

کاربرد فتودینامیک تراپی در عفونت‌های موضعی

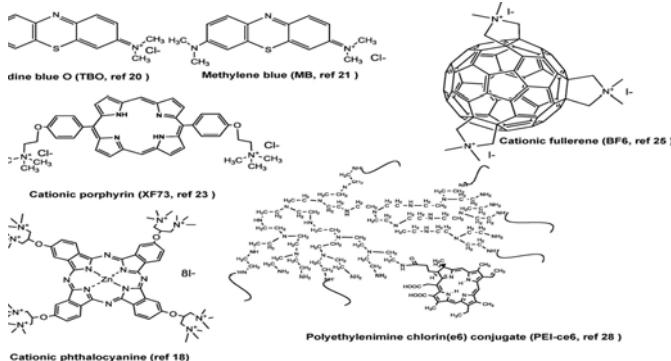
ترجمه: سیده آسیه رحیمی، دندانپزشک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

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

مقدمه

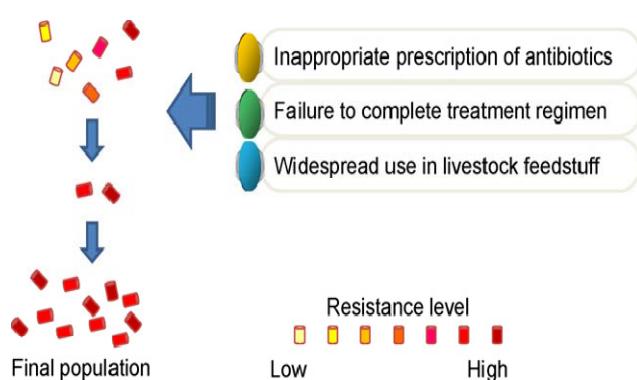
فتودینامیک تراپی شامل استفاده از رنگ‌های غیررسمی یا مواد حساس به نور^۲ در ترکیب با نور غیرمضمر مرئی است که به کارگیری نور در طول موج خاصی می‌تواند موجب تحریک PS گردد [۴]. PS تحریک شده در حضور اکسیژن، انرژی یا الکترون‌ها را به مولکول اکسیژن انتقال می‌دهد که به تولید فرآورده‌های اکسیژن تحریکی (ROS) مانند اکسیژن منفرد (Single) و یا رادیکال‌های هیدروکسیل (OH·) می‌انجامد. این گونه‌ها توانایی کشتن سلول‌ها را دارا می‌باشند [۵]. کشته شدن میکرووارگانیسم‌های پاتوژن پروسه، غیرفعال کردن فتودینامیکی^۳ (PDI) [۶] یا فرآیند حذف به واسطه نور^۴ (PAD) همچنین در زمینه دندانپزشکی، گندزدایی به واسطه نور^۵ (PAD) نامیده می‌شود [۸].

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^۶ 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) [۲]. افزایش گونه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک موجب گردیده است که تحقیقات وسیعی برای یافتن درمان‌های ضدباکتریایی حایگزین 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 Photosensitizer

