

اثر کیتوزان بر کارآیی غیرفعال سازی فتودینامیکی ضد میکروبی علیه سلول های پلانکتون و بیوفیلم *Pseudomonas Aeruginosa*

خلاصه

مقدمه: غیرفعال سازی فتودینامیکی ضد میکروبی (aPDI) (antimicrobial PhotoDynamic Inactivation) روشی امیدبخش برای از بین بردن باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک از طریق تولید گونه های فعال اکسیژن با ترکیب نور و حساسگر نوری است. تاکنون راه های گوناگونی جهت افزایش نفوذپذیری غشای باکتری های گرم منفی و در نتیجه افزایش اثربخشی aPDI بر آنها توسعه یافته است. کیتوزان، پلی ساکارید خطی پلی کاتیونی دارای قابلیت ایجاد از هم گسیختگی در ساختار غشای خارجی باکتری های گرم منفی است و می تواند به عنوان افزایش دهنده پتانسیل حساسگر نوری مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین هدف ما در این مطالعه بررسی توانایی کیتوزان در بهبود و افزایش کارآیی aPDI به واسطه متیلن بلو بر روی سلول های پلانکتونی و بیوفیلم باکتری *Pseudomonas Aeruginosa* بود.

روش بررسی: در محیط آزمایشگاهی، اثر فتوتوکسیک متیلن بلو به تنهایی ($50 \mu\text{M}$)، دوز نوری (47 J/cm^2) و به همراه کیتوزان ($30 \mu\text{g/ml}$) بر روی ۵ جدایه بیمارستانی *P. aeruginosa* مطالعه شد. همچنین اثر فتوتوکسیک متیلن بلو ($200 \mu\text{M}$) و کیتوزان ($1000 \mu\text{g/ml}$) با دوز نوری 47 J/cm^2 بر روی بیوفیلم این جدایه ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: میزان کشندگی aPDI به واسطه متیلن بلو کمتر از یک لگاریتم در تعداد باکتری ها در فرم پلانکتونی و بیوفیلم بود در حالیکه aPDI به واسطه متیلن بلو و کیتوزان منجر به کاهش $2/5$ و $5/15$ لگاریتم در تعداد باکتری ها به ترتیب در فرم پلانکتونی و بیوفیلم شد.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان داد که کیتوزان سبب افزایش کارآیی aPDI به واسطه متیلن بلو علیه باکتری *P. aeruginosa* در هر دو حالت پلانکتونی و بیوفیلم شد.

واژه های کلیدی: غیرفعال سازی فتودینامیکی ضد میکروبی، کارآیی، کیتوزان، *Pseudomonas Aeruginosa*

معصومه شهبازی^۱

زهرا فکری راد^۲

نسیم کاشف^۳

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. دانشیار باکتری شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: نسیم کاشف، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۳۵۵۸
پست الکترونیک: kashf@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

افزایش باکتری‌های مقاوم به دارو در دنیا تهدیدی جدی برای درمان عفونت‌های شدید است. بنابراین، توسعه رویکردهای ضد میکروبی جدید که غیرتهاجمی و غیر سمی و همچنین مؤثرتر و سریع‌تر از آنتی‌بیوتیک‌ها باشند، بسیار ضروری است. یک جایگزین امیدبخش برای آنتی‌بیوتیک‌های فعلی، روش غیرفعال‌سازی فتودینامیکی ضد میکروبی (aPDI) است [۱]. در aPDI از استرس اکسیداتیو که ناشی از جذب نور مرئی توسط حساسگر نوری و تولید گونه‌های اکسیژن فعال به واسطه انتقال انرژی یا الکترون به اکسیژن است، استفاده می‌شود [۲ و ۳].

