از $99,2 \pm 40,1$ در شرایط بدون تنش به $109,9 \pm 452,2$ در غلظت $0,3$ مولار NaCl و $127,4 \pm 510,7$ در غلظت $0,5$ مولار NaCl افزایش یافت که بیانگر افزایش تقریبی ۲۷ درصدی نسبت به شرایط شاهد بود.

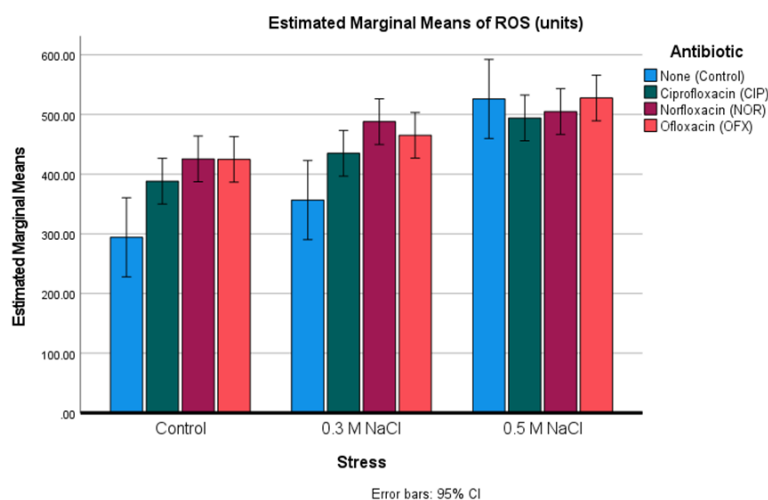
در میان سویه‌های مورد بررسی، بیشترین افزایش ROS در MDR-Strain 1 مشاهده شد؛ به طوری که مقدار آن از $80,1 \pm 358,8$ در شرایط بدون تنش به $123,3 \pm 587,9$ در تنش شدید اسمزی رسید. نتایج تحلیل واریانس چهارطرفه نشان داد که نوع آنتی‌بیوتیک اثر معنی‌داری بر تولید ROS دارد ($P=0.001$)، در حالی که اثر اصلی سویه به تنهایی معنی‌دار نبود ($P=0.894$). همچنین برهم‌کنش سویه و آنتی‌بیوتیک معنی‌دار بود ($P=0.007$) که نشان می‌دهد پاسخ اکسیداتیو به فلوروکینولون‌ها به ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌ها وابسته است.

به طور کلی، افزایش ROS در شرایط تنش اسمزی و مواجهه با فلوروکینولون‌ها نشان‌دهنده مشارکت مستقیم فرآیندهای اکسیداتیو در پاسخ سلولی بوده و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان پروتئین‌های دفاع اکسیداتیو مشاهده شده در این مطالعه همخوانی داشت. (جدول ۴ و شکل ۴).

جدول ۴- تغییرات میانگین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* تحت سطوح مختلف تنش اسمزی

Table 4. Mean changes of reactive oxygen species (ROS) in *Pseudomonas aeruginosa* strains under different levels of osmotic stress

MDR-Strain	No Stress	0.3 M NaCl	0.5 M NaCl
MDR-Strain 1	358.8 ± 80.1	455.5 ± 107.8	587.9 ± 123.3
MDR-Strain 2	429.5 ± 103.6	476.0 ± 108.0	461.6 ± 111.8
MDR-Strain 3	414.9 ± 100.7	425.1 ± 111.5	482.6 ± 112.3
Overall Mean	401.1 ± 99.2	452.2 ± 109.9	510.7 ± 127.4



شکل ۴. میانگین‌های حاشیه‌ای تخمینی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS units) بر اساس تعامل نوع آنتی‌بیوتیک و سطوح استرس اسمزی در سویه‌های مقاوم *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure 4. Estimated marginal means of reactive oxygen species (ROS units) based on the interaction between antibiotic type and osmotic stress levels in resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

فعال‌سازی دفاع آنتی‌اکسیدانی

در ارزیابی تغییرات بیان پروتئین‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی، باندهایی با وزن مولکولی تقریبی ۳۴ کیلو دالتون، ۵۵ کیلو دالتون و ۲۱ کیلو دالتون به ترتیب برای OxyR، KatA و SodB شناسایی شدند. تغییرات نسبی شدت این باندها در پاسخ به تیمارهای ترکیبی مشاهده شد و مقادیر عددی آن در جدول ۴ ارائه شده است.

در شرایط تیماری منتخب، افزایش شدت باند OxyR تا ۲۱۰ درصد ثبت شد. در همین شرایط، شدت باند KatA و SodB به ترتیب تا ۱۸۵ و ۱۹۵ درصد افزایش یافت. سویه‌های بالینی MDR در مقایسه با سویه مرجع ATCC 27853 مقادیر بالاتری از تغییرات نسبی شدت باندها را نشان دادند. در مقابل، باند کمکی AhpC با وزن مولکولی تقریبی ۱۵ کیلو دالتون در برخی شرایط با کاهش شدت تا ۶۵ درصد همراه بود.

نتایج تحلیل واریانس چندمتغیره برای OxyR نشان داد که غلظت فلوروکینولون و شدت تنش اسمزی اثرات اصلی معنی‌داری بر میزان بیان این پروتئین داشتند. مقدار آماره F برای عامل غلظت برابر با ۱۰۸۵۰۷۸ و برای عامل تنش اسمزی برابر با ۶۱۴۰۷۶ به دست آمد و هر دو اثر از نظر آماری معنی‌دار بودند. مقدار η^2 جزئی برای غلظت ۰۰۹۲۳ و برای تنش اسمزی ۰۰۸۷۲ محاسبه شد. تعاملات دوعاملی از نظر آماری معنی‌دار نبودند. در مقابل، تعامل سه‌عاملی غلظت، تنش اسمزی و سویه معنی‌دار گزارش شد و مقدار F برابر با ۲۰۸۱ و مقدار p برابر با ۰۰۴۰ به دست آمد. اثرات اصلی سویه و نوع آنتی‌بیوتیک معنی‌دار نبودند.

این مقادیر بالای F و η^2 نشان‌دهنده آن است که تغییرات ایجادشده توسط غلظت فلوروکینولون و تنش اسمزی به مراتب بیشتر از تغییرات درون‌گروهی بوده و اندازه اثر بسیار بزرگی بر بیان پروتئین OxyR دارند. ($p < 0.001$) این الگوی آماری مشابه برای KatA و SodB نیز مشاهده شد که تأکیدکننده نقش کلیدی این عوامل در تنظیم پاسخ‌های دفاع اکسیداتیو می‌باشد.

برای KatA، اثرات اصلی غلظت فلوروکینولون و تنش اسمزی از نظر آماری معنی‌دار بودند. مقدار F برای عامل غلظت برابر با ۹۷۷۰۸۵۵ و برای تنش اسمزی برابر با ۶۲۴۰۱۷۰ محاسبه شد و هر دو اثر دارای مقدار p کمتر از ۰۰۰۱ بودند. مقادیر η^2 جزئی به ترتیب ۰۰۹۱۶ و ۰۰۸۷۴ به دست آمد. هیچ‌یک از تعاملات دوعاملی یا سه‌عاملی برای KatA معنی‌دار گزارش نشد.

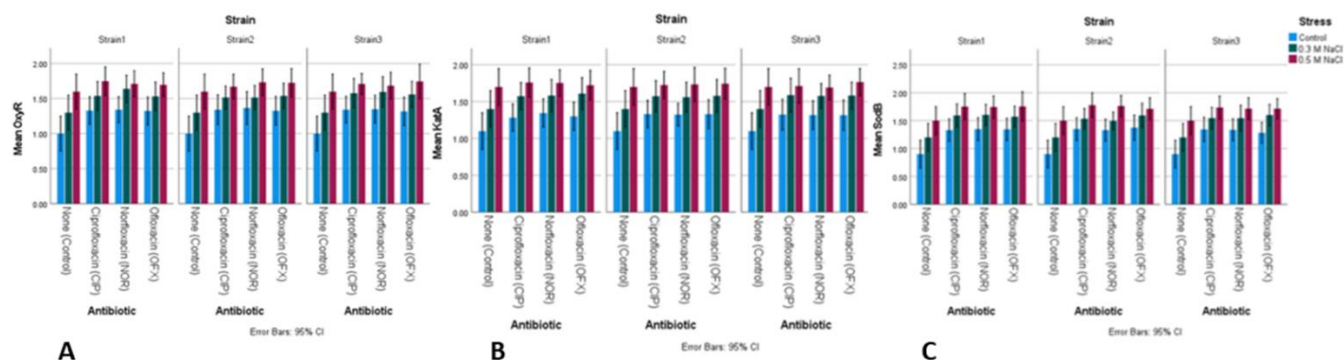
الگوی آماری مشابهی برای SodB مشاهده شد. اثرات اصلی غلظت فلوروکینولون و تنش اسمزی از نظر آماری معنی‌دار بودند. مقدار F برای عامل غلظت برابر با ۱۱۳۶۰۲۳۶ و برای تنش اسمزی برابر با ۶۵۱۰۵۶۶ محاسبه شد و مقادیر η^2 جزئی به ترتیب ۰۰۹۲۷ و ۰۰۸۷۹ به دست آمد. تعاملات دوعاملی و سه‌عاملی برای SodB معنی‌دار نبودند (جدول ۵ و شکل ۵).

جدول ۵: باندهای شاخص پروتئینی در SDS-PAGE و تغییرات نسبی شدت آن‌ها تحت تیمارهای منتخب

Table 5. Protein indicator bands in SDS-PAGE and relative changes in their intensity under selected treatments

Molecular weight (kDa)	Protein	Treatment condition	Relative change in intensity (%)	Strain
34	OxyR	½ MIC CIP + 0.3 M NaCl	+145	MDR-Strain1
34	OxyR	1× MIC NOR + 0.5 M NaCl	+210	MDR-Strain2

Molecular weight (kDa)	Protein	Treatment condition	Relative change in intensity (%)	Strain
55	KatA	$\frac{1}{4}$ MIC OFX + no stress	+120	MDR-Strain13
55	KatA	1× MIC CIP + 0.5 M NaCl	+185	MDR-Strain1
21	SodB	$\frac{1}{2}$ MIC NOR + 0.3 M NaCl	+135	MDR-Strain12
21	SodB	1× MIC OFX + 0.5 M NaCl	+195	MDR-Strain3
15	AhpC (auxiliary)	1× MIC CIP + 0.3 M NaCl	-65	ATCC 27853



شکل ۵- بیان پروتئین‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی OxyR، KatA و SodB در سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* تحت غلظت‌های مختلف فلوروکینولون و سطوح تنش اسمزی (میانگین $\pm$ فاصله اطمینان ۹۵٪)

Figure 5- Expression of antioxidant defense proteins OxyR, KatA, and SodB in *Pseudomonas aeruginosa* strains under different fluoroquinolone concentrations and osmotic stress levels (mean $\pm$ 95% confidence interval).

تنوع وابسته به سویه

تنوع وابسته به سویه در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط شدید مشاهده شد و مقادیر عددی آن در جدول ۵ ارائه شده است. در شدیدترین تیمار شامل ۱ MIC $\times$ سیپروفلوکساسین همراه با ۰.۵ مولار NaCl، سویه‌های بالینی MDR فعالیت بالاتری

از سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به سویه مرجع ATCC 27853 نشان دادند. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سویه‌های MDR برابر با 52.33 ± 2.08 و در سویه مرجع برابر با 36.25 ± 1.16 گزارش شد و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود. فعالیت کاتالاز در سویه‌های MDR برابر با 53.41 ± 2.33 و در سویه مرجع برابر با 49.68 ± 1.08 اندازه‌گیری شد و اختلاف معنی‌دار بود. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز نیز در سویه‌های MDR مقدار 25.90 ± 1.55 و در سویه مرجع مقدار 20.88 ± 0.79 را نشان داد و تفاوت معنی‌دار ثبت شد.

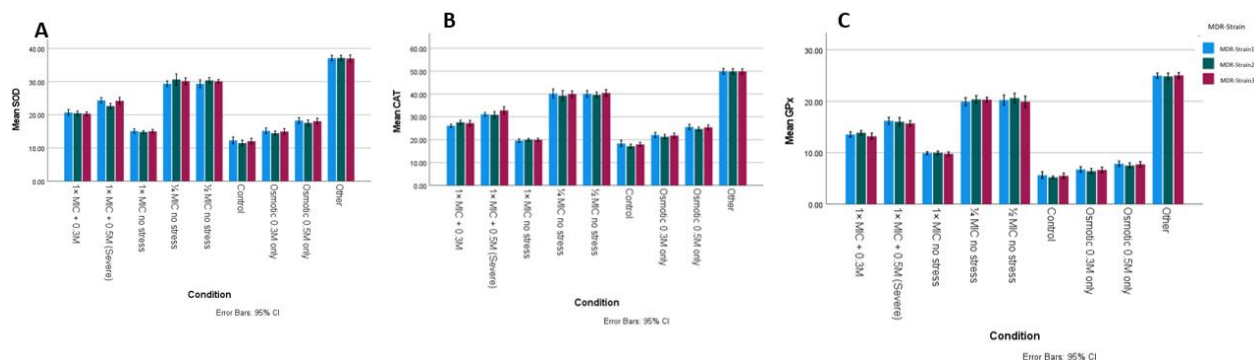
در برخی شرایط با شدت کمتر، اختلاف فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بین سویه‌ها همچنان مشاهده شد. در تیمارهای $1/4$ MIC و $1/2$ MIC بدون اعمال تنش اسمزی، فعالیت این آنزیم در سویه‌های MDR به‌طور معنی‌داری بالاتر از سویه مرجع گزارش شد. در مقابل، برای سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، اختلاف معنی‌دار عمدتاً در تیمارهای با شدت بالاتر مشاهده شد.

در سطح پروتئینی نیز تفاوت وابسته به سویه ثبت شد و داده‌های مربوطه در جدول ۵ ارائه شده است. بیان OxyR در شرایط شدید شامل $1 \times \text{MIC}$ همراه با 0.5 M NaCl در سویه‌های MDR مقدار 20.2 ± 0.10 و در سویه مرجع مقدار 10.82 ± 0.08 را نشان داد و اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود. برای KatA و SodB نیز در شدیدترین شرایط تیماری، مقادیر بیان در سویه‌های MDR به‌طور معنی‌داری بالاتر از سویه ATCC 27853 گزارش شد. اختلاف در بیان OxyR از غلظت‌های متوسط $1/2 \text{ MIC}$ قابل مشاهده بود، در حالی که تفاوت در KatA و SodB عمدتاً در تیمارهای شدیدتر ثبت شد (جدول ۶ و شکل ۶).

جدول ۶: مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی میان سویه‌های MDR و سویه مرجع ATCC 27853 در شرایط منتخب

Table 6. Comparison of antioxidant enzyme activities between MDR strains and the reference strain ATCC 27853 under selected conditions

Enzyme	Treatment	MDR strains	ATCC 27853	p-value
SOD	$1 \times \text{MIC} + 0.5 \text{ M NaCl}$	52.33 ± 2.08	36.25 ± 1.16	0.002
SOD	$1 \times \text{MIC}$ without stress	38.92 ± 1.48	30.56 ± 1.63	0.039
CAT	$1 \times \text{MIC} + 0.5 \text{ M NaCl}$	53.41 ± 2.33	49.68 ± 1.08	0.026
CAT	$1/4 \text{ MIC}$ without stress	40.76 ± 1.04	30.91 ± 2.08	0.031
GPx	$1 \times \text{MIC} + 0.5 \text{ M NaCl}$	25.90 ± 1.55	23.82 ± 0.85	0.033
GPx	$1/4 \text{ MIC}$ without stress	20.88 ± 0.79	13.36 ± 0.83	0.019



شکل ۶: مقایسه فعالیت آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز بین سویه‌های بالینی مقاوم به چند دارو (MDR) و سویه مرجع

Figure 6. Comparison of the activity of antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase between multidrug-resistant (MDR) clinical strains and the reference strain.

مقایسه فعالیت آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) بین سه سویه بالینی مقاوم به چند دارو (MDR-Strain 1، MDR-Strain 2 و MDR-Strain 3) که همگی مقاومت همزمان به سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و افلوکساسین را نشان دادند، و سویه مرجع ATCC 27853 تحت شدیدترین شرایط تیماری (1 × MIC × سیپروفلوکساسین همراه با ۰٫۵ مولار NaCl) هر ستون نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار مستقل می‌باشد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های زیرمهراری (sub-MIC) فلوروکینولون‌ها، به‌ویژه در حضور تنش اسمزی همزمان، موجب افزایش معنی‌دار MIC و القای تحمل تطبیقی و کاهش حساسیت فنوتیپی در سویه‌های چنددارویی *P. aeruginosa* می‌شوند. این پدیده احتمالاً می‌تواند با فعال شدن پاسخ‌های دفاعی عمومی همراه باشد؛ پاسخ‌هایی که بر اساس مطالعات پیشین شامل تغییر در تنظیم سامانه‌های افلوکس چنددارویی مانند MexAB-OprM و MexEF-OprN، تغییرات نفوذپذیری غشای خارجی و فعال شدن مسیرهای مرتبط با بقا و ترمیم DNA گزارش شده‌اند (۳۹، ۲۱، ۴۰)، با این حال، این سازوکارها در مطالعه حاضر به‌صورت مستقیم اندازه‌گیری نشده‌اند. ترکیب تنش اسمزی و تیمار دارویی اثر هم‌افزایی مشخصی بر افزایش MIC داشت. افزایش شوری محیط از طریق تغییر ترکیب لیپیدی ساکارید غشای خارجی، تجمع اسمولیت‌های سازگار و فعال‌سازی تنظیم‌کننده‌های پاسخ استرس نظیر RpoS، احتمالاً ورود فلوروکینولون‌ها به سلول را محدود کرده و کارایی آن‌ها را کاهش می‌دهد (۲۹، ۴۱، ۴۲). این سازوکارها توضیح می‌دهند که چرا بیشترین افزایش تحمل تطبیقی و کاهش حساسیت فنوتیپی در شرایط ۲/۱ MIC همراه با ۰٫۵ مولار NaCl مشاهده شد.

شایان توجه است که افزایش MIC در شرایط تنش ترکیبی با کاهش همزمان رشد باکتریایی همراه بود؛ به‌گونه‌ای که میانگین شاخص رشد از ۰٫۵۲۴۰ در شرایط بدون تنش به ۰٫۴۷۸۵ در حضور ۰٫۵ مولار NaCl کاهش یافت (جدول ۳). این همبستگی معکوس نشان‌دهنده آن است که باکتریها در پاسخ به تنش ترکیبی، منابع متابولیکی خود را از چرخه تقسیم سلولی به سمت فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی (از جمله مسیر OxyR و آنزیم‌های آنتیاکسیدانی مانند SOD، CAT و GPx) هدایت می‌کنند.

در این چارچوب، کاهش رشد به عنوان هزینه متابولیکی تحمل آنتی‌بیوتیکی و افزایش MIC به عنوان نتیجه فیزیولوژیک این تغییر مسیر متابولیک تفسیر می‌شود. این پدیده با مفهوم تحمل تطبیقی آنتی‌بیوتیکی (Adaptive Antibiotic Tolerance) مطابقت دارد که در آن افزایش MIC لزوماً ناشی از تغییرات ژنتیکی پایدار نیست، بلکه حاصل بازآرایی فیزیولوژیک وابسته به استرس می‌باشد. این تفسیر با یافته‌های Stewart و همکاران (۲۰۱۵) و Andersson و Hughes (۲۰۱۴) مبنی بر نقش پاسخهای استرس در القای تحمل آنتی‌بیوتیکی همخوانی دارد (۲۱، ۱۷).

در مقابل، پیش تیمار با غلظت کامل برخلاف تیمارهای زیرمهار، با کاهش MIC در ارزیابی مجدد همراه بود. این الگو احتمالاً ناشی از اثر انتخاب کشنده است که طی آن زیرجمعیت‌های متحمل حذف شده و جمعیت با حساسیت بالاتر باقی می‌ماند؛ افزون بر این، کاهش موقت فعالیت پمپ‌های افلوکس و افت استرس اکسیداتیو درون سلولی نیز می‌تواند در این روند نقش داشته باشد (۴۳، ۴۴). این یافته بر اهمیت پرمیز از مواجهه‌های پایدار sub-MIC در محیط‌های بالینی تأکید می‌کند. افزایش MIC تحت تأثیر تنش ترکیبی اسمزی و تیمار زیرمهار، به‌ویژه در نورفلوکساسین، نشان می‌دهد که محیط‌های هیپراسموتیک مانند ریه بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک و زخم‌های مزمن می‌توانند به‌طور قابل توجهی کارایی فلوروکینولون‌ها را کاهش دهند. در شدیدترین شرایط تنشی، یعنی سطح MIC ۱/۲ همراه با ۰.۵ مولار کلرید سدیم، مقدار MIC نورفلوکساسین برابر با $9.87 \pm 1.94 \times 10^8$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که این مقدار برای سیپروفلوکساسین $1.59 \times 10^8 \pm 8.34$ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. این اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد که سیپروفلوکساسین در چنین شرایط بالینی ممکن است گزینه درمانی مؤثرتری باشد.

نتایج به‌دست‌آمده با مطالعات پیشین نیز همخوانی دارد و بیانگر نقش مهم سامانه‌های افلوکس وابسته به استرس اسمزی در کاهش حساسیت باکتری به نورفلوکساسین است. بر این اساس، فعال شدن این سامانه‌ها در شرایط تنش اسمزی می‌تواند یکی از عوامل اصلی افزایش تحمل باکتریایی و کاهش اثربخشی فلوروکینولون‌ها باشد (۴۵، ۴۶). از منظر بالینی، این موضوع نشان می‌دهد که در محیط‌های با شوری بالا، از جمله عفونت‌های مرتبط با فیبروز کیستیک یا زخم‌های مزمن، نورفلوکساسین ممکن است گزینه درمانی کم‌اثربتری نسبت به سیپروفلوکساسین باشد. بیشترین القای مقاومت در شرایط MIC ۱/۲ همراه با ۰.۵ مولار NaCl مشاهده شد؛ از این رو، این تیمار به عنوان شدیدترین شرایط ترکیبی برای بررسی پاسخ‌های دفاعی و آنتی‌اکسیدانی در آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید.

نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که افزایش تدریجی تنش اسمزی ناشی از NaCl به‌طور معنی‌داری حساسیت پایه‌ای سوبه‌های *P. aeruginosa* به فلوروکینولون‌ها را کاهش می‌دهد. کاهش قطر هاله عدم رشد بیانگر آن است که حتی در غیاب پیش تیمار دارویی، تنش اسمزی به تنهایی قادر است خط پایه حساسیت آنتی‌بیوتیکی را جابه‌جا کند. تکرار این الگو در تمامی سوبه‌ها و برای هر سه فلوروکینولون، نشان‌دهنده فعال‌سازی پاسخ‌های تطبیقی عمومی وابسته به تنش اسمزی است. از منظر مکانیزمی، کاهش حساسیت مشاهده‌شده در شرایط تنش اسمزی ممکن است با تغییرات ساختاری-عملکردی غشای خارجی مرتبط باشد؛ زیرا مطالعات پیشین نشان داده‌اند که شرایط هیپراسموتیک می‌توانند بر نفوذپذیری غشا، تنظیم پورین‌ها و فعالیت سامانه‌های دفع فعال تأثیر بگذارند. اگرچه این تغییرات در مطالعه حاضر به‌طور مستقیم بررسی نشدند، اما می‌توانند به عنوان توضیح احتمالی برای الگوی فنوتیپی مشاهده‌شده مطرح باشند. افزایش NaCl می‌تواند با سرکوب بیان پورین‌هایی مانند OprD و هم‌زمان القای پمپ‌های افلوکس وابسته به خانواده RND نظیر MexAB-OprM از طریق فعال‌سازی شبکه‌های تنظیمی استرس (iModulons)، دفع فعال فلوروکینولون‌ها را افزایش دهد. این تغییرات، همراه با بازآرایی لیپولی ساکاریدهای غشایی و افزایش هیدروفوبیسیته غشا، موجب کاهش مؤثر ورود دارو و افت حساسیت فنوتیپی می‌شود (۴۷، ۴۸). افزون بر این، تنظیم تعادل یونی در شرایط هیپراسموتیک، از جمله تجمع K^+ و دفع Na^+ از طریق سیستم‌هایی مانند Trk، می‌تواند به پایداری این فنوتیپ مقاوم کمک کند. تفاوت‌های

مشاهده شده میان سویه‌ها، از جمله حساسیت بالاتر سویه ۲ به سیپروفلوکساسین در مقایسه با مقاومت نسبی سویه ۳ به نروفلوکساسین، احتمالاً ناشی از تنوع ژنتیکی در ژن‌های تنظیمی پمپ‌های افلوکس مانند *mexR* و *nalC* و سطح پایهای بیان پورین‌ها است. شواهد اخیر نشان می‌دهد که این تفاوت‌ها تحت شرایط استرس می‌توانند از طریق تنظیمات اپی‌ژنتیکی، از جمله تغییر الگوهای متیلاسیون DNA، تشدید شده و به تفاوت‌های سویه‌اختصاصی در پاسخ‌های تحمل و سازگاری منجر شوند (۴۹). پس از اعمال تیمارهای زیرکشنده، کاهش بیشتر قطر هاله عدم رشد مشاهده شد که نشان‌دهنده تشدید پاسخ تطبیقی در حضور فشار انتخابی دارویی است. غلظت‌های sub-MIC فلوروکینولون‌ها در مطالعات پیشین با تغییر در مسیرهای پاسخ به تنش، از جمله پاسخ SOS و تنظیم سامانه‌های افلوکس RND، مرتبط دانسته شده‌اند (۴۸)، بنابراین، افزایش مقاومت فنوتیپی مشاهده شده در شرایط حاضر ممکن است تا حدی با چنین سازوکارهایی مرتبط باشد، هرچند بررسی مستقیم بیان یا فعالیت پمپ‌های افلوکس در این مطالعه انجام نشده است. ترکیب این اثر با کاهش نفوذپذیری غشایی ناشی از تنش اسمزی، توضیح‌دهنده کاهش بارز حساسیت فنوتیپی در شرایط sub-MIC همراه با NaCl است. یافته‌های حاضر با گزارش Stewart و همکاران (۲۰۱۵) هم‌خوانی دارد (۱۷) که نشان دادند تنش‌های محیطی از جمله شوری، از طریق هم‌پوشانی پاسخ‌های استرس عمومی با مسیرهای مقاومت اختصاصی، تحمل آنتی‌بیوتیکی *P. aeruginosa* را افزایش می‌دهند (۱۷). همچنین، نتایج Elabd و همکاران (۲۰۱۹) در محیط‌های پر نمک دریایی نشان داد که بازسازی غشایی و افزایش efflux می‌تواند به کاهش پایداری حساسیت به فلوروکینولون‌ها منجر شود؛ الگویی که در سویه‌های بالینی مطالعه حاضر نیز مشاهده شد (۵۰). تحلیل واریانس دوطرفه با مقدار η^2 بالا برای تنش اسمزی و معنی‌داری تعاملات فاکتوری ($p < 0.001$)، بر نقش محوری این عامل در تنظیم مقاومت پایه‌ای تأکید می‌کند. از منظر بالینی، این یافته‌ها بر ضرورت در نظر گرفتن شرایط محیطی، مانند شوری بالا در عفونت‌های ریوی بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، در تفسیر نتایج حساسیت‌سنجی و طراحی راهبردهای درمانی، از جمله استفاده هم‌زمان از مهارکننده‌های efflux، تأکید دارد.

نتایج تحلیل مساحت زیر منحنی رشد (AUC_{0-24h}) نشان داد که افزایش شدت تنش اسمزی موجب کاهش پیش‌رونده رشد *P. aeruginosa* می‌شود. میانگین شاخص رشد از ۰.۵۲۴۰ در شرایط بدون تنش به ۰.۴۷۸۵ در حضور ۰.۵ مولار NaCl کاهش یافت که معادل مهار ۸.۷٪ رشد کلی است. این اثر در سطح سویه‌ای ناهمگن بود؛ به‌طوری‌که MDR-Strain 1 بیشترین کاهش رشد را (از ۰.۵۴۳۲ به ۰.۴۴۶۵؛ کاهش ۱۸٪) و MDR-Strain 2 کمترین تغییر را نشان داد (از ۰.۵۲۲۱ به ۰.۴۹۵۵). تحلیل واریانس چهارطرفه اثر اصلی آنتی‌بیوتیک را معنی‌دار نشان داد و اوفلوکساسین کمترین مقادیر شاخص رشد را، به‌ویژه تحت تنش اسمزی شدید، القا کرد. همچنین، تعامل معنی‌دار سویه $\times$ آنتی‌بیوتیک ($p = 0.006$) بیانگر وابستگی پاسخ رشد به زمینه ژنتیکی سویه‌ها بود. اثرات اصلی سویه و زمان پیش‌تیمار به‌تنهایی معنی‌دار نبودند. کاهش چشمگیر رشد MDR-Strain 1 در حضور ۰.۵ مولار NaCl همراه با اوفلوکساسین ($p = 0.031$) نشان‌دهنده اثر هم‌افزای تنش اسمزی و فشار آنتی‌بیوتیکی است. این الگو احتمالاً ناشی از بار متابولیک ناشی از اختلال تعادل یونی و بازآرایی غشای خارجی است که ظرفیت رشد را محدود می‌کند و با گزارش‌های پیشین مبنی بر مهار رشد *P. aeruginosa* در محیط‌های هیپراسموتیک هم‌خوانی دارد (۵۱، ۵۲). در مجموع، تنش اسمزی به‌طور مستقل موجب مهار متوسط اما معنادار رشد می‌شود و در ترکیب با فلوروکینولون‌ها—به‌ویژه اوفلوکساسین—می‌تواند اثرات بازدارنده سویه‌وابسته بر زنده‌مانی *P. aeruginosa* اعمال کند.

تحلیل بیان پروتئین‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی نشان داد که OxyR، KatA و SodB به‌عنوان اجزای کلیدی سیستم دفاعی، به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر غلظت فلوروکینولون و شدت تنش اسمزی قرار دارند. در شرایط تیماری منتخب، شدت باند OxyR تا ۲۱۰ درصد افزایش یافت. باند KatA و SodB نیز به‌ترتیب تا ۱۸۵ و ۱۹۵ درصد افزایش نشان دادند، که حاکی از پاسخ قوی دفاع آنتی‌اکسیدانی سویه‌های MDR نسبت به ترکیب فلوروکینولون و استرس اسمزی است. سویه‌های بالینی MDR در مقایسه با سویه

مرجع ATCC 27853 پاسخ بالاتری داشتند، در حالی که باند کمکی AhpC در برخی شرایط تا ۶۵ درصد کاهش شدت را نشان داد، که احتمالاً بازتابی از تمرکز منابع سلولی بر سیستم‌های اصلی دفاعی است. تحلیل واریانس چندمتغیره نشان داد که اثرات اصلی غلظت فلوروکینولون و شدت تنش اسمزی بر بیان OxyR بسیار معنی‌دار بودند؛ به‌طوری‌که مقادیر F برابر با ۱۰۸۵،۷۸ و ۶۱۴،۷۶ و مقادیر η^2 جزئی برابر با ۰،۹۲۳ و ۰،۸۷۲ به دست آمد. تعاملات دوعاملی معنی‌دار نبودند، اما تعامل سه‌عاملی غلظت $\times$ تنش اسمزی $\times$ سویه معنی‌دار گزارش شد و مقدار p برابر با ۰،۰۴۰ بود. همچنین اثرات اصلی سویه و نوع آنتی‌بیوتیک معنی‌دار نبودند که نشان می‌دهد پاسخ OxyR عمدتاً تابع شدت استرس و غلظت دارو است.

الگوی مشابهی برای KatA مشاهده شد؛ به‌طوری‌که غلظت دارو و شدت تنش اسمزی اثرات بسیار معنی‌داری نشان دادند. مقادیر F برابر با ۹۷۷،۸۵۵ و ۶۲۴،۱۷۰ و مقادیر η^2 جزئی برابر با ۰،۹۱۶ و ۰،۸۷۴ بودند و مقدار p کمتر از ۰،۰۰۱ گزارش شد. با این حال، هیچ‌یک از تعاملات معنی‌دار نبودند.

همچنین SodB حساسیت بالایی نسبت به غلظت دارو و تنش اسمزی نشان داد؛ به‌طوری‌که مقادیر F برابر با ۱۱۳۶،۲۳۶ و ۶۵۱،۵۶۶ و مقادیر η^2 جزئی برابر با ۰،۹۲۷ و ۰،۸۷۹ به دست آمد و پاسخ آن مستقل از سویه و نوع آنتی‌بیوتیک بود.

این یافته با نقش SodB در تبدیل سوپراکسید به H_2O_2 کمتر سمی همخوانی دارد، جایی که آنتی‌بیوتیک‌ها تولید ROS را افزایش داده و استرس اسمزی با تغییر پتانسیل غشایی تولید O_2^- را تشدید می‌کند و هر دو مسیر SodB را از طریق سیگنالینگ OxyR فعال می‌سازند. نتایج حاضر با مطالعات قبلی همخوانی دارد؛ افزایش بیان OxyR و KatA تحت شرایط استرس اکسیداتیو و دارویی مشابه یافته‌های Mohamed و همکاران (۲۰۲۰) و Shabunin و همکاران (۲۰۲۰) است (۵۳، ۵۴). همچنین، الگوی افزایش SodB در سویه‌های MDR با نتایج Nguyen و همکاران (۲۰۲۳) مطابقت دارد (۵۵). تفاوت تحقیق حاضر در تمرکز بر تعامل هم‌افزای فلوروکینولون و استرس اسمزی و تحلیل چندسویه آن است. در مجموع، داده‌ها نشان می‌دهند که فعال‌سازی OxyR، KatA و SodB به‌طور هم‌زمان توسط فلوروکینولون و تنش اسمزی صورت می‌گیرد و این پروتئین‌ها نقش کلیدی در مقاومت تطبیقی سویه‌های MDR ایفا می‌کنند. عدم تعاملات پیچیده بین عوامل، بر سادگی نسبی مسیرهای دفاعی در این سویه‌ها تأکید دارد و SodB و KatA را به‌عنوان اهداف بالقوه برای مهار ترکیبی دارویی-محیطی برجسته می‌کند.

در ادامه، تنوع وابسته به سویه در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. در شدیدترین تیمار شامل $MIC \times 1$ سیپروفلوکساسین همراه با ۰،۵ مولار NaCl، سویه‌های بالینی MDR فعالیت بالاتری از SOD، CAT و GPx نسبت به سویه مرجع نشان دادند.

فعالیت SOD در سویه‌های MDR برابر با $52,33 \pm 2,08$ و در سویه مرجع برابر با $36,25 \pm 1,16$ بود و اختلاف مشاهده‌شده معنی‌دار گزارش شد، به‌طوری‌که مقدار p برابر با ۰،۰۰۲ بود. فعالیت CAT در سویه‌های MDR و سویه مرجع به‌ترتیب برابر با $53,41 \pm 2,33$ و $49,68 \pm 1,08$ بود و مقدار p برابر با ۰،۰۲۶ گزارش شد. همچنین فعالیت GPx در سویه‌های MDR و سویه مرجع به‌ترتیب $25,9 \pm 1,55$ و $23,82 \pm 0,85$ بود و مقدار p برابر با ۰،۰۳۳ به دست آمد.

این الگوی وابستگی سویه‌ای در تیمارهای با شدت کمتر نیز به‌صورت انتخابی مشاهده شد. در حالی که برای SOD و CAT تفاوت معنی‌دار بین سویه‌ها عمدتاً به شرایط با فشار ترکیبی بالا محدود بود، فعالیت GPx حتی در تیمارهای $1/4$ و $MIC \times 1/2$ بدون اعمال تنش اسمزی نیز در سویه‌های MDR به‌طور معنی‌داری بالاتر باقی ماند به عنوان مثال در تیمار $MIC \times 1/4$ بدون تنش: $20,88 \pm 0,79$ در MDR در برابر $13,36 \pm 0,83$ در ATCC، $p = 0.019$ این مشاهده نشان می‌دهد که GPx نسبت به سایر اجزای سیستم آنتی‌اکسیدانی حساسیت بیشتری به زمینه ژنتیکی سویه دارد و می‌تواند در مراحل اولیه مواجهه با استرس دارویی، نقش تنظیمی برجسته‌تری ایفا کند. چنین الگویی با گزارش Shabunin و همکاران (۲۰۲۰) درباره افزایش تنظیم‌پذیر آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی در سویه‌های مقاوم *E. coli* تحت فشار آنتی‌بیوتیکی هم‌خوانی دارد (۵۴). در سطح پروتئینی نیز تفاوت وابسته به سویه تأیید شد. بیان OxyR در شرایط شدید (MIC $\times$ همراه با ۰٫۵ M NaCl) در سویه‌های MDR برابر با $2,0 \pm 0,1$ و در سویه مرجع $1,82 \pm 0,08$ گزارش شد که اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد. تفاوت در بیان OxyR از غلظت‌های متوسط ($1/2$ MIC) قابل مشاهده بود، در حالی که اختلاف در KatA و SodB عمدتاً در تیمارهای شدیدتر ثبت شد. این یافته با نقش OxyR به‌عنوان تنظیم‌کننده بالادستی پاسخ به ROS سازگار است و نشان می‌دهد که سویه‌های MDR ظرفیت بالاتری برای فعال‌سازی زودهنگام مسیرهای دفاعی اکسیداتیو دارند (۴۹). در مجموع، اگرچه SOD به‌عنوان یک پاسخ عمومی و نسبتاً مستقل از سویه عمل می‌کند، تفاوت‌های سویه‌ای در شرایط بالینی چنداسترسی عمدتاً از طریق اجزای تنظیم‌پذیرتر سیستم آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه GPx و تا حدی CAT، بروز می‌یابد. این تنوع عملکردی می‌تواند یکی از پایه‌های اصلی سازگاری و بقای سویه‌های MDR در محیط‌های با فشار هم‌زمان دارویی و اسمزی باشد و نشان می‌دهد که پاسخ آنتی‌اکسیدانی در *P. aeruginosa* مقاوم، فراتر از یک مکانیسم یکنواخت، دارای لایه‌های تنظیمی وابسته به سویه است؛ موضوعی که در ادبیات پیشین کمتر به آن پرداخته شده است.

یکی از محدودیت‌های مهم این مطالعه، تعداد نسبتاً محدود سویه‌های مورد بررسی بود. پژوهش حاضر بر سه سویه بالینی مقاوم به چند دارو (MDR) و یک سویه مرجع استاندارد ATCC 27853 متمرکز بود؛ از این‌رو نتایج به‌دست‌آمده لزوماً بیانگر تمامی تنوع ژنتیکی، فنوتیپی و سازوکارهای تطبیقی موجود در جمعیت گسترده سویه‌های بالینی *P. aeruginosa* نیست. از آنجا که ایزوله‌های بالینی این باکتری می‌توانند از نظر الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تنظیم مسیرهای پاسخ به تنش، فعالیت سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های ویروالانس تفاوت‌های قابل توجهی داشته باشند، تعمیم مستقیم یافته‌های حاضر به تمامی سویه‌های بالینی باید با احتیاط انجام شود.

با این حال، هدف اصلی این مطالعه بررسی مکانیزم‌های فیزیولوژیک و مولکولی مرتبط با بازآرایی پاسخ استرس اکسیداتیو تحت تنش ترکیبی اسمزی و فلوروکینولونی بود و نتایج حاصل توانست الگوهای سازگار و تکرارپذیری از پاسخ‌های تطبیقی را در سویه‌های بررسی شده نشان دهد. با وجود این، انجام مطالعات آینده با تعداد بیشتری از ایزوله‌های بالینی، نمونه‌گیری از مراکز درمانی مختلف و بهره‌گیری از سویه‌هایی با پیشینه ژنتیکی متنوع، برای تأیید، اعتبارسنجی و افزایش قابلیت تعمیم نتایج ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر محدودیت تعداد سویه‌های مورد بررسی، باید توجه داشت که برخی سازوکارهای مولکولی پیشنهادی برای توضیح افزایش تحمل تطبیقی و کاهش حساسیت فنوتیپی در این مطالعه، از جمله تغییر فعالیت سامانه‌های افلوکس، تغییر نفوذپذیری غشای خارجی و تنظیم تغییرات ساختاری مرتبط با غشا، به‌طور مستقیم ارزیابی نشدند. همچنین اگرچه تغییرات سطح پروتئین‌های مرتبط با پاسخ اکسیداتیو شامل OxyR، KatA و SodB بررسی شد، اما فعال‌شدن تنظیمی این مسیر در سطح رونویسی و بیان ژن‌های هدف پایین‌دست OxyR با روش‌هایی مانند RT-qPCR مورد ارزیابی قرار نگرفت.

بنابراین، مکانیسم‌های ذکرشده در مطالعه حاضر به‌عنوان سازوکارهای احتمالی و تفسیرکننده الگوی مشاهده‌شده در تغییرات فنوتیپی، اکسیداتیو و پروتئینی مطرح می‌شوند و نه به‌عنوان یافته‌های مستقیم. مطالعات آینده با بررسی بیان ژن‌های مرتبط با سامانه‌های افلوکس (مانند mexAB-oprM و mexEF-oprN)، ژن‌های هدف مسیر OxyR و همچنین ارزیابی مستقیم ویژگی‌های غشایی می‌توانند درک دقیق‌تری از مکانیسم‌های مولکولی سازگاری *P. aeruginosa* تحت تنش ترکیبی اسمزی و فلوروکینولونی فراهم کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه به‌طور جامع نشان داد که مواجهه *P. aeruginosa* با غلظت‌های زیرمهار فلوروکینولون‌ها در حضور استرس اسمزی، یک پاسخ تطبیقی چندلایه و مؤثر را القا می‌کند که به‌طور معنی‌داری حساسیت فنوتیپی، الگوی رشد و سامانه‌های دفاع

اکسیداتیو باکتری را تغییر می‌دهد. کاهش قطر هاله عدم رشد و افزایش MIC در شرایط MIC-sub همراه با NaCl، بیانگر افزایش تحمل تطبیقی و کاهش حساسیت فنوتیپی تحت فشارهای محیطی است؛ پدیده‌ای که عمدتاً از طریق کاهش نفوذپذیری غشایی و افزایش efflux توضیح داده می‌شود. در مقابل، اعمال غلظت کامل MIC با حذف انتخابی جمعیت‌های فوق‌مقاوم، کاهش موقتی MIC را رقم زد که اهمیت پرهیز از مواجهه‌های پایدار زیرکشنده را در محیط‌های بالینی برجسته می‌سازد.

تحلیل رشد نشان داد که تنش اسمزی به صورت وابسته به شدت، رشد باکتری را مهار می‌کند، اما این مهار در حضور فلوروکینولون‌ها و بسته به سویه تشدید می‌شود؛ به طوری که سویه‌های MDR علی‌رغم کاهش رشد، توان بقای بالاتری را حفظ می‌کنند. نکته قابل توجه آن است که افزایش MIC و کاهش حساسیت فنوتیپی مشاهده شده در این مطالعه لزوماً به معنای افزایش مقاومت ژنتیکی پایدار نیست. در واقع، کاهش همزمان رشد باکتریایی در شرایط تنش اسمزی نشان می‌دهد که سلول‌ها با وجود محدود شدن ظرفیت تکثیر، توانایی بیشتری برای تحمل فشار آنتی‌بیوتیکی پیدا کرده‌اند. چنین الگویی بیشتر با مفهوم «تحمل تطبیقی آنتی‌بیوتیکی» (Adaptive Antibiotic Tolerance) مطابقت دارد تا مقاومت کلاسیک آنتی‌بیوتیکی. در این وضعیت، باکتری از طریق بازآرایی مسیرهای فیزیولوژیک و فعال‌سازی سامانه‌های حفاظتی، از جمله پاسخ‌های دفاع اکسیداتیو، بقای خود را در شرایط تنش حفظ می‌کند؛ هرچند این سازگاری با هزینه متابولیکی و کاهش نرخ رشد همراه است. بنابراین، افزایش MIC در کنار مهار رشد را می‌توان به عنوان نشانه‌ای از افزایش تحمل سلولی تحت تنش ترکیبی اسمزی-آنتی‌بیوتیکی تفسیر کرد، نه لزوماً ایجاد مقاومت پایدار و اثری نسبت به فلوروکینولون‌ها.

در سطح مولکولی، افزایش معنی‌دار بیان OxyR، KatA و SodB و فعالیت آنزیم‌های متناظر، نشان‌دهنده فعال‌سازی گسترده سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول است. در این میان، SodB قوی‌ترین و یکنواخت‌ترین پاسخ را نشان داد و مستقل از نوع آنتی‌بیوتیک و تفاوت‌های سویه‌ای، به عنوان مکانیسم دفاعی عمومی و سریع عمل کرد. در مقابل، CAT و به ویژه GPx الگوهای تنظیم‌پذیرتر و وابسته به سویه از خود نشان دادند که در شرایط شدید، به تقویت بقای سویه‌های MDR منجر می‌شود.

تفاوت‌های وابسته به سویه، که عمدتاً در شرایط تنش ترکیبی شدید آشکار شدند، نشان می‌دهد که سویه‌های بالینی MDR از ظرفیت بالاتری برای فعال‌سازی پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم مسیرهای دفاعی برخوردارند؛ موضوعی که می‌تواند مبنای پدیده تطابق متقاطع (cross-adaptation) در محیط‌های بالینی چنداسترسی باشد. به طور کلی، این یافته‌ها تأکید می‌کنند که مقاومت فلوروکینولونی در *P. aeruginosa* صرفاً نتیجه فشار دارویی نیست، بلکه حاصل برهم‌کنش پیچیده عوامل محیطی و پاسخ‌های تطبیقی باکتری است. از این رو، در نظر گرفتن شرایط اسمزی و اجتناب از غلظت‌های زیرمهار پایدار، در کنار هدف‌گیری مسیرهای دفاع اکسیداتیو، می‌تواند در طراحی راهبردهای درمانی مؤثرتر علیه سویه‌های MDR نقش کلیدی ایفا کند.

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تنش اسمزی می‌تواند اثرات غلظت‌های زیرمهار فلوروکینولون‌ها را تشدید کرده و از طریق فعال‌سازی مسیرهای دفاع اکسیداتیو، به افزایش تحمل آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های MDR منجر شود. این نتایج اهمیت در نظر گرفتن شرایط محیطی را در تفسیر حساسیت آنتی‌بیوتیکی و طراحی راهبردهای درمانی علیه *P. aeruginosa* برجسته می‌سازد. با این حال، با توجه به تعداد محدود سویه‌های مورد بررسی، تأیید نهایی این یافته‌ها مستلزم انجام مطالعات گسترده‌تر با مجموعه‌های بزرگ‌تر و متنوع‌تر از ایزوله‌های بالینی *P. aeruginosa* است.

Reference

- (1) Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019; 37(1): 177-192.

- (2) Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022; 7(1): 199.
- (3) Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*. 2020; 166(1): 30-33.
- (4) Tohidpour A, Najar Peerayeh S, Najafi S. Detection of DNA gyrase mutation and multidrug efflux pumps hyperactivity in ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013; 1(1): 1-7.
- (5) Pasca MR, Dalla Valle C, De Jesus Lopes Ribeiro AL, Buroni S, Papaleo MC, Bazzini S, et al. Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance clinical isolates. *Microbial Drug Resistance*. 2012; 18(1): 23-32.
- (6) Capita R, Vicente-Velasco M, Rodríguez-Melcón C, García-Fernández C, Carballo J, Alonso-Calleja C. Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 15905.
- (7) Stanton IC, Murray AK, Zhang L, Snape J, Gaze WH. Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration. *Communications Biology*. 2020; 3(1): 467.
- (8) Dolzani L, Milan A, Scocchi M, Lagatolla C, Bressan R, Benincasa M. Sub-MIC effects of a proline-rich antibacterial peptide on clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*. 2019; 68(8): 1253-1265.
- (9) Krämer R. Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *The Chemical Record*. 2010; 10(4): 217-229.
- (10) Williams HD, Behrends V, Bundy JG, Ryall B, Zlosnik JE. Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: do population shifts caused by the osmotic sensitivity of infecting bacteria explain the effectiveness of this treatment? *Frontiers in Microbiology*. 2010; 1: 120.
- (11) Pemmaraju SC, Padmapriya K, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. Impact of oxidative and osmotic stresses on *Candida albicans* biofilm formation. *Biofouling*. 2016; 32(8): 897-909.
- (12) Utratna M, Shaw I, Starr E, O'Byrne CP. Rapid, transient, and proportional activation of σ_B in response to osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011; 77(21): 7841-7845.
- (13) Vaishampayan A, Grohmann E. Antimicrobials functioning through ROS-mediated mechanisms: current insights. *Microorganisms*. 2021; 10(1): 61.
- (14) Al-Horani RA. A narrative review of exercise-induced oxidative stress: oxidative DNA damage underlined. *The Open Sports Sciences Journal*. 2022; 15(1).
- (15) Choi HJ, Yoo JS, Jeong YK, Joo WH. Involvement of antioxidant defense system in solvent tolerance of *Pseudomonas putida* BCNU 106. *Journal of Basic Microbiology*. 2014; 54(9): 945-950.
- (16) Wei Q, Le Minh PN, Dötsch A, Hildebrand F, Panmanee W, Elfarash A, et al. Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40(10): 4320-4333.
- (17) Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 59(7): 3838-3847.

- (18) Yang Y, Pan D, Tang Y, Li J, Zhu K, Yu Z, et al. H3-T6SS of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 contributes to environmental adaptation via secretion of a biofilm-promoting effector. *Stress Biology*. 2022; 2(1): 55.
- (19) Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013; 4(4): 273-283.
- (20) Li XS, Xue JZ, Qi Y, Muhammad I, Wang H, Li XY, et al. Citric acid confers broad antibiotic tolerance through alteration of bacterial metabolism and oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(10): 9089.
- (21) Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jul;12(7):465–78.
- (22) Hall GS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th ed. Edinburgh: Elsevier; 2013.
- (23) Goodfellow M, Rainey FA, Schleifer KH. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two the Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria*. 2nd ed. New York: Springer; 2005.
- (24) Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. *Journal of Clinical Microbiology*. 2021; 59(12): 10-1128.
- (25) Baron EJ. *Diagnostic Microbiology*. 8th ed. St. Louis: Mosby; 1990: 173.
- (26) CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
- (27) Huynh TQ, Tran NBV, Pham TTV, Le VBT, Truong TP, Huynh VA, et al. Adaptive response of *Pseudomonas aeruginosa* under serial ciprofloxacin exposure. *Microbiology*. 2024;170(3):001443.
- (28) Matula TI, MacLeod RA. Penetration of *Pseudomonas aeruginosa* by sodium chloride and its relation to the mechanism of optical effects. *J Bacteriol*. 1969 Oct;100(1):411-6.
- (29) Aspedon A, Palmer K, Whiteley M. Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2006;188(7):2721-5.
- (30) Ochsner UA, Vasil ML, Alsabbagh E, Parvatiyar K, Hassett DJ. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. *Journal of Bacteriology*. 2000; 182(16): 4533-4544.
- (31) Hassett DJ, Sokol PA, Howell ML, Ma JF, Schweizer HT, Ochsner U, Vasil ML. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *Journal of Bacteriology*. 1996; 178(14): 3996-4003.
- (32) Aebi H. Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology*. Vol 105. New York: Academic Press; 1984: 121-126.
- (33) Khalid S, Alsawwa AG, Islam MK, Hashmat K, Yousaf AI, Sidiq AB, Subhani MS. A comparative study of extraction and quantification methods of protein isolated from beans. *Insights-Journal of Health and Rehabilitation*. 2024; 2(2 (Health & Allied)): 142-152.
- (34) Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006; 38(4): 283-293.
- (35) Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. 2017;8(3):83.

- (36) Smith PE, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
- (37) Nurreza FA, Yuliani MG, Nidom CA. Protein profile of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* using Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis methods (SDS-PAGE).
- (38) Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, Vahaboglu H. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol.* 2003;52(5):403-8.
- (39) De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2001; 45(6): 1761-1770.
- (40) Wiśniewski P, Adamski P, Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A. Role of osmotic stress in modulating antibiotic resistance and adhesion properties of *Listeria monocytogenes* in a dairy factory environment. *Journal of Dairy Science.* 2025.
- (41) Csonka LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews.* 1989; 53(1): 121-147.
- (42) Hoffmann T, Bremer E. Management of osmotic stress by *Bacillus subtilis*: genetics and physiology. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria.* 2016; 657-676.
- (43) Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences.* New York: Routledge; 2013.
- (44) Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2014; 53(10): 1565-1574.
- (45) Morita Y, Komori Y, Mima T, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiology Letters.* 2001; 202(1): 139-143.
- (46) Li XZ, Plésiat P. Antimicrobial drug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications.* Cham: Springer International Publishing; 2016: 359-400.
- (47) Gooderham WJ, Hancock RE. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews.* 2009; 33(2): 279-294.
- (48) Çetiner U, Rowe I, Schams A, Mayhew C, Rubin D, Anishkin A, Sukharev S. Tension-activated channels in the mechanism of osmotic fitness in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Physiology.* 2017; 149(5): 595-609.
- (49) Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(24): 15779.
- (50) Elabed H, González-Tortuero E, Ibacache-Quiroga C, Bakhrouf A, Johnston P, Gaddour K, et al. Seawater salt-trapped *Pseudomonas aeruginosa* survives for years and gets primed for salinity tolerance. *BMC Microbiology.* 2019; 19(1): 142.

- (51) Falghoush A, Beyenal H, Besser TE, Omsland A, Call DR. Osmotic compounds enhance antibiotic efficacy against *Acinetobacter baumannii* biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017; 83(19): e01297-17.
- (52) Lin HL, Chiu LC, Wan GH, Huang CC, Lee ZT, Lin YT, et al. Hypertonic saline enhances the efficacy of aerosolized gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 4325.
- (53) Mohamed FA, Shaker GH, Askoura MM. Oxidative stress influences *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to antibiotics and reduces its pathogenesis in host. *Current Microbiology*. 2020; 77(3): 479-490.
- (54) Shabunin S, Vostroilova G, Pasko N, Ermakova T, Achilov V, Plemyashov K. Enzyme's expression of antioxidant protective function of microorganisms in process of develop antibiotic resistance. *The FASEB Journal*. 2020; 34(S1): 1-1.
- (55) Nguyen THT, Nguyen HD, Le MH, Nguyen TTH, Nguyen TD, Nguyen DL, et al. Efflux pump inhibitors in controlling antibiotic resistance: outlook under a heavy metal contamination context. *Molecules*. 2023; 28(7): 2912.