³ Photodynamic inactivation

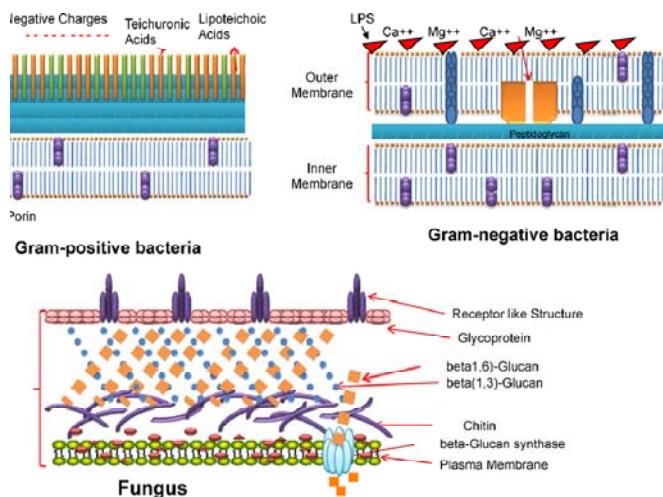
⁴ Lethal Photosensitization

⁵ Photo-activated disinfection

⁶ Efflux pumps

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

روش دیگری که به وسیله Bertoloni [۱۶] و همکارانش انجام شد استفاده از EDTA برای تجزیه LPS یا القاء توانایی انجام PDI به وسیله هماتوپورفیرین یا فتالوسیانین بر روی E.coli و *C. jejuni* 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 به وسیله اتم های نیتروژن چهارتاوی ایجاد می شود [۱۷-۱۹]. رنگ های فنوتیازینوم مانند تولوئیدین بلو O [۲۰]، متیلن بلو [۲۱] و رنگ های Azure [۲۲]، بر روی دامنه وسیعی از باکتری های gr^+ و gr^- و سلول های قارچی به کار برده می شوند. حساسگرهای نوری تترابیرون کاتیونیک حاوی گروه های چهارتاوی براساس شالوده هایی مانند پورفیرین ها [۱۷ و ۲۳]، فتالوسیانین ها [۱۸ و ۲۲] و حتی مولکول های اسفلریکال C60 [۲۵] ساخته شده اند. آخرین روشی که مورد بحث قرار می گیرد شامل اتصالات کوالانتی یک حساسگر نوری غیرکاتیونیک مانند کلرین (6) به یک مولکول پلیمر حاوی گروه های آمین مانند پلی لیزین [۲۶ و ۲۷] یا پلی اتیلن آمین [۲۸] می باشد. شکل ۳ فرمول ساختاری ۶ مولکول مورد بحث را نشان می دهد که دارای گروه های پایه یا کاتیونیک می باشند و بسیار فعال هستند. تصور می شود که مکانیسم فعالیت های همه حساسگرهای نوری یا حساسگرهای پلیمری کوئنزوگه شده به صورت «روش جذب خودانگیخته» [۲۹] می باشد. در این پروسه ابتدا مولکول های کاتیونیک، mg^{2+} و ca^{2+} را از غشاء خارجی که از آن به عنوان یک لنگرگاه برای مولکول های LPS با شارژ منفی استفاده می کنند،

که PDI را بر روی باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک انجام داده اند، یافتند که از نظر حساسیت به PDI این باکتری ها شبیه به انواع غیر مقاوم [۱۰] و یا حساس تر از آن ها می باشند [۱۱]. به علاوه هنوز امکان ایجاد باکتری های مقاوم به PDI وجود ندارد [۱۲].

PDI همواره برای عفونت های موضعی به کار می رود نه برای عفونت های سیستمیک مانند باکتریمیا. کاربرد PDI در سرطان به صورتی است که PS در جریان خون تزریق می شود و در تومور تجمع می یابد. اعتقاد ما بر این است که در عفونت های موضعی می توان از روش های آزادسازی PS مانند به کار گیری موضعی ماده، تزریق تدریجی، تزریق بینابینی و یا آزادسازی آتروسل ها استفاده نمود. مسئله کلیدی که می توان به آن اشاره کرد تأثیر درمان در تخریب تعداد زیادی از پاتوژن های ایجاد کننده بیماری و ویژگی انتخاب گری مؤثر حساسگر نوری نسبت به میکروب در مقابل سلول های پستانداران است که می تواند تخریب کمتر بافت میزان را در پروسه درمان در پی داشته باشد و از رشد مجدد تعداد کمی از باکتری های باقی مانده جلوگیری نماید.

از اوایل قرن گذشته که PDT شناخته شده است میکروب های خاصی با استفاده از ترکیب نور و حساسگر نوری در invitro از بین رفته اند [۱۳]. در طی سال های اخیر گزارش های دیگری مبنی بر باکتری های 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 باکتری های gr^+ و gr^- مشاهده گردید [۱۴]. به طور کلی یافت شد که مولکول های PS کاتیونیک، آئیونیک یا خنثی می توانند تأثیر به سرایی PS بر روی مرگ باکتری های gr^+ داشته باشند، در حالی که تنها کاتیونیک یا شیوه هایی که بتوانند سد نفوذ پذیری باکتری گرم منفی را به ترکیبات حساسگر نوری غیر کاتیونی نفوذ پذیر نمایند، می توانند دهها هزار از سوش های گرم منفی را از بین ببرند. این تفاوت در حساسیت این دو گونه باکتریایی به وسیله فیزیولوژی آن ها توضیح داده می شود. باکتری های gr^+ یک غشاء سیتوپلاسمی نسبتاً متخلخل دارند که با پتیدو گلیکان و لیپوتیکوئیک اسید احاطه شده است و اجازه عبور PS را می دهد. پوشش سلولی باکتری های gr^- شامل یک غشاء سیتوپلاسمی داخلی و یک غشاء خارجی است که به وسیله پتیدو گلیکان های حاوی پری پلاسم جدا شده اند. غشاء خارجی، یک سد نفوذی مؤثر بین سلول و محیط را تشکیل می دهد و به کاهش باند و نفوذ PS تمایل دارد [۱۵]. دیواره سلول های قارچی لایه نسبتاً ضخیم بتا گلکان و کیتین دارند که یک سد نفوذی متوسط (بین باکتری های گرم منفی و گرم مثبت) می باشد (شکل ۲).

تاکنون PDI به چندین روش بر روی باکتری های gr^- آزمایش شده است. Nitzan و همکارانش با استفاده از نانو پتید Cathionic Peptide Polymixin B نفوذ پذیری غشاء خارجی

^۱ Self-promoted uptake pathway

کاربرد فتوینامیک تراپی در عفونت‌های موضعی

و *c.albicans* در حضور پلاسمای انسانی و سرم و همچنین به کارگیری cationic 5-phenyl-10, 15,20-tris porphyrin chloride (N-methyl 4-pridyl) و نور سفید 30mw/cm² کاهش یافت. Street و همکارانش [۳۴] در بی پاسخ به این سؤال برآمدند که آیا PDI به وسیله متیلن بلو می‌تواند تعداد MRSA رشد کننده روی پوست مصنوعی (ساخته شده از کراتینوسیت‌های به دست آمده از اپیدرم انسانی و فیبروبلاست‌های پوستی در یک محیط کشت هوایی که منجر به تشکیل درم و اپیدرم می‌گردد و در مدل‌های با خاصیت کامل پوست اپیتلیالیزه انسانی دیده می‌شود) را کاهش دهد؟ کاربرد MB به تنهایی 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 آسودگی 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.

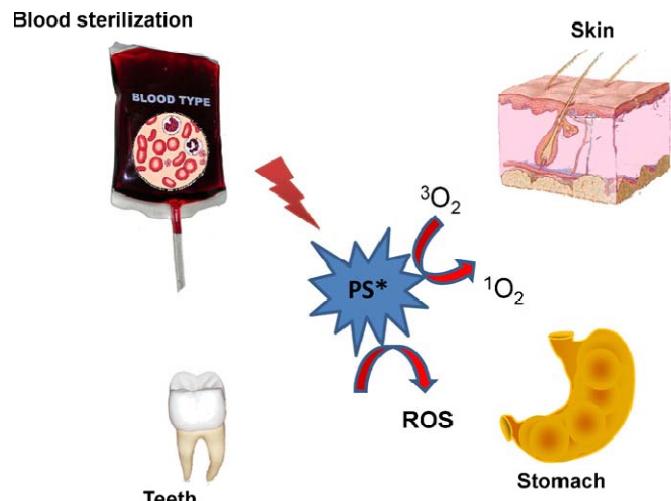
Mohr و همکارانش [۳۵] غیرفعال کردن HBV, HIV, HCV و *B10* را در محصولات پلاسمای به وسیله MB در دامنه μm گزارش نمودند. ویروس West Nile هم می‌تواند غیرفعال شود [۳۶]. رنگ تیونین در ترکیب با نور زرد و UVB برای استریل کردن غلظت‌های پلاکت استفاده می‌شود [۳۷]. Hur و همکارانش از RBC فتونوسیانین‌ها و نور قرمز برای غیرفعال کردن پاتوژن‌ها در تغییل‌شده استفاده نمودند [۳۸] RBCC نشان دادند که این شرایط می‌تواند ویروس، انگل‌های خونی (malaria) را تا سطح غیرقابل تشخیص و پلاسمودیوم فالسی پاروم (Chagas) را کاهش دهد ($>4\log_{10}\text{kill}$). از تخریب RBC در حین درمان می‌توان به وسیله افزایش شار نور تا 80 mw/cm^2 در مدت تابش نور جلوگیری بین برندۀ رادیکال‌های آزاد و ویتامین E 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 آن را 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 پانسمان بر روی پوست گذاشتند. XF73 فقط در لایه استراتوم کرنئوم وجود داشت. photoinactivation

جابه‌جا می‌نمایند و غشاء خارجی ضعیف و به آرامی نفوذ پذیر می‌شود و به دنبال آن جذب حساس‌گر نوری و تخریب سد نفوذی افزایش می‌باید [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 به وسیله پروسه اندوسیتوز جذب می‌شوند. در حالی که جذب آن‌ها توسط سلول‌های باکتری نسبتاً سریع می‌باشد. بنابراین اگر نوردهی در فاصله زمانی کوتاهی پس از به کار بردن حساس‌گر نوری انجام شود، میزان تخریب بافتی میزبان کاهش خواهد یافت.



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

پروتئین‌ها و سلول‌ها: طبق بافت‌های 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 آن را کاهش خواهد داد. Wilson & Pratten [۳۲] یافته که استاف اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در حضور آلومینیم 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*

Chlorin(e6) و Polyethylenimin 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 به تنهایی bioluminescence را در حدود ۹۰ درصد کاهش داده بود در حالی که PDT به تنهایی 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 (PDT < ۰/۰۰۵ P) بسیار کمتر از به کارگیری هر یک از آن‌ها به تنهایی خود ترشح می‌کند.

Ferret گونه‌ای از حیوانات است که به صورت طبیعی به طور متابوب 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)، تولوئیدن بلو (TBO)، فتالوسبیانین، محصولات هماتوپورفیرین و opper (5-aminolavulinic acid) اثر vapor pumped dye laser PDT را بر روی مخاط معدة خارج شده Ferret بررسی نمودند. پس از تابش نور ۲۰۰ J/cm² و استفاده از ۰/۷۵ mg/kg TBO ۰/۹۰ درصد میزان باکتری‌ها کاهش یافت. غلظت‌های ۰/۷۵ mg/kg و ۷/۵ mg/kg از MB برای *H.mustelae* سمی نبود ولی اضافه کردن نور لیزر ۲۰ J/cm² بیش از ۹۹ درصد باکتری‌ها را از بین برداشت.

PDT در عفونت‌های حیوانی

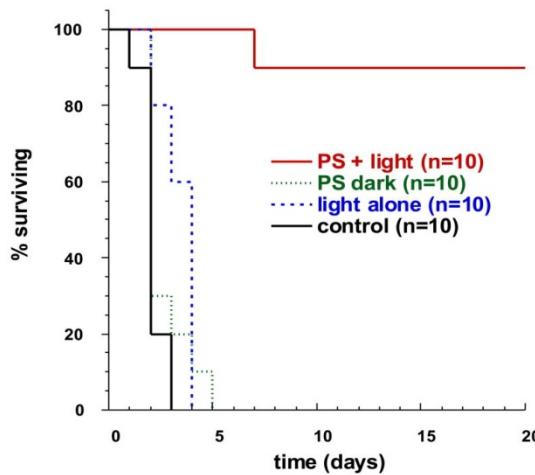
برای سال‌های طولانی اثراهای PDT در جلوگیری و درمان بیماری‌های عفونی با استفاده از ایجاد عفونت در حیواناتی مانند سگ، موش، خوک، Rat و ... مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف استفاده از حیوانات به عنوان مدل، تقلید از بیماری انسانی است. مشخص است که باکتری و قارچی که مواد غذایی خود را از سلول‌ها و بافت‌های پستانداران به دست می‌آورند، از میکروگانویسم‌هایی که در محیط کشت آزمایشگاهی رشد می‌کنند بسیار متفاوت هستند. در یک عفونت، بیان بسیاری از زن‌ها در فازی که به اصطلاح به آن "Planktonic" گفته می‌شود، به صورت لگاریتمی نسبت به فاز "Stationary" یا بیوفیلم در حال رشد افزایش می‌یابد [۴۴-۴۶]. بررسی PDT بر روی عفونت به وسیله تصاویر Bioluminecence در *invivo* و PDT در عفونت حیوانات، یکی از مشکلات مطالعات است. 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 متواالی، Plating و

اول ۱۰ \log > کاهش در *S.aureus* را در بی داشت در حالی که سوردهی در روش دوم به میزان $\log 10$ باعث کاهش رشد *S.aureus* مستقل از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک رده استفاده شده گردید.

Smijs و همکارانش [۴۱] مطالعات مشابهی مانند مطالعات ما با درماتوفیت، *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 آتشته 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 اندودونتیک بر روی دندان-های کشیده شده مطالعه گردیده است. Enterococcus faecalis یک پاتوژن بسیار شایع است که در اکثر عفونت‌های اندودونتیک راجعه دیده می‌شود [۴۲] و Fonsca و همکارانش دندان‌های تکریشه را با *E. faecalis* آلوده نمودند و آن‌ها را برای ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه کردند. پس از آن دندان‌ها را در یک محلول تولوئیدین بلو ۰/۱۲۵ درصد برای ۵ دقیقه قرار دادند و از تابش نور ۵۰ mW و ۶۶۰ nm بر روی آنها استفاده نمودند. کاهش تعداد باکتری‌ها (CFU) در گروه درمان شده حدود ۹۹/۹ درصد بود. در حالی که در گروه کنترل یک افزایش ۲/۶ 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 ۶۶۵ نانومتر، ۳۰ J/cm² را به صورت همگرا در ۳۶ درجه با طول موج منتشر می‌کرد، استفاده نمودند. پس از آن ۳۳ درصد کاهش باکتری‌ها را داشتند و پس از افزایش به ۲۲۲ J/cm²، این میزان به ۹۷ 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 به علاوه 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 تنها، ماده حساسگر نوری به تنها و درمان شده با PDT

Wong Zolifagehari [۵۴] و همکارانشان تأثیر PDT با متیلن بلو وتولوئیدین بلو را بر *Vibro vulnificus* و *S.aureus* که به متیسلین مقاوم بودند، بررسی نمودند. در هر دو مطالعه پس از تابش نور قرمز ۳۶۰-۳۶۰ J/cm² ۱۵۰-۱۵۰ log ۱۱ کاهش در تعداد باکتری‌ها مشاهده شد. مشخص شد با انجام PDT در عفونت *Vibro vulnificus* گردید. 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 اینمی، به سادگی موجبات عفونت را فراهم می‌آورد. در سال‌های گذشته تعداد زیادی از بیماران با سوختگی‌های شدید در اثر عفونت Excision فوت می‌کردند. معرفی درمان‌های آنتی‌میکروبیال موضعی، *P.aeruginosa* را به صورت چشمگیری کاهش داد. اولیه و پیوند پوست، میزان مرگ را به صورت فیلامنتوس *S.aureus*, *candida* و *P.aeruginosa* پاتوژن معمولاً مسئول ایجاد این عفونت‌ها هستند.

Orenstein و همکارانش [۵۵] با استفاده از خوک گینه‌ای تأثیر پورفیرین‌ها را برروی ریشه کن کردن *S.aureus* در سوختگی مطالعه کردند. وزن خوک‌ها ۴۰۰ گرم بود. ابتدا موهای پشت خوک‌ها تراشیده شد، سپس یک صفحه مسی 10×30 میلی‌متر و دارای یک دسته ۲۰۰ میلی‌متری را با حرارت ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد بر روی پشت خوک‌ها قرار دادند و سوختگی درجه ۳ ایجاد گردید ۱۵ دقیقه پس از سوختگی، زخم‌ها با 10^8 CFU از *S.aureus* آلوده گردیدند. پس از قرار گرفتن پورفیرین‌ها برروی زخم و یا تزریق در زخم ۹۹ درصد باکتری‌ها از 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 آسان‌کردن بررسی‌های غیرتیاهجمی عفونت مدل‌های حیوانی از روشی استفاده کردند که باکتری‌ها به صورت ژنتیکی مهندسی شده‌اند و سیستم تصویربرداری حساس به نور برای تجسس واقعی مراحل عفونت به کار می‌رود. وقتی که این باکتری‌ها در invitro تحت PDT قرار می‌گیرند، کاهش نورسانی با کاهش شکل‌گیری کلونی همراه می‌گردد. در چند موس عفونت موضعی را ایجاد کردیم و توانستیم از طریق تصویربرداری (BLI) Bioluminescence آن را بررسی نماییم [۴۷].

BLI برای یافتن یک عفونت یا بررسی اثرهای درمان‌های آنتی‌میکروبیال استفاده می‌شود. بهنظر 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 Lucinfrase operon transposon است [۵۰-۴۸]. ادغام به دارای transposon 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: ۲۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی مربوط به زخم‌های پس از جراحی است و درجه‌تی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهد. گونه‌های میکروبی شامل استاف اورئوس، آنتروکوکسی و باسیل‌های گرم منفی روده می‌باشند. بیمارانی که جراحی روده داشته‌اند یا کسانی که در نتیجه شیمی‌درمانی سرطان یا سایر داروها دچار نوترودپنی شده‌اند 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 برروی عفونت زخم‌های موش که به وسیله اشرشیا کلی و سودوموناس آتروزینوزا ