

کاربرد فتودینامیک تراپی در عفونت‌های موضعی

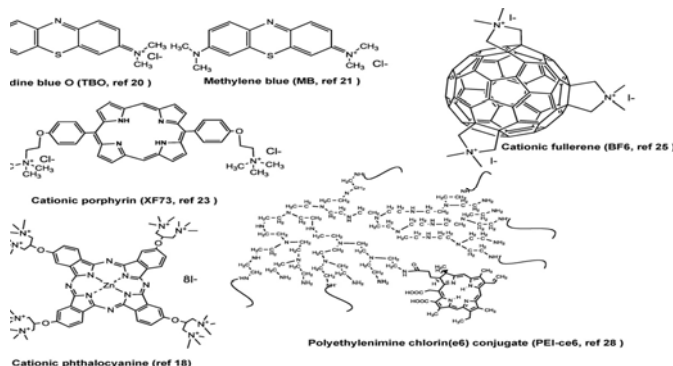
ترجمه: سیده آسیه رحیمی، دندانپزشک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

Tiahong Dai^{1,2}, Ying-Ying H^{1,2,3}, Michaftr H^{1,2,4}.

مقدمه

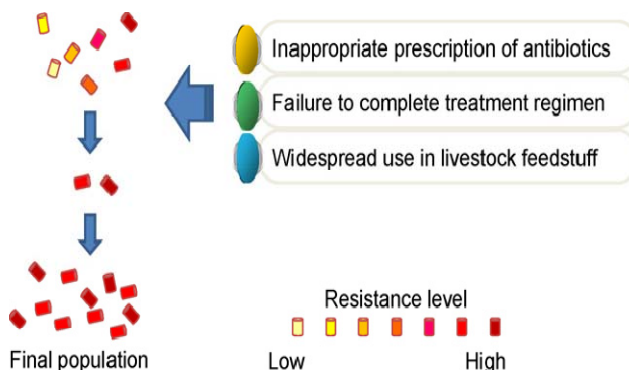
افزایش سوش‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک احتمالاً پایان دوره‌ای است که بیش از ۵۰ سال گذشته به نام عصر آنتی‌بیوتیک نامیده شد [۱ و ۲]. یک باکتری، بسیار سریع تکثیر می‌شود و جهش به زندگی میکروب در حضور آنتی‌بیوتیک کمک می‌کند. بنابراین عناصر ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدهای کدکننده آنزیم‌های مقاوم و پمپ‌های جریانی^۱ می‌توانند بین گونه‌های مختلف انتقال یابند. تجویز بی‌دلیل آنتی‌بیوتیک‌ها بالاخص در مورد بیماری‌های ویروسی، کامل نکردن رژیم درمانی آنتی‌بیوتیک توسط برخی از بیماران و گسترش استفاده از آنتی‌بیوتیک در احشام موجب تشدید مشکل انتخاب آنتی‌بیوتیک در گونه‌های مقاوم گردیده است (شکل ۱) [۳]. افزایش گونه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک موجب گردیده است که تحقیقات وسیعی برای یافتن درمان‌های ضدباکتریایی جایگزین انجام شود.

افزایش سوش‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک احتمالاً پایان دوره‌ای است که بیش از ۵۰ سال گذشته به نام عصر آنتی‌بیوتیک نامیده شد [۱ و ۲]. یک باکتری، بسیار سریع تکثیر می‌شود و جهش به زندگی میکروب در حضور آنتی‌بیوتیک کمک می‌کند. بنابراین عناصر ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدهای کدکننده آنزیم‌های مقاوم و پمپ‌های جریانی^۱ می‌توانند بین گونه‌های مختلف انتقال یابند. تجویز بی‌دلیل آنتی‌بیوتیک‌ها بالاخص در مورد بیماری‌های ویروسی، کامل نکردن رژیم درمانی آنتی‌بیوتیک توسط برخی از بیماران و گسترش استفاده از آنتی‌بیوتیک در احشام موجب تشدید مشکل انتخاب آنتی‌بیوتیک در گونه‌های مقاوم گردیده است (شکل ۱) [۳]. افزایش گونه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک موجب گردیده است که تحقیقات وسیعی برای یافتن درمان‌های ضدباکتریایی جایگزین انجام شود.



شکل ۲: چگونگی عملکرد حساسگر نوری و بافت

PDI ممکن است برای کشتن و حذف پاتوژن‌هایی که در حال آلوده کردن بافت هستند، روش جدیدی باشد [۹]. در تمامی مطالعاتی

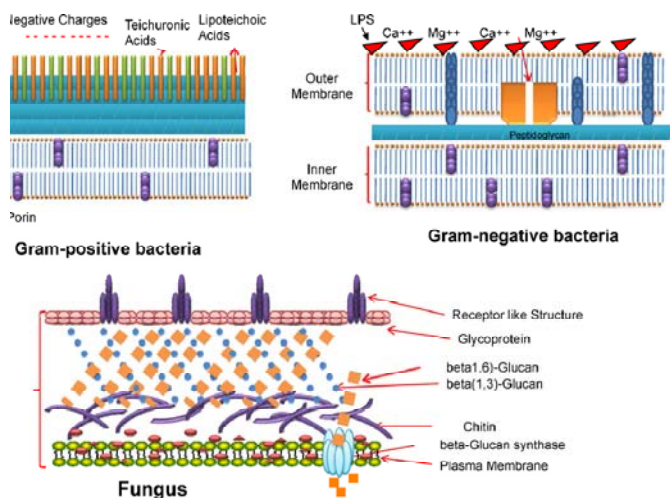


شکل ۱: مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

² Photosensitizer³ Photodynamic inactivation⁴ Lethal Photosensitization⁵ Photo-activated disinfection¹ Efflux pumps

gr^- ها را افزایش دادند و با نفوذ PS به درون سلول، درجایی که اکسیژن واکنشی تحت نور تولید می‌شد، تخریب‌های وسیعی را ایجاد کردند [۱۴].

روش دیگری که به‌وسیله Bertoloni [۱۶] و همکارانش انجام شد استفاده از EDTA برای تجزیه LPS یا القاء توانایی انجام به‌وسیله هماتوپورفیرین یا فتالوسیانین بر روی E.coli و کلبسیلانومونای حساس شده با کلسیم کلراید بود.