تغییرات ساختاری در کلاس‌های مختلف سلول‌های میکروبی می‌تواند بر اثربخشی و مکانیسم عمل aPDI بر بیمارهای مختلف تأثیر بگذارد. به عنوان مثال باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه‌های پپتیدوگلیکان ضخیم و متخلخل هستند که غشاء سیتوپلاسمی را احاطه کرده‌اند در حالی که باکتری‌های گرم منفی حاوی غشای خارجی در اطراف یک لایه پپتیدوگلیکان نازک هستند و غشای سیتوپلاسمی درون باکتری قرار گرفته است [۴ و ۵]. برای انجام aPDI به‌طور کارآمد، حساسگر نوری به نفوذ در (یا حداقل اتصال به) دیواره سلولی باکتری‌ها و رسیدن به غشای پلاسمایی یا سیتوپلاسم نیاز دارد با این حال، موانع غشایی سلول باکتری، انتشار ساده حساسگر نوری به داخل سیتوپلاسم باکتریایی را محدود می‌کنند [۶ و ۷]. بنابراین aPDI در مورد باکتری‌های گرم مثبت بسیار ساده‌تر از باکتری‌های گرم منفی انجام می‌شود.

به منظور افزایش کارایی aPDI در باکتری‌های گرم منفی، راهکارهای متفاوتی توسعه یافته است [۸]. پیش تیمار با عواملی که نفوذپذیری غشای خارجی را افزایش می‌دهند، مانند نانوذرات پلی کاتیونی پلی میکسین B [۹] و EDTA [۱۰]، می‌تواند aPDI در گونه‌های گرم منفی را کارآمدتر کند. روش دومی که توسط چندین گروه پذیرفته شده است، استفاده از حساسگرهای نوری با بار مثبت است. بار مثبت به آن‌ها کمک می‌کند تا به باکتری‌هایی که بار منفی دارند متصل شوند [۱۱-۱۴]. اثر کیتوزان نیز بر کارایی aPDI به عنوان تقویت کننده پتانسیل حساسگرهای نوری مختلف مورد بررسی قرار گرفته است [۱۵ و ۱۶].

کیتوزان یک پلی ساکارید خطی پلی کاتیونی با وزن مولکولی بالا و متشکل از N-acetyl-D-glucosamine و D-glucosamine با اتصال β -1,4 است. خصوصیات کاتیونی کیتوزان منحصربه‌فرد است و ویژگی تشکیل فیلم، ایمنی و سازگاری بیولوژیک عالی سبب ایجاد کاربردهای جدید آن در زمینه‌های دارویی و زیست پزشکی مانند التیام زخم، مهندسی بافت و رهایش دارو شده است [۱۷ و ۱۸].

کیتوزان علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها فعالیت ضد میکروبی دارد [۱۹]. این فعالیت ضد میکروبی به عوامل متعدد درونی و بیرونی مانند

pH، گونه میکروارگانیسم، وجود یا عدم وجود کاتیون‌های فلزی، pKa، وزن مولکولی و درجه داستیل‌اسیون کیتوزان بستگی دارد [۲۰]. توانایی کیتوزان در افزایش نفوذپذیری غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی استفاده از آن را به عنوان ماده ضد میکروبی گسترش می‌دهد [۲۱].

Pseudomonas aeruginosa یکی از عوامل بیماری‌زای بیمارستانی مشکل‌آفرین در سراسر جهان است. درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این ارگانیسم به علت مقاومت درونی گونه‌ها (شامل نفوذپذیری کم غشاء خارجی همراه با بیان بتالاکتاماز و پمپ‌های دفع دارو) و توانایی فوق‌العاده آن در به دست آوردن مقاومت به چندین گروه از عوامل ضد میکروبی، اغلب دشوار است [۲۲]. *P. aeruginosa* همچنین قادر به ایجاد عفونت‌های بیوفیلمی مقاوم (از جمله در ریه بیمارانی دارای فیبروز کیستیک) است [۲۳]. ترکیبات ماتریکس بیوفیلیم نقش مهمی در اجتناب از مکانیسم‌های ایمنی بدن و توانایی حفاظت از باکتری‌ها در مقابل آنتی بیوتیک‌ها ایفا می‌کنند [۲۴]. به دلیل شدت عفونت‌های *P. aeruginosa* و محدودیت عوامل ضد میکروبی برای درمان آن‌ها پیدا کردن راه‌های دیگر جهت پیشگیری و درمان حیاتی است. در سال‌های اخیر، گزارش‌های بسیاری در مورد اثربخشی aPDI علیه *P. aeruginosa* منتشر و مشخص شده است که *P. aeruginosa* قادر است استرس اکسیداتیو ناشی از aPDI را تحمل کند [۲۵-۲۸]. در این باکتری، غشای بیرونی غیرقابل نفوذ (که مانع از جذب رنگ توسط سلول‌ها می‌شود) [۲۵]، بیان پمپ MexAB-OprM [۲۹]، توانایی تولید رنگدانه‌های محافظ [۲۸]، همراه با توانایی پاسخ به استرس اکسیداتیو [۳۰] ممکن است در مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از aPDI کمک کند.