شکل ۳: ساختار مولکولی چند حساسگر نوری

روش دیگر استفاده از یک مولکول PS به همراه یک یا چند شارژ داخلی مثبت است که به‌وسیله اتم‌های نیتروژن چهارتایی ایجاد می‌شود [۱۷-۱۹]. رنگ‌های فنوتیازینوم مانند تولوئیدین بلو O [۲۰]، متیلن بلو [۲۱] و رنگ‌های Azure [۲۲]، بر روی دامنه وسیعی از باکتری‌های gr^+ و gr^- و سلول‌های قارچی به کار برده می‌شوند. حساسگرهای نوری تتراپیرول کاتیونیک حاوی گروه‌های چهارتایی براساس شالوده‌هایی مانند پورفیرین‌ها [۱۷ و ۲۳]، فتالوسیانین‌ها [۱۸] و حتی مولکول‌های اسفیریکال C60 [۲۵] ساخته شده‌اند. آخرین روشی که مورد بحث قرار می‌گیرد شامل اتصالات کووالانسی یک حساسگر نوری غیرکاتیونیک مانند کلرین (e6) به یک مولکول پلیمر حاوی گروه‌های آمین مانند پلی‌لیزین [۲۶ و ۲۷] یا پلی‌اتیلن آمین [۲۸] می‌باشد. شکل ۳ فرمول ساختاری ۶ مولکول مورد بحث را نشان می‌دهد که دارای گروه‌های پایه یا کاتیونیک می‌باشند و بسیار فعال هستند. تصور می‌شود که مکانیسم فعالیت‌های همه حساسگرهای نوری یا حساسگرهای پلیمری کوژوگه شده به‌صورت «روش جذب خودانگیخته» [۲۹] می‌باشد. در این پروسه ابتدا مولکول‌های کاتیونیک، mg^{2+} و ca^{2+} را از غشاء خارجی که از آن به‌عنوان یک لنگرگاه برای مولکول‌های LPS با شارژ منفی استفاده می‌کنند،

که PDI را بر روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک انجام داده‌اند، یافتند که از نظر حساسیت به PDI این باکتری‌ها شبیه به انواع غیرمقاوم [۱۰] و یا حساس‌تر از آن‌ها می‌باشند [۱۱]. به‌علاوه هنوز امکان ایجاد باکتری‌های مقاوم به PDI وجود ندارد [۱۲].

PDI همواره برای عفونت‌های موضعی به‌کار می‌رود نه برای عفونت‌های سیستمیک مانند باکتریمیا. کاربرد PDI در سرطان به‌صورتی است که PS در جریان خون تزریق می‌شود و در تومور تجمع می‌یابد. اعتقاد ما بر این است که در عفونت‌های موضعی می‌توان از روش‌های آزادسازی موضعی PS مانند به‌کارگیری موضعی ماده، تزریق تدریجی، تزریق بینابینی و یا آزادسازی آئروسول‌ها استفاده نمود. مسئله کلیدی که می‌توان به آن اشاره کرد تأثیر درمان در تخریب تعداد زیادی از پاتوژن‌های ایجادکننده بیماری و ویژگی انتخاب‌گری مؤثر حساسگر نوری نسبت به میکروب در مقابل سلول‌های پستانداران است که می‌تواند تخریب کمتر بافت میزبان را در پروسه درمان در پی داشته باشد و از رشد مجدد تعداد کمی از باکتری‌های باقی مانده جلوگیری نماید.

از اوایل قرن گذشته که PDT شناخته شده است میکروب‌های خاصی با استفاده از ترکیب نور و حساسگر نوری در *invitro* از بین رفته‌اند [۱۳]. در طی سال‌های اخیر گزارش‌های دیگری مبنی بر باکتری‌های غیرفعال شده یا از بین رفته توسط نور و حساسگرهای نوری مختلف وجود دارد [۹].

در سال ۱۹۹۰ یک تفاوت اساسی در حساسیت به PDT بین باکتری‌های gr^+ و gr^- مشاهده گردید [۱۴]. به‌طور کلی یافت شد که مولکول‌های PS کاتیونیک، آنیونیک یا خنثی می‌توانند تأثیر به‌سزایی بر روی مرگ باکتری‌های gr^+ داشته باشند، در حالی که تنها PS‌های کاتیونیک یا شیوه‌هایی که بتوانند سد نفوذپذیری باکتری گرم منفی را به ترکیبات حساسگر نوری غیرکاتیونی نفوذپذیر نمایند، می‌توانند ده‌ها هزار از سوش‌های گرم منفی را از بین ببرند. این تفاوت در حساسیت این دوگونه باکتریایی به‌وسیله فیزیولوژی آن‌ها توضیح داده می‌شود. باکتری‌های gr^+ یک غشاء سیتوپلاسمی نسبتاً متخلخل دارند که با پتیدوگلیکان و لیپوتیکوئیک اسید احاطه شده است و اجازه عبور PS را می‌دهد. پوشش سلولی باکتری‌های gr^- شامل یک غشاء سیتوپلاسمی داخلی و یک غشاء خارجی است که به وسیله پتیدوگلیکان‌های حاوی پری پلاسم جدا شده‌اند. غشاء خارجی، یک سد نفوذی مؤثر بین سلول و محیط را تشکیل می‌دهد و به کاهش باند و نفوذ PS تمایل دارد [۱۵]. دیواره سلول‌های قارچی لایه نسبتاً ضخیم بتاگلوکان و کیتین دارند که یک سد نفوذی متوسط (بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت) می‌باشد (شکل ۲).

تاکنون PDI به چندین روش بر روی باکتری‌های gr^- آزمایش شده است. Nitzan و همکارانش با استفاده از نانوپتید Poly Cathionic Peptide Polymixin B نفوذپذیری غشاء خارجی

¹ Self-promoted uptake pathway

و *c.albicans* در حضور پلاسمای انسانی و سرم و همچنین به‌کارگیری *cationic5-phenyl-10, 15,20-tris* (N-methyl4-*pridyl*) porphyrin chloride و نور سفید 30mw/cm² کاهش یافت. Street و همکارانش [۳۴] در پی پاسخ به این سؤال برآمدند که آیا PDI به‌وسیله متیلن بلو می‌تواند تعداد MRSA رشدکننده روی پوست مصنوعی (ساخته شده از کراتینوسیت‌های به‌دست آمده از اپیدرم انسانی و فیبروبلاست‌های پوستی در یک محیط کشت هوازی که منجر به تشکیل درم و اپیدرم می‌گردد و در مدل‌های با ضخامت کامل پوست اپیتلیالیزه انسانی دیده می‌شود) را کاهش دهد؟ کاربرد MB به‌تنهایی کاهش اندکی را در MRSA زنده نسبت به گروه کنترل درمان نشده نشان داد. در حالی که این کاهش در مورد PDT بلافاصله پس از درمان چشمگیر بود و در ۲۴ ساعت پس از درمان تقریباً استریل شد.

استریل کردن خون: استفاده از PDT از سال ۱۹۹۲ پس از اولین آزمایش Red cross جایگاه ویژه‌ای یافت. انتقال HBV, HCV و HIV از قدیم نیز صورت می‌پذیرفته است. هرچند هنوز هم خطر آلودگی از طریق فرآورده‌های خونی مانند پلاکت و RBC وجود دارد. این خطر ناشی از ناتوانی تست‌های سرولوژیکی برای تشخیص عفونت ویروسی در مدت "window" می‌باشد.

Mohr و همکارانش [۳۵] غیرفعال کردن HBV, HIV, HCV و پاراویروس B10 را در محصولات پلازما به‌وسیله MB در دامنه ۱ μm گزارش نمودند. ویروس West Nile هم می‌تواند غیرفعال شود [۳۶]. رنگ تیونین در ترکیب با نور زرد و UVB برای استریل کردن غلظت‌های پلاکت استفاده می‌شود [۳۷]. Ben-Hur و همکارانش از فتونوسیانین‌ها و نور قرمز برای غیرفعال کردن پاتوژن‌ها در RBC تغلیظ‌شده استفاده نمودند [۳۸] RBC نشان دادند که این شرایط می‌تواند ویروس، انگل‌های خونی (*Trypanosoma cruzi*(Chagas) و پلاسمودیوم فالسی پاروم (*malaria*) را تا سطح غیرقابل تشخیص کاهش دهد ($4\log_{10}\text{kill}$). از تخریب RBC درحین درمان می‌توان به‌وسیله افزایش شار نور تا ۸۰ mw/cm² و گلوکاتینون‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد و ویتامین E در مدت تابش نور جلوگیری کرد [۳۹].

پوست: Maisch و همکارانش [۴۰] اثرات نفوذی و آنتی باکتریال XF73 (حساسگر نوری کاتیونیک پورفیرینی) را در مقابل MRSA با استفاده از پوست خوک بررسی کردند. آن‌ها از دو روش استفاده کردند:

۱- ابتدا باکتری را در محلول XF73 قرار دادند و سپس آن‌را بر روی پوست *ex vivo* خوک قرار دادند.

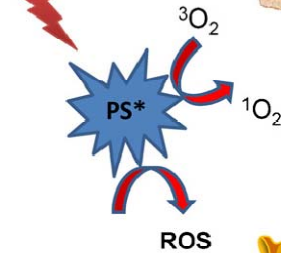
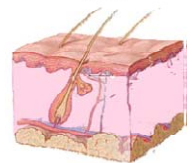
۲- در این روش باکتری را روی پوست قرار دادند و سپس XF73 را برای یک ساعت با یک پانسما بر روی پوست گذاشتند. XF73 فقط در لایه استراتوم کرنوم وجود داشت. *photoinactivation* در روش

جابه‌جا می‌نماید و غشاء خارجی ضعیف و به آرامی نفوذپذیر می‌شود و به‌دنبال آن جذب حساس‌گر نوری و تخریب سد نفوذی افزایش می‌یابد [۱۵]. یکی از نگرانی‌های موجود، انتخابگری حساسگرهای نوری کاتیونیک نسبت به سلول‌های میکروب در مقابل سلول‌های پستانداران است [۳۰]. تصور می‌شود مولکول‌های کاتیونیک به آرامی توسط سلول‌های میزبان و به‌وسیله پروسه اندوسیتوز جذب می‌شوند درحالی‌که جذب آن‌ها توسط سلول‌های باکتری نسبتاً سریع می‌باشد. بنابراین اگر نوردهی در فاصله زمانی کوتاهی پس از به‌کار بردن حساسگر نوری انجام شود، میزان تخریب بافتی میزبان کاهش خواهد یافت.

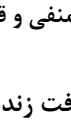
Blood sterilization



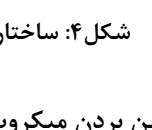
Skin



Teeth



Stomach



شکل ۴: ساختار باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ

از بین بردن میکروب‌ها در مواد بیولوژیکی و بافت زنده خارج از بدن موجود زنده به‌وسیله PDT (*ex vivo*)

از آنجایی که PDT باید در مکانی که به‌وسیله پروتئین، سلول، خون یا بافت زنده احاطه شده است آثار ضد میکروبی خود را ایفا نماید، برای بازسازی محیط بدن در کلینیک از بافت زنده خارج از بدن (*ex vivo*) و ماده بیولوژیکی استفاده می‌شود. شکل ۴ برخی از این بافت‌های بیولوژیکی و مواد را نشان می‌دهد.

پروتئین‌ها و سلول‌ها: طبق یافته‌های محققین اگر باکتری در سالین یا محیط‌های با تجمع کمتر پروتئین کاشته شود، PDI مؤثرتر خواهد بود [۳۱]. محیط‌های غنی از پروتئین یا آلبومین سرم گاوی اثر آن‌را کاهش خواهند داد. Wilson & Pratten [۳۲] یافتند که استاف اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در حضور آلبومینیم فتالوسیانین دی سولفونات، نور و سرم اسب ۱۰ برابر کمتر از بین می‌روند.

Lambrecht و همکارانش [۳۳] نیز نتایج مشابهی را نشان دادند و بیان نمودند که از بین رفتن *S.aureus aeruginosa*

Polyethylenimin و Chlorin(e6) و نور لیزر دیود ۶۶۰ نانومتر را که از طریق یک فیبر ۲۰۰ میکرونی به ریشه دندان می‌رسید، استفاده کردند و آن را با درمان‌های معمول در اندو مقایسه نمودند. درمان‌های اندو به‌تنهایی bioluminescence را در حدود ۹۰ درصد کاهش داده بود در حالی که PDT به‌تنهایی به میزان ۹۵ درصد باعث کاهش bioluminescence شده بود. ترکیب درمان‌های اندو و PDT بیولومینسنس را به بیش از ۹۸ درصد کاهش داد و از همه مهم‌تر رشد مجدد باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت در ترکیب این دو روش درمانی ($P < 0.0005$) بسیار کمتر از به‌کارگیری هر یک از آن‌ها به‌تنهایی بود.

معد: هلیکوباکتری پیلوری باکتری گرم منفی، میکروآتروفیلیک و اسپیرالی است که در مخاط معدۀ انسان کلونیزه می‌شود. این باکتری اوره آز و سایر فاکتورهای ویروالانس را در جهت افزایش بیماری‌زایی خود ترشح می‌کند.

Ferret گونه‌ای از حیوانات است که به‌صورت طبیعی به‌طور متناوب با گونه‌ای از هلیکوباکتر گاستریک به نام *H. mustelae* آلوده می‌گردد. Millson و همکارانش [۴۳] با استفاده یکی از ۵ حساسگر نوری (متیلن بلو (MB)، تولوئیدین بلو (TBO)، فتالوسیانین، محصولات هماتوپورفیرین و 5-aminolavulinic acid) و vapor pumped dye laser اثر PDT را بر روی مخاط معدۀ خارج شده Ferret بررسی نمودند. پس از تابش نور 200 J/cm^2 و استفاده از 0.75 mg/kg TBO ۹۰ درصد میزان باکتری‌ها کاهش یافت. غلظت‌های 0.75 mg/kg و $7/5 \text{ mg/kg}$ از MB برای *H. mustelae* سمی نبود ولی اضافه کردن نور لیزر 20 J/cm^2 بیش از ۹۹ درصد باکتری‌ها را از بین برد.

PDT در عفونت‌های حیوانی

برای سال‌های طولانی اثرهای PDT در جلوگیری و درمان بیماری‌های عفونی با استفاده از ایجاد عفونت در حیواناتی مانند سگ، موش، خوک، Rat و مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف استفاده از حیوانات به‌عنوان مدل، تقلید از بیماری انسانی است. مشخص است که باکتری و قارچی که مواد غذایی خود را از سلول‌ها و بافت‌های پستانداران به دست می‌آورند، از میکروارگانیسم‌هایی که در محیط کشت آزمایشگاهی رشد می‌کنند بسیار متفاوت هستند. در یک عفونت، بیان بسیاری از ژن‌ها در فاز بی‌کشتی نسبت به فاز آن "Planktonic" گفته می‌شود، به‌صورت لگاریتمی نسبت به فاز "Stationary" یا بیوفیلیم در حال رشد افزایش می‌یابد [۴۴-۴۶].

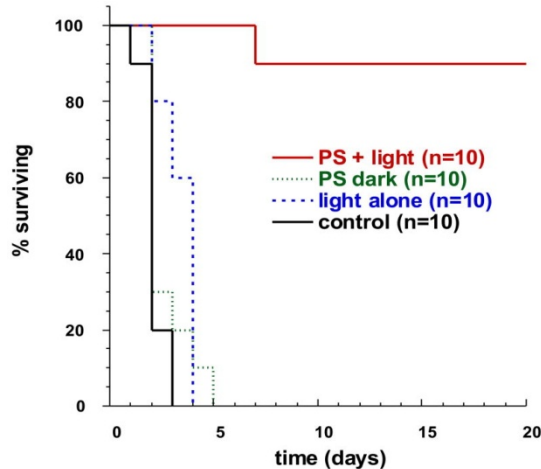
بررسی PDT بر روی عفونت به‌وسیله تصاویر Bioluminescence یکی از مشکلات مطالعات *invivo* و PDT در عفونت حیوانات، بررسی گسترش عفونت و پاسخ آن به درمان است. تکنیک‌های میکروبیولوژی استاندارد در بررسی عفونت حیوانی از کشتن حیوان، برداشتن بافت آلوده، هموژنیزاسیون، رقیق کردن متوالی، Plating و

اول $10^3 \log >$ کاهش در *S. aureus* را در پی داشت در حالی که نوردی در روش دوم به میزان $10^1 \log$ باعث کاهش رشد *S. aureus*، مستقل از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک رده استفاده شده گردید.

Smijs و همکارانش [۴۱] مطالعات مشابهی مانند مطالعات ما بادرما توفیت، *Trichophyton rubrum* (شایع‌ترین علت عفونت‌های قارچی سطحی) انجام دادند. آن‌ها از یک لایه پوست *ex vivo* انسانی که شامل استراتوم کورنئوم بود و آن را به *T. rubrum* آغشته کرده بودند، استفاده نمودند. حساسگرهای نوری استفاده شده شامل:

5,10,15-tris (4-methylpyridinium) -20-phenyl-DP) [21H,23H]- porphine trichloride (SylsensB) Deuteroporphyrin monomethylester mme) و دو محیط کشت متفاوت، Dulbecco's modified Eagle و آب مقطر بود. حساسیت PDT به زمان کاربرد PDT پس از کاشت اسپور بستگی داشت. با افزایش زمان PDT برای هر دو حساسگر نوری در DMEM کاهش حساسیت مشاهده گردید. تغییر محیط کشت به آب مقطر از بین رفتن قارچ‌ها را با ماده Sylsen B افزایش داد و برای DP mme کاهش را دربرداشت.

دندان: تأثیر استفاده از PDT در درمان‌های اندودنتیک بر روی دندان‌های کشیده شده مطالعه گردیده است. *Enterococcus faecalis* یک پاتوژن بسیار شایع است که در اکثر عفونت‌های اندودنتیک راجعه دیده می‌شود [۴۲]. Fonsca و همکارانش دندان‌های تک‌ریشه را با *E. faecalis* آلوده نمودند و آن‌ها را برای ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردند. پس از آن دندان‌ها را در یک محلول تولوئیدین بلو 0.125 درصد برای ۵ دقیقه قرار دادند و از تابش نور 660 nm و 50 mW بر روی آنها استفاده نمودند. کاهش تعداد باکتری‌ها (CFU) در گروه درمان شده حدود $99/9$ درصد بود در حالی که در گروه کنترل یک افزایش $2/6$ درصد مشاهده شد. Soukos و همکارانش آزمایشی مشابه انجام دادند، آن‌ها در این آزمایش از *E. faecalis*، متیلن بلو و یک فیبر اپتیکی با چند دیفیوزر سیلندریکی که نور 665 نانومتر، 30 J/cm^2 را به صورت همگرا در 360 درجه با طول موج منتشر می‌کرد، استفاده نمودند. پس از آن 53 درصد کاهش باکتری‌ها را داشتند و پس از افزایش به 222 J/cm^2 ، این میزان به 97 درصد رسید. Garcez و همکارانش از PDT برای کشتن باکتری‌های گرم منفی *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* در حال رشد در کانال‌های دندان‌های کشیده شده استفاده نمودند. گونه‌های گرم منفی به صورت معمول مانند گرم مثبت‌ها یافت نمی‌شوند و از بین بردن آن‌ها سخت‌تر است و به‌علاوه می‌توان جهت بررسی میزان عفونت از bioluminescence استفاده کرد. آن‌ها مخلوطی از



شکل ۵: مدت زنده بودن موش‌های آلوده شده با *P.aeruginosa* و درمان نشده، درمان شده با نور به تنهایی، ماده حساسگر نوری به تنهایی و درمان شده با PDT

Wong [۵۳] و Zolifagehari [۵۴] و همکارانشان تأثیر PDT با متیلن بلو و تولوئیدین بلو را بر *Vibro vulnificus* و عفونت‌های زخمی ایجاد شده با *S.aureus* که به متی‌سیلین مقاوم بودند، بررسی نمودند. در هر دو مطالعه پس از تابش نور قرمز $360-150 \text{ J/cm}^2$ بیش از $1 \log$ کاهش در تعداد باکتری‌ها مشاهده گردید. مشخص شد با انجام PDT در عفونت *Vibro vulnificus* که می‌تواند سبب سپتیسمی کشنده شود، بهبودی موش حاصل می‌گردد.

عفونت‌های سوختگی: سوختگی موجب تخریب سدهای پوستی می‌شود و با کاهش خون‌رسانی به بافت‌های تأثیر پذیرفته و کاهش ایمنی، به سادگی موجبات عفونت را فراهم می‌آورد. در سال‌های گذشته تعداد زیادی از بیماران با سوختگی‌های شدید در اثر عفونت فوت می‌کردند. معرفی درمان‌های آنتی‌میکروبیال موضعی، Excision اولیه و پیوند پوست، میزان مرگ را به صورت چشمگیری کاهش داد. پاتوژن *S.aureus*، *P.aeruginosa* و قارچ فیلامنتوس معمولاً مسئول ایجاد این عفونت‌ها هستند.

Orenstein و همکارانش [۵۵] با استفاده از خوک گینه‌ای تأثیر پورفیرین‌ها را بر روی ریشه‌کن کردن *S.aureus* در سوختگی مطالعه کردند. وزن خوک‌ها 400 گرم بود. ابتدا موهای پشت خوک‌ها تراشیده شد، سپس یک صفحه مسی $30 \times 10 \times 10 \text{ میلی‌متر}$ دارای یک دسته 200 میلی‌متری را با حرارت 150 درجه سانتی‌گراد بر روی پشت خوک‌ها قرار دادند و سوختگی درجه ۳ ایجاد گردید 15 دقیقه پس از سوختگی، زخم‌ها با 10^8 CFU از *S.aureus* آلوده گردیدند. پس از قرار گرفتن پورفیرین‌ها بر روی زخم و یا تزریق در زخم 99% باکتری‌ها از آن بین رفتند و درمان به صورت ویژه به تابش نور بستگی نداشت.

شمارش کلونی استفاده می‌کنند. این ارزیابی‌ها که بسیار وقت‌گیر می‌باشد برای شمار زیادی از حیوانات استفاده شده است و اغلب از لحاظ آماری قابل اعتماد نمی‌باشد. برای آسان کردن بررسی‌های غیرتهاجمی عفونت مدل‌های حیوانی از روشی استفاده کرده‌ایم که باکتری‌ها به صورت ژنتیکی مهندسی شده‌اند و سیستم تصویربرداری حساس به نور برای تجسم واقعی مراحل عفونت به کار می‌رود. وقتی که این باکتری‌ها در *invitro* تحت PDT قرار می‌گیرند، کاهش نوررسانی با کاهش شکل‌گیری کلونی همراه می‌گردد. در چند موش عفونت موضعی را ایجاد کردیم و توانستیم از طریق تصویربرداری Bioluminescence (BLI) آن را بررسی نماییم [۴۷].

BLI برای یافتن یک عفونت یا بررسی اثرهای درمان‌های آنتی‌میکروبیال استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد پاتوژن باکتری‌ها در حضور ژن‌های *Lucinfrase* تغییر نمی‌کند و بیولومینسنس می‌تواند از طریق مطالعه حیوانی مشخص گردد. به علاوه شدت Bioluminescence اندازه‌گیری شده از حیوان زنده به خوبی با میزان باکتری در ارتباط است که به وسیله پروتکل استاندارد تعریف شده است [۴۸-۵۰]. ادغام *transposon* دارای *Lucinfrase operon* به کروموزوم باکتریایی نشان‌دهنده این است که کاهش *luminescence* در محل عفونت حیوانات را می‌توان به کاهش تعداد باکتری‌ها به جای از دست دادن پلاسمیدها نسبت داد.

عفونت زخم: 25% درصد عفونت‌های بیمارستانی مربوط به زخم‌های پس از جراحی است و درجاتی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهد. گونه‌های میکروبی شامل استاف اورئوس، آنتروکوکسی و باسیل‌های گرم منفی روده می‌باشند. بیماری‌هایی که جراحی روده داشته‌اند یا کسانی که در نتیجه شیمی‌درمانی سرطان یا سایر داروها دچار نوتروپنی شده‌اند و یا افراد مبتلا به دیابت یا سایر بیماری‌های عروقی، در معرض ریسک عفونت پس از عمل قرار می‌گیرند. ممکن است وقتی که یک زخم آلوده می‌شود به مداخلات جراحی و یا PDT موضعی برای سوش‌های مقاوم به دارو نیاز باشد.

Hamblin و همکاران [۵۱ و ۵۲] اولین بار تأثیر PDT را بر روی عفونت زخم‌های موش که به وسیله اشرفیای کلی و سودوموناس آئروژینوزا ایجاد شده بود، بررسی کردند. زخم‌هایی به اندازه 100 میلی‌متر مربع روی پشت موش ایجاد شد. باکتری‌های بیولومینسنس به همراه یک پلاسمید که حاوی اپرون ژن *lux* بود، منتقل گردید و عفونت در زمان مورد نظر توسط دوربین *charge-coupled* بررسی شد. حساسگر نوری پلی‌کاتیونیک به صورت موضعی و نور قرمز با طول موج 665 نانومتر و توان 240 J/cm^2 به کار برده شد. در عفونت *P.aeruginosa* هر 3 گروه درمان نشده در 5 روز مردند. در مقابل 90% درصد موش‌هایی که با PDT درمان شده بودند، زنده ماندند که در شکل ۵ نشان داده شده است.

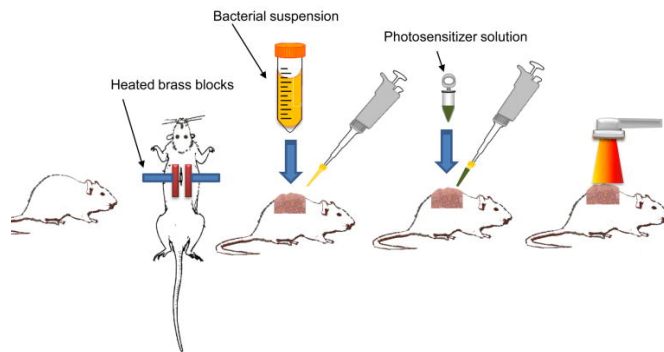
یکی از عمده‌ترین مدل‌های حیوانی که در عفونت‌های موضعی بافت نرم استفاده می‌گردد، تزریق سوسپانسیون باکتریایی *E. coli* و *S. aureus* به داخل عضله سفت موش می‌باشد. *Berthiaum* و همکارانش [۵۸] تأثیر *antibody-targeted photolysis* را بر روی از بین رفتن باکتری *P. aeruginosa* در *invivo* به‌وسیله ایمونوکونژوگاسیون بررسی کردند. ابتدا آن‌ها باکتری‌ها را با *Tin(IV)chlorine e6* مخلوط و سپس به آنتی‌بادی مونوکلونال متصل کردند و این مخلوط را در زیر پوست پشت موش تزریق کردند. پس از عفونت، کونژوگه‌های ویژه و غیرویزه در محل عفونت تزریق شدند و پس از ۱۵ دقیقه آنکوباسیون محل با نوری با طول موج ۶۳۰ نانومتر و با توان 100mw cm^2 ، ۱۶۰۰ ثانیه تحت تابش نور قرار گرفتند (به صورت کلی 760 J/cm^2). بیش از ۷۵ درصد باکتری‌هایی که تحت تأثیر کونژوگه ویژه قرار داشتند، از بین رفتند در حالی که در حیواناتی که درمان نشده بودند و یا به‌وسیله کونژوگه غیراختصاصی درمان شده بودند، رشد باکتریال نرمال مشاهده شد.

Gad و همکارانش [۵۹] از باکتری‌های با ویژگی لومینسنس استفاده نمودند و تأثیر PDT بر عفونت *S. aureus* بافت نرم را مورد بررسی قرار دادند. یک میلیون (10^6) *mid-log* از باکتری در $50\ \mu\text{l}$ PBS حل شد و در دو میلیمتری داخل ماهیچه سفت موشی که دچار نوتروپنی بود تزریق گردید. پس از ۲۴ ساعت PDT با ماده *poly-lysine chlorine e6* انجام گردید. در گروه درمان نشده و یا آن‌هایی که فقط با نور درمان شده بودند کاهش لومینسنس به دوز نور وابستگی نداشت. گروهی که PDT شده بودند نسبت به گروهی که درمان نشده بودند بهبودی بهتری داشتند.

عفونت‌های دهانی دندان: از آنجایی که گونه‌های باکتریال نسبت به آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند دندانپزشکان اغلب به‌وسیله انتخاب جایگزین با رشد باکتری‌های پاکت پرپودنتال و ازدست دادن دندان‌ها مقابله می‌کنند. اولین نگرانی یک ایمپلنتولوژیست، التهاب اطراف ایمپلنت است. شرایط نامساعد اطراف ایمپلنت مانند خونریزی، ترشح چرک، التهاب بافت نرم (موکوزیت اطراف ایمپلنت) می‌تواند به تخریب متوسط تا شدید استخوان منجر گردد.

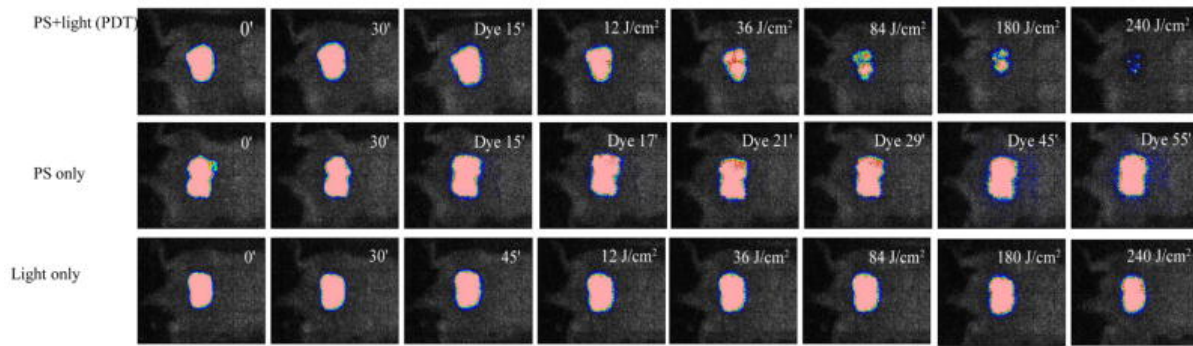
Shibli و همکارانش [۶۰] طی یک مطالعه *pilot* اثرهای *Lethal photosensitization* را بر روی التهاب سطوح مختلف ایمپلنت در سگ‌های دوره نر (دوساله با میانگین وزنی ۱۸ کیلوگرم) بررسی کردند. سه ماه پس از کشیدن دندان‌های پره مولر در ۶ سگ دو رگه نر، ۳۶ ایمپلنت با ۴ پوشش سطحی متفاوت (۹ سطح با پوشش سطحی تیتانیوم خالص، ۹ سطح تیتانیوم پلاسما-اسپری، ۹ سطح هیدروکسی آپاتیت و ۹ سطح اسید اچ) جایگزین شد. پس از ۱۴ ماه، سگ‌ها تحت دبریدمان جراحی اطراف ایمپلنت دندان و *Lethal photosensitization* به‌وسیله ترکیب تولوئیدین بلو (100 kg/ml) و پرتوتابی با یک لیزر دیود 685nm ، 200 J/cm^2

Lambrechts [۵۶] و *Dia* [۵۷] و همکارانشان برای ارزیابی PDT بر روی عفونت‌های سوختگی حاصل از *S. aureus* و *A. baumannii* از موش استفاده کردند. مراحل در شکل ۶ نشان داده شده است. با گذاشتن دو بلوک برنجی گرم شده با حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه بر روی پشت موش، یک منطقه سوختگی ۲۰۰ میلی‌متر مربع ایجاد شد. ۱۰ دقیقه پس از سوختگی، زخم با *S. aureus* و *A. baumannii* آلوده شد زمانی که ۳۰ دقیقه پس از عفونت PDT انجام شد بیش از 10^3 log از *A. baumannii* غیرفعال و به وسیله آنالیز تصاویر لومینسنس ارزیابی گردید. در مدت زمان یکسانی در گروه کنترل کمتر از 10^9 log کاهش لومینسنس باکتریایی مشاهده شد و لومینسنس باکتریایی گروهی که فقط نور دریافت کرده بودند در همین زمان ۲ برابر افزایش داشت. زمانی که ۲۴ ساعت پس از ایجاد عفونت PDT انجام شد، بیش از 10^1 log از هر دو باکتری *S. aureus* و *A. baumannii* غیرفعال گشتند. PDT ترمیم زخم را در سوختگی‌های آلوده شده با *A. baumannii* به تأخیر نینداخت اما، در مورد PDT در سوختگی‌های آلوده شده با *S. aureus* این تأخیر مشاهده گردید.



شکل ۶: نمای شماتیک مراحل انجام PDT بر روی عفونت سوختگی موش

عفونت‌های بافت نرم: اگرچه عفونت‌های بافت نرم نسبتاً اندک می‌باشند اما، آن‌ها می‌توانند نتایج تخریب‌کننده‌ای در پی داشته باشند. گسترش می‌تواند سریع باشد، میزان مرگ و میر بالاست (بیش از ۵۰ درصد) و جراحی‌های فلج‌کننده متناوب تنها راه متوقف کردن این بیماری است. این گروه عفونت‌ها شامل التهاب فاسیای نکروزه‌کننده (*S. aureus*، استرپتوکوکسی یا گونه‌های پلی میکروبیال) *gas gangrene* (گونه‌های کلستریدیوم)، سلولیت‌های نکروزکننده و *Fournier's gangrene* (مخلوطی از هوازی و بی‌هوازی‌ها) می‌باشد. در این عفونت‌ها برش‌های مکرر بافت عفونی ضروری است و PDT می‌تواند در کاهش میزان باکتری‌ها و وسعت دبریدمان جراحی سهم عمده‌ای داشته باشد.



شکل ۷: Dose-response: لومینسنس باکتریایی در موش‌هایی که با *A.baumannii* آلوده شده و ۳۰ دقیقه پس از عفونت با PEI-ce6 و نور درمان گشته اند (PDT) موش‌هایی که با *A.baumannii* آلوده شده و ۳۰ دقیقه پس از عفونت با PEI-ce6 به تنهایی درمان گشته اند (dark control)؛ موش‌هایی که با *A.baumannii* آلوده شده و ۳۰ دقیقه پس از عفونت با نور به تنهایی درمان گشته اند (light control)

Sigusch و همکاران [۶۵] مطالعه‌ای بر روی PDT در عفونت‌های پریودنتال سگ‌های شکاری انجام دادند. ناحیه زیر لثه حیوانات با *P.gingivalis* و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم آلوده شد. دو حساسگر نوری chlorine e6 و BLC1010 به کار برده شدند. پروسه PDT با هریک از حساسگرهای نوری و نور لیزر ۶۶۲ نانومتر سبب کاهش چشمگیر علائم التهاب مانند قرمزی و Bop در مقایسه با گروه کنترل گردید. PDT با chlorine e6 سبب کاهش چشمگیر *P.gingivalis* گردید، در حالی که پس از PDT با BLC1010 هیچ کاهش دیده نشد. فوزوباکتریوم نوکلئاتوم می‌تواند با chlorine e6، تا حد معینی از BLC1010 و لیزر تنها به سختی کاهش پیدا کند. در گروه کنترل در محل‌های آلوده شده با *P.gingivalis* تغییری مشاهده نشد.

Mucocutaneous oropharyngeal candidiasis یکی از شایع‌ترین نماهای بالینی عفونت HIV می‌باشد که در ۸۴ درصد بیماران مبتلا مشاهده می‌گردد. به نظر می‌آید که یک پیشگویی‌کننده غیروابسته نقص ایمنی در بیماران مبتلا به ایدز می‌باشد. کاندیدا آلبیکنس بیشترین ارگانیزم جدا شده از بیماران است. در جمعیت بالغین سالم حدود ۴۰ درصد ناقل دهانی می‌باشند و این بیماری یک بیماری آندوژن است. Teichert و همکارانش [۶۶] تأثیر استفاده از PDT با متیلن بلو را در درمان کاندیدای دهانی در موش با ایمنی مهار شده بررسی کردند. ۷۵ موش با ایمنی تضعیف‌شده شدید (SCID) سه بار در یک هفته با استفاده از یک سوآب آلوده با کاندیدا آلبیکنس به مدت یک دوره ۴ هفته‌ای دچار عفونت شدند. در زمان درمان داخل دهان موش‌هایی که با میکروارگانیزم‌ها آلوده شده بودند به ۰/۰۵ میلی‌متر MB در غلظت‌های متفاوتی از ۵۰ - ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ آغشته شد. پس از ۱۰ دقیقه موش‌ها تحت تابش لیزر دیود ۶۶۴ نانومتر با یک دیفیوزر سیلندریکال قرار گرفتند. نتایج نشان داد که موفقیت PDT وابسته به MB بود و زمانی که MB به ۵۰ - ۴۵۰ $\mu\text{g/ml}$ رسید، میکروارگانیزم‌ها به صورت کامل ریشه کن شدند.

قرار گرفتند. ۵ ماه بعد، بیوپسی‌های اطراف ایمپلنت تشریح و آماده آنالیز گردید. درصد ترمیم استخوان ۲۶/۷۰ تا ۴۸/۲۸ درصد استئواینترگریشن ۱۵/۸۳ تا ۲۵/۲۵ بسته به پوشش سطحی استفاده شده به دست آمد.

بیماری پریودنتال نتیجه از بین رفتن ساختارهای نگهدارنده دندان به وسیله فعالیت میکروارگانیزم‌های بیماریزا می‌باشد که به شدت به بافت صدمه می‌زند و موجب تخریب بافت به وسیله پاسخ‌های التهابی و ایمنی میزبان می‌گردد. Komerik و همکارانش [۶۱] اثر تولوئیدین بلو را به عنوان یک حساسگر نوری بر روی از بین بردن میکروارگانیزم‌ها در دهان موش‌های نر Sprague-Dawley (با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم) بررسی کردند. مولر ماگزیلاری در هر موش با CFU $10^8 \times 2/5$ از باکتری *P.gingivalis* آغشته شد و بلافاصله با لیزر ۴۸J و طول موج ۶۳۰ نانومتر در حضور T.B تحت تابش قرار داده شد. کاهش چشمگیر در تعداد باکتری‌ها پس از PDT مشاهده گردید و آنالیز رادیوگرافی نشان داد که تخریب استخوان در حیواناتی که تحت درمان PDT قرار گرفته بودند به مراتب کمتر از گروه کنترل بود.

Fernandes [۶۲] و deAlmeida [۶۳ و ۶۴] و همکارانشان تأثیر PDT را بر روی درمان بیماری پریودنتال با استفاده از رت‌های سالم و رت‌های با نقص ایمنی (که با دگزامتازون درمان می‌شدند) بررسی نمودند. در این مطالعه رت‌های نر Wistar (۲۳۰-۲۵۰) مورد استفاده قرار گرفتند. سیم‌هایی آلوده‌ای که روی اولین مولر مندیبولر رت‌ها گذاشته شده بود موجب ایجاد پریودنتیت گردید. PDT با متیلن بلو یا تولوئیدین بلو بر روی رت‌های سالم و رت‌های با سیستم ایمنی تضعیف شده انجام گردید. به ترتیب در روز دوم و روز هفتم پس از ایجاد عفونت، نتایج تخریب استخوان در گروهی که PDT بر روی آن‌ها انجام شده بود نسبت به گروه کنترل کمتر بود. به علاوه PDT نسبت به Scaling&Root Planing در رت‌هایی که از دگزامتازون استفاده می‌کردند، اثر درمانی بهتری نشان داد [۶۲].

تولوئیدین بلو به صورت موضعی بر روی زخم به کار رفت و پس از آن تحت تابش لیزر دیود ۳۵۶ نانومتر و 48 J/cm^2 قرار گرفت. پس از آنکه نور به 48 J/cm^2 رسید، تقریباً ۹۷ درصد باکتری‌ها از بین رفتند. بهبود زخم تسریع یافته در گروهی که با PDT درمان شده بودند نسبت به گروه درمان نشده مشاهده گردید.

Lin و همکارانش [۶۷] تأثیر PDT با تولوئیدین بلو را بر عفونت زخم‌های دهانی رت بررسی نمودند. رت‌های نر Wistar با وزن ۱۵۰-۱۸۰ گرم در این مطالعه شرکت داده شدند. زخم‌ها در قسمت کام ناحیه مولر اول ماگزایلا، لته و بافت همبند زیرین ناحیه ایجاد شد. پس از اینکه رگ‌های خونی بسته شد، $20 \mu\text{l}$ streptococcus spp. یا سوسپانسیون اکتینومایسس ویسکوز شامل $2 \times 10^8 \text{ CFU}$ در زخم تزریق شد. ۲۴ ساعت پس از ایجاد عفونت، ۱۰ میلی‌متر محلول

References

- Bell SG. Antibiotic resistance: is the end of an era near? Neonatal Netw 2003; 22: 47-54.
- Poole MD. Are we facing the end of the antibiotic era? Ear Nose Throat J 1993; 72: 433.
- Harrison JW, Svec TA. The beginning of the end of the antibiotic era? Part II. Proposed solutions to antibiotic abuse. Quintessence Int 1998; 29: 223-9.
- Mroz P, Hamblin MR. Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical. Norwood, MA: Artech House; 2008.
- Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. J Photochem Photobiol B 1997; 39: 1-18.
- O'Riordan K, Sharlin DS, Gross J, Chang S, Errabelli D, Akilov OE, Kosaka S, Nau GJ, Hasan T. Photoinactivation of Mycobacteria in vitro and in a new murine model of localized Mycobacterium bovis BCG-induced granulomatous infection. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1828-34.
- Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. Photochem Photobiol Sci 2004; 3: 412-8.
- Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. Int Endod J 2008; 41: 227-39.
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004; 3: 436-50.
- Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. Mini Rev Med Chem 2009; 9: 947-83.
- Tang HM, Hamblin MR, Yow CM. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. J Infect Chemother 2007; 13: 87-91
- Lauro FM, Pretto P, Covolo L, Jori G, Bertoloni G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. Photochem Photobiol Sci 2002; 1: 468-70.
- Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. Anticancer Res 2003; 23: 3591-600.
- Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. Photochem Photobiol 1992; 55: 89-96.
- Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 522-7.
- Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, van Lier J. Photosensitizing activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on Escherichia coli. FEMS Microbiol Lett 1990; 59: 149-55.
- Lazzeri D, Rovera M, Pascual L, Durantini EN. Photodynamic studies and photoinactivation of Escherichia coli using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. Photochem Photobiol 2004; 80: 286-93.
- Segalla A, Borsarelli CD, Braslavsky SE, Spikes JD, Roncucci G, Dei D, Chiti G, Jori G, Reddi E. Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(II)-phthalocyanine. Photochem Photobiol Sci 2002; 1: 641-8.
- Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown ST. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. J Photochem Photobiol B 1996; 32: 159-64.
- Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue

- photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001; 29: 165–73.
21. Wainwright M, Crossley KB. Methylene Blue-a therapeutic dye for all seasons? *J Chemother* 2002; 14: 431–43.
 22. Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 160: 177–81.
 23. Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1542–52.
 24. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wohrle D, Schnurpfeil G, Borisova E, Avramov L. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 294: 133–40.
 25. Tegos GP, Demidova TN, Arcila-Lopez D, Lee H, Wharton T, Gali H, Hamblin MR. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem Biol* 2005; 12: 1127–35.
 26. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 941–51.
 27. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2595–601.
 28. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, Janjua S, Gad F, Hamblin MR. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorine (e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1402–10.
 29. George S, Hamblin MR, Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem Photobiol Sci* 2009; 8: 788–95.
 30. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17: 245–54.
 31. Nitzan Y, Balzam-Sudakevitz A, Ashkenazi H. Eradication of *Acinetobacter baumannii* by photosensitized agents in vitro. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 211–8.
 32. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med* 1995; 16: 272–6.
 33. Lambrechts SA, Aalders MC, Verbraak FD, Lagerberg JW, Dankert JB, Schuitmaker JJ. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B* 2005; 79: 51–7.
 34. Street CN, Pedigo L, Gibbs A, Loebel NG. Antimicrobial photodynamic therapy for the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the anterior nares. *Proc SPIE* 2009; 7380 doi: 10.1117/1112.828279.
 35. Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol* 1997; 65: 441–5.
 36. Mohr H, Knuver-Hopf J, Gravemann U, Redecker-Klein A, Muller TH. West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion* 2004; 44: 886–90.
 37. Mohr H, Redecker-Klein A. Inactivation of pathogens in platelet concentrates by using a two-step procedure. *Vox Sang* 2003; 84: 96–104.
 38. Ben-Hur E, Geacintov NE, Studamire B, Kenney ME, Horowitz B. The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines. *Photochem Photobiol* 1995; 61: 190–5.
 39. Ben-Hur E, Barshtein G, Chen S, Yedgar S. Photodynamic treatment of red blood cell concentrates for virus inactivation enhances red blood cell aggregation: protection with antioxidants. *Photochem Photobiol* 1997; 66: 509–12.
 40. Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Love B, Abels C. Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6: 545–51.
 41. Smijs TG, Bouwstra JA, Schuitmaker HJ, Talebi M, Pavel S. A novel ex vivo skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 433–40.
 42. Rocas IN, Siqueira JF, Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315–20.
 43. Millson CE, Wilson M, MacRobert AJ, Bown SG. Ex vivo treatment of gastric *Helicobacter* infection by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 1996; 32: 59–65.

44. Wood TK. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol* 2009; 11: 1–15.
45. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322: 107–31.
46. Jain A, Gupta Y, Agrawal R, Khare P, Jain SK. Biofilms, a microbial life perspective: a critical review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2007; 24: 393–443.
47. Demidova TN, Gad F, Zahra T, Francis KP, Hamblin MR. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. *J Photochem Photobiol B* 2005; 81: 15–25.
48. Rocchetta HL, Boylan CJ, Foley JW, Iversen PW, LeTourneau DL, McMillian CL, Contag PR, Jenkins DE, Parr TR. Validation of a noninvasive, real-time imaging technology using bioluminescent *Escherichia coli* in the neutropenic mouse thigh model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 129–37.
49. Francis KP, Joh D, Bellinger-Kawahara C, Hawkinson MJ, Purchio TF, Contag PR. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. *Infect Immun* 2000; 68: 3594–600.
50. Francis KP, Yu J, Bellinger-Kawahara C, Joh D, Hawkinson MJ, Xiao G, Purchio TF, Caparon MG, Lipsitch M, Contag PR. Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon. *Infect Immun* 2001; 69: 3350–8.
51. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by *in vivo* bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol.* 2002; 75: 51–7.
52. Hamblin MR, Zahra T, Contag CH, McManus AT, Hasan T. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections *in vivo*. *J Infect Dis* 2003; 187: 1717–25.
53. Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 895–902.
54. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C, Wilson M. *In vivo* killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. *BMC Microbiol* 2009; 9: 27.
55. Orenstein A, Klein D, Kopolovic J, Winkler E, Malik Z, Keller N, Nitzan Y. The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 19: 307–14.
56. Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci* 2005; 4: 503–9.
57. Dai T, Tegos GP, Lu Z, Zhiyentayev T, Franklin MJ, Baer DG, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2009.
58. Berthiaume F, Reiken SR, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML. Antibody-targeted photolysis of bacteria *in vivo*. *Biotechnology (N Y)* 1994; 12: 703–6.
59. Gad F, Zahra T, Francis KP, Hasan T, Hamblin MR. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 451–8.
60. Shibli JA, Martins MC, Nociti FH, Garcia VG, Marcantonio E. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* 2003; 74: 338–45.
61. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. *In vivo* killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 932–40.
62. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 219–28.
63. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008; 79: 2156–65.
64. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007; 78: 566–75.
65. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005; 76: 1100–5.

66. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 155–60.
67. Lin J, Bi LJ, Zhang ZG, Fu YM, Dong TT. Toluidine blue-mediated photodynamic therapy of oral wound infections in rats. *Lasers Med Sci* 2009.