بنابراین در مطالعه حاضر، اثر کیتوزان بر کارایی aPDI به واسطه متیلن‌بلو در *P. aeruginosa* در دو شکل پلانکتونی و بیوفیلیم ارزیابی شد.

روش بررسی

جدایه‌های باکتریایی و شرایط رشد

پنج جدایه *P. aeruginosa* از زخم‌های حاد سوختگی در پنج بیمار مختلف از بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری تهران دریافت شد. جدایه‌ها با آزمون‌های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند [۳۱]. جدایه‌ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار (Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴-۱۸ ساعت رشد داده شدند.

حساسگر نوری و منبع نور

متیلن‌بلو (Methylene Blue: MB) (Merck, Germany)، به عنوان حساسگر نوری استفاده شد. محلول ذخیره MB (۲۰۰ میکرومولار) در بافر فسفات (pH ۷/۲) تهیه و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون به مدت ۲ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. محلول

ذخیره برای رسیدن به غلظت های مورد نظر رقیق می شد.

منبع نور، لیزر دیود (MUSTANG-Russia) با طول موج ۶۵۰ نانومتر و توان خروجی ۳۰ میلی وات بود.

سنجش تشکیل بیوفیلم با رنگ کریستال و یوله

جدایه ها به مدت یک شب در محیط تریپتیک سوی برات (Tryptic Soy Broth: TSB) غنی شده با ۰/۲ درصد گلوکز گرمخانه گذاری و سپس با رقت ۱:۵۰ در محیط TSB تازه آماده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع تلقیح و ۱۰۰ میکرولیتر TSB تازه به هر چاهک در یک میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. میکروتیتر پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از تشکیل بیوفیلم، محیط کشت به آرامی تخلیه و هر چاهک توسط محلول استریل ۰/۹ درصد کلرید سدیم برای حذف سلول های پلانکتونی شسته شد. سپس سلول ها با استفاده از اتانول ۹۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت و با رنگ کریستال و یوله ۰/۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از چندین بار شستشو، چاهک ها در معرض هوا خشک شدند. برای تخمین کمی تراکم بیوفیلم، کریستال و یوله وارد شده به داخل بیوفیلم در اسید استیک ۱۰ درصد حل شد و شدت جذب رنگ حل شده در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه پلیت خوان (HiperionMPR4+, Germany) اندازه گیری گردید [۳۲].

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت مهار کننده بیوفیلم (Minimum Biofilm Inhibition Concentration: MBIC) برای کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۱۰۷ کیلودالتون) با درجه داستیلاسیون ۷۵-۸۵ درصد از شرکت Sigma Aldrich خریداری شد. کیتوزان در محلول اسید استیک (۱ درصد V/V) در دمای اتاق به مدت یک شب با استفاده از همزن مغناطیسی حل شد تا غلظت نهایی ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (pH ۵/۵) به دست آید. محلول پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون، استریل و با کلرید سدیم ۰/۹ درصد استریل تا غلظت مورد نظر رقیق شد [۳۳]. ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی در محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم (غلظت ۰/۵ مک فارلند) و ۹۵ میکرولیتر از محیط مولر هینتون برات به هر چاهک در میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های کیتوزان با غلظت نهایی ۳۱ تا ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تیمار گردید. MIC به عنوان پایین ترین غلظت کیتوزان مورد نیاز برای توقف کامل رشد باکتری ها پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مدت ۲۴ ساعت تعریف شد. به منظور تعیین MBIC کیتوزان، بیوفیلم باکتری همان طور که در بالا توصیف شد، آماده گشت و با محلول های کیتوزان با غلظت های نهایی ۳۱ تا ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تیمار شد و مورد ارزیابی قرار گرفت [۳۴].

غیرفعال سازی فتودینامیکی ضد میکروبی جدایه های *P. aeruginosa* در شکل پلانکتونی

۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی (۱۰۶-۱۰۷ CFU/ml) در میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و با MB (غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار) و کیتوزان (غلظت نهایی ۳۱ میکروگرم در میلی لیتر) در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس هر سوسپانسیون باکتریایی در معرض نور قرمز با شدت ۴۷ J/cm² قرار گرفت. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط نوترینت آگار با سری رقت های ۱۰ تایی پخش شد و کشت داده شد. کلنی ها پس از گرمخانه گذاری در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شمارش شدند. تمام آزمایش ها در سه تکرار انجام شد. کنترل ها شامل سوسپانسیون باکتریایی درون بافر فسفات و در تاریکی، سوسپانسیون باکتریایی که با MB یا کیتوزان در تاریکی انکوبه شده بود (سمیت در تاریکی و سمیت کیتوزان) و سوسپانسیون باکتریایی که بدون MB در معرض نور قرار گرفتند (کنترل نور) بودند.

غیرفعال سازی فتودینامیکی ضد میکروبی جدایه های *P. aeruginosa* در شکل بیوفیلم

بیوفیلم باکتریایی به صورتی که در بالا شرح داده شد، تشکیل شد. MB یا MB + کیتوزان (به ترتیب در غلظت های نهایی ۲۰۰ میکرومولار و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس چاهک ها به دقت تخلیه و بیوفیلم ها شسته شدند. بیوفیلم های تیمار شده، با نور لیزر به مدت ۱۰ دقیقه (۴۷ J/cm²) تابش شدند. بیوفیلم ها کنده و نمونه های همگن شده به صورت سریالی رقیق شدند سپس روی محیط نوترینت آگار پخش و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند.

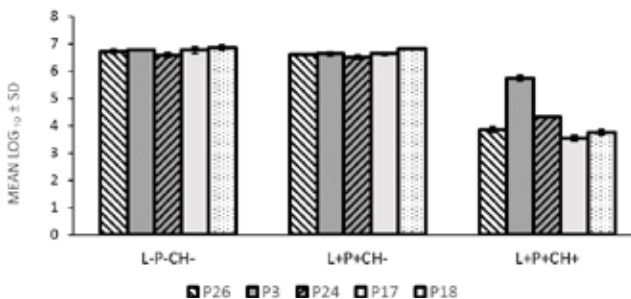
تحلیل آماری

داده ها به صورت میانگین لگاریتمی $\pm$ انحراف معیار بیان شد. مقایسه بین میانگین گروه ها با استفاده از آزمون های ANOVA یک طرفه و آزمون post hoc Tukey تجزیه و تحلیل شد. $p < 0/05$ به لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تشکیل بیوفیلم

جدول ۱ توانایی تشکیل بیوفیلم ۵ جدایه *P. aeruginosa* را بر اساس آزمون کریستال و یوله نشان می دهد. فنوتیپ تولید کننده بیوفیلم با جذب نوری بیشتر از ۱۷/۰ در طول موج ۴۹۲ نانومتر مشخص شد [۳۵]. تمام جدایه ها قادر به تولید بیوفیلم قوی بودند.



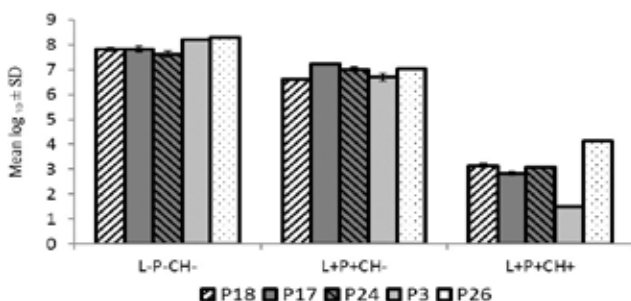
نمودار ۱: غیرفعال سازی فتودینامیکی ضد میکروبی با متیلن بلو در ۵ جدایه *P. aeruginosa* CFU/ml. ۱۰۶-۱۰۷ باکتری با غلظت ۵۰ μM از متیلن بلو یا متیلن بلو + کیتوزان (۳۱ μg/ml) تیمار شده و با دوز نوری ۴۷ J/cm² تابش شدند. (کیتوزان: CH، حساسگر نوری: P، نور لیزر: L)

غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو $6/7 \pm 0/2$ لگاریتم بود در حالی که این تعداد پس از غیرفعال سازی با متیلن بلو در حضور کیتوزان به $0/2 \pm$ رسید. غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو و کیتوزان سبب کاهش $4/1 \log$ در تعداد سلول های *P. aeruginosa* P26 نسبت به نمونه کنترل شد (تعداد سلول زنده بیوفیلم پس از تیمار $4/2 \pm 0/1$ بود). مخلوط متیلن بلو و کیتوزان در تاریکی تا حدودی برای بیوفیلم جدایه ها اثر کشندگی داشت (میانگین کاهش لگاریتمی $1/07$).

بحث

بر اساس مطالعات انجام شده به نظر می رسد که *P. aeruginosa* در برابر اثرهای کشنده aPDI تحمل دارد. روش های مختلفی برای بهبود اثربخشی aPDI در مورد باکتری ها طراحی شده است. هدف این مطالعه بررسی اثر کیتوزان بر کارایی MB-aPDI بر روی جدایه های *P. aeruginosa* به دو شکل پلانکتونی و بیوفیلم بود.

بر اساس نتایج به دست آمده غلظت ۵۰ میکرومولار MB به تنهایی با تابش 47 J/cm^2 در کاهش سلول های پلانکتونی *P. aeruginosa* ناموفق بود. در مقابل، انکوباسیون همزمان MB (۵۰ میکرومولار)



نمودار ۲: تعداد سلول های زنده در بیوفیلم جدایه های *P. aeruginosa* پس از غیرفعال سازی فتودینامیکی ضد میکروبی با متیلن بلو. غلظت نهایی متیلن بلو ۲۰۰ μM، غلظت نهایی کیتوزان ۱۰۰۰ μg/ml، دوز نوری ۴۷ J/cm². (کیتوزان: CH، حساسگر نوری: P، نور لیزر: L)

جدول ۱: توانایی تشکیل بیوفیلم ۵ جدایه *P. aeruginosa* جذب نوری کریستال ویوله در ۴۹۲ نانومتر تعیین شد و به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

جدایه های <i>P. aeruginosa</i>	جذب نوری در ۴۹۲ نانومتر
P3	$2/09 \pm 0/15$
P17	$2/59 \pm 0/42$
P18	$3/5 \pm 0/1$
P24	$3/05 \pm 0/11$
P26	$2/5 \pm 0/18$

مقادیر MIC و MBIC برای کیتوزان

مقادیر MIC برای کیتوزان در تمام پنج جدایه برابر ۶۲ میکروگرم در میلی لیتر و MBIC ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. در ادامه این مطالعه $1/2 \text{ MIC}$ و $1/2 \text{ MBIC}$ کیتوزان (به ترتیب ۳۱ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) برای سلول های پلانکتونی و بیوفیلم در نظر گرفته شدند.

اثر ضد باکتریایی MB-aPDI در حضور و عدم حضور کیتوزان

هیچ گونه اثر کشندگی به واسطه تابش نور یا MB به تنهایی مشاهده نشد (داده ها نشان داده نشده است). تعداد باکتری ها کاهش قابل ملاحظه ای در حضور MB + کیتوزان، در تاریکی در مقایسه با کنترل های تیمار نشده نشان ندادند ($p > 0/05$). مطابق نمودار ۱، غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو منجر به کاهش قابل توجهی در شمارش تعداد باکتری های زنده هر جدایه در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار نشد ($p > 0/05$). در حالیکه نتایج غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو به همراه کیتوزان سبب کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری ها از ۱ تا ۳ لگاریتم شد. به عنوان مثال تعداد باکتری های زنده جدایه *P. aeruginosa* P3 پس از غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو $6/6 \pm 0/1$ لگاریتم بود، در حالیکه این تعداد پس از غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو و کیتوزان به $5/7 \pm 0/1$ لگاریتم رسید. جدایه *P. aeruginosa* P17 در مقابل غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو و کیتوزان نسبت به سویه P3 حساس تر بود (تعداد سلول زنده پس از تیمار برابر $3/5 \pm 0/06$ لگاریتم بود).

اثر ضد بیوفیلم MB-aPDI در حضور و عدم حضور کیتوزان

همان طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو در حضور کیتوزان اثر ضد بیوفیلمی قابل ملاحظه ای داشت ($p < 0/001$ ، میانگین کاهش لگاریتمی $15/5$ در بیوفیلم جدایه های *P. aeruginosa*). در حالی که غیرفعال سازی فتودینامیکی با متیلن بلو به تنهایی میانگین کاهش لگاریتمی $1/04$ را در بیوفیلم ها نشان داد. به عنوان مثال تعداد سلول های زنده در بیوفیلم *P. aeruginosa* P3 پس از

نوری با کیتوزان تیمار شدند. اثر قارچ کشی کیتوزان بر روی سلول های آسیب دیده ناشی از غیرفعال سازی نوری به خوبی مشهود بود [۴۷].

مطالعات متعددی اثر ضد میکروبی فرمول های مختلف کیتوزان را به تنهایی و در ترکیب با aPDI بر روی سلول های پلانکتونی و بیوفیلم ارزیابی کرده اند [۱۶، ۱۵ و ۵۳-۴۸]. داراب پور و همکاران، اثر نانوذرات کیتوزان را بر کارایی aPDI به واسطه MB بر بیوفیلم *P. aeruginosa* بررسی کردند. aPDI به واسطه مخلوطی از نانوذرات کیتوزان و MB اثر غیرفعال سازی قابل توجهی علیه بیوفیلم باکتری نشان داد در حالی که aPDI ناشی از MB به تنهایی باعث کاهش تعداد سلول ها کمتر از ۱ لگاریتم شد [۱۶]. Chen و همکاران نیز نانوذرات کیتوزان را به همراه اریتروزین (ER) برای اثربخشی aPDI بر سلول های پلانکتونی و بیوفیلم *Streptococcus mutans*، *P. aeruginosa* و *Calbicans* آزمایش کردند. این سلول ها پس از تیمار با نانوذرات کیتوزان و ER یا ER به تنهایی، در معرض تابش نور قرار گرفتند. اثر فتوتوکسیک نانوذرات کیتوزان به همراه ER به طور معنی داری بیشتر از ER در فرم آزاد بود [۵۳]. بنابراین به طور کلی، این مطالعات نشان می دهند که کاربرد همزمان aPDI و کیتوزان برای ریشه کن کردن عفونت های میکروبی بسیار امیدوار کننده است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می دهد، کیتوزان که ترکیبی ارزان و غیرسمی است، می تواند اثرهای فتوتوکسیک متیلن بلو را بر روی جدایه های بالینی *P. aeruginosa* در فرم پلانکتونی و بیوفیلم افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تهران انجام شده است.

و کیتوزان (۳۱ میکروگرم در میلی لیتر) با همان شدت تابش نور، سبب کاهش ۲/۵ لگاریتم در جدایه ها شد. نتایج نشان دهنده افزایش اثربخشی MB-aPDI به وسیله کیتوزان در سلول های پلانکتونی *P. aeruginosa* است. این نتیجه ممکن است به علت توانایی کیتوزان در افزایش نفوذپذیری غشای بیرونی باکتری ها و تسهیل ورود MB به درون سلول ها باشد.

MB (۲۰۰ میکرومولار) قادر به غیرفعال کردن سلول های بیوفیلم *P. aeruginosa* به همراه تابش نور بود. مطالعات نشان داده است که باکتری ها در شکل بیوفیلم در مقایسه با اشکال پلانکتونی نسبت به عملکرد aPDI مقاوم تر هستند [۳۶ و ۳۷]. در حقیقت سلول های درون بیوفیلم از نظر برخی ویژگی ها مانند میزان رشد، ترکیب دیواره سلولی و وجود آدهسین بین سلولی پلی ساکاریدی با سلول های پلانکتونی متفاوت هستند که ممکن است جذب حساسگر نوری و نفوذ نور را مختل کنند و فرآیند حساسیت به نور را کاهش دهند [۳۴، ۳۸ و ۳۹]. از سوی دیگر، مطالعات نشان داده است که پمپ های دفع دارو در بیوفیلم های باکتریایی بسیار فعال هستند و حساسگرهای فنوتیازینیوم مانند MB سوبسترای این پمپ ها در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد [۴۰].

در این مطالعه، به منظور بهبود کارایی aPDI با استفاده از MB در باکتری *P. aeruginosa* در حالت بیوفیلم از کیتوزان که پلی ساکاریدی خطی و پلی کاتیونی است، استفاده کردیم. کیتوزان به عنوان عامل ضد بیوفیلم در مطالعات مختلف به تنهایی یا در ترکیب با سایر مواد ضد میکروبی استفاده شده است [۴۵-۴۱].

در این مطالعه MB (در غلظت نهایی ۲۰۰ میکرومولار) سمیت در تاریکی نشان نداد، در حالی که MB و کیتوزان (۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) سمیت تاریکی حدود ۱/۰۷ لگاریتم نشان دادند که ممکن است به علت فعالیت ضد بیوفیلم/ضد باکتری کیتوزان باشد. aPDI به واسطه MB و کیتوزان بر روی بیوفیلم از پیش تولید شده باکتری، کاهش لگاریتمی ۷/۰۴ - ۴/۱۴ در مقایسه با کنترل نشان داد. ممکن است کیتوزان سبب افزایش حساسیت باکتری های درون بیوفیلم به اثرهای فتوتوکسیک MB با تسهیل ورود آن به داخل بیوفیلم *P. aeruginosa* شده باشد. اگرچه ما این فرضیه را به طور خاص آزمایش نکرده ایم.

در مطالعه Gsponer و همکاران، اثر کیتوزان بر جذب پورفیرین و غیرفعال سازی نوری *Escherichia coli* با این حساسگر بررسی شد. کیتوزان، مقدار پورفیرین (TPPS 4-) متصل شده به باکتری را افزایش داد در عین حال غیرفعال سازی این باکتری در حضور کیتوزان با موفقیت انجام شد [۴۶]. در مطالعه Chein و همکاران نیز اثر کیتوزان بر افزایش کارایی غیرفعال سازی نوری تولویدن بلو بر *Candida albicans* در دو حالت پلانکتون و بیوفیلم بررسی شد. در این مطالعه سلول ها بعد از اثر غیرفعال سازی

References:

1. Kashef N, Huang Y-Y, Hamblin MR. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics*. 2017; 6(5): 853-79.
2. Huang L, Szcwcyk G, Sarna T, Hamblin MR. Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using Photofrin. *ACS infectious diseases*. 2017; 3(4): 320-8.
3. Kashef N, Hamblin MR. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resistance Updates*. 2017; 31: 31-42.
4. Bourré L, Giuntini F, Eggleston IM, Mosse CA, MacRobert AJ, Wilson M. Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2010; 9(12): 1613-20.
5. F Sperandio F, Huang Y-Y, R Hamblin M. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. Recent patents on anti-infective drug discovery. 2013; 8(2): 108-20.
6. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, van Lier JE. Photosensitizing activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios*. 1992; 71(286): 33-46.
7. Maisch T, Szeimies R-M, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2004; 3(10): 907-17.
8. Oniszczyk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy [PDT]—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 83: 912-29.
9. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1992; 14(3): 262-6.
10. Bertolini G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Van Lier J. Photosensitizing activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*. 1990; 71(1-2): 149-55.
11. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2004; 3(5): 436.
12. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villaneuva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1996; 32(3): 153-7.
13. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1996; 32(3): 159-64.
14. Hamblin MR, O'donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49(6): 941-51.
15. Camacho-Alonso F, Julián-Belmonte E, Chiva-García F, Martínez-Beneyto Y. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy and chitosan in root canals experimentally infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Photomedicine and laser surgery*. 2017; 35(4): 184-9.
16. Darabpour E, Kashef N, Mashayekhan S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2016; 14: 211-7.
17. Tsai T, Chien H-F, Wang T-H, Huang C-T, Ker Y-B, Chen C-T. Chitosan augments photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; 55(5): 1883-90.
18. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*. 2006; 31(7): 603-32.
19. Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003; 4(6): 1457-65.
20. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*. 2010; 144(1): 51-63.
21. Helander I, Nurmiäho-Lassila E-L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*. 2001; 71(2-3): 235-44.
22. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*. 2009; 58(9): 1133-48.

23. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future microbiology*. 2010; 5(11): 1663-74.
24. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318-22.
25. Philippova TO, Galkin BN, Zinchenko OY, Rusakova MY, Ivanitsa VA, Zhilina ZI. The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2003; 7(11): 755-60.
26. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin [e6] for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(4): 1402-10.
27. Kashef N, Borghei YS, Djavid GE. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2013; 10(2): 150-5.
28. Orlandi VT, Bolognese F, Chiodaroli L, Tolker-Nielsen T, Barbieri P. Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. *Microbiology*. 2015; 161(12): 2298-309.
29. Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52(9): 3202-9.
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): 4533-44.
31. Dworkin M. *The Prokaryotes Proteobacteria: Gamma Subclass*: Springer Science & Business Media; 2006: 6.
32. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52(1): 299-305.
33. Costa E, Silva S, Pina C, Tavaría F, Pintado M. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. *Anaerobe*. 2012; 18(3): 305-9.
34. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
35. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(5): 1379-88.
36. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005; 49(6): 2329-35.
37. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers in surgery and medicine*. 2001; 29(2): 165-73.
38. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *European journal of oral sciences*. 2006; 114(1): 64-9.
39. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(6): 2173-8.
40. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochemistry and photobiology*. 2010; 86(6): 1343-9.
41. Silva-Dias A, Palmeira-de-Oliveira A, Miranda I, Branco J, Cobrado L, Monteiro-Soares M. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Medical microbiology and immunology*. 2014; 203(1): 25-33.
42. Bresler ML, Felipe V, Bohl LP, Orellano MS, Isaac P, Conesa A. Chitosan and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy against different lifestyle of coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from chronic bovine mastitis. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 5081.
43. Lara HH, Guisbiers G, Mendoza J, Mimun LC, Vincent BA, Lopez-Ribot JL. Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against *Candida albicans* biofilms. *International journal of nanomedicine*. 2018; 13: 2697.

44. Xie T, Liao Z, Lei H, Fang X, Wang J, Zhong Q. Antibacterial activity of food-grade chitosan against *Vibrio parahaemolyticus* biofilms. *Microbial pathogenesis*. 2017; 110: 291-7.
45. Reighard KP, Hill DB, Dixon GA, Worley BV, Schoenfisch MH. Disruption and eradication of *P. aeruginosa* biofilms using nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides. *Biofouling*. 2015; 31(9-10): 775-87.
46. Gsponer NS, Spesia MB, Durantini EN. Effects of divalent cations, EDTA and chitosan on the uptake and photoinactivation of *Escherichia coli* mediated by cationic and anionic porphyrins. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2015; 12(1): 67-75.
47. Chien HF, Chen CP, Chen YC, Chang PH, Tsai T, Chen CT. The use of chitosan to enhance photodynamic inactivation against *Candida albicans* and its drug-resistant clinical isolates. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14(4): 7445-56.
48. Frade ML, de Annunzio SR, Calixto GMF, Victorelli FD, Chorilli M, Fontana CR. Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*. *Molecules*. 2018; 23(2): 473.
49. Peng P-C, Hsieh C-M, Chen C-P, Tsai T, Chen C-T. Assessment of photodynamic inactivation against periodontal bacteria mediated by a chitosan hydrogel in a 3D gingival model. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17(11): 1821.
50. Fabio CA, Yolanda MB, Carmen GM, Francisco C, Antonio Julián B, Leonor PL. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2016; 45(8): 627-33.
51. Chen C-P, Hsieh C-M, Tsai T, Yang J-C, Chen C-T. Optimization and evaluation of a chitosan/hydroxypropyl methylcellulose hydrogel containing toluidine blue O for antimicrobial photodynamic inactivation. *International journal of molecular sciences*. 2015; 16(9): 20859-72.
52. Shrestha A, Cordova M, Kishen A. Photoactivated polycationic bioactive chitosan nanoparticles inactivate bacterial endotoxins. *Journal of endodontics*. 2015; 41(5): 686-91.
53. Chen CP, Chen CT, Tsai T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: characterization and in vitro investigation. *Photochemistry and Photobiology*. 2012; 88(3): 570-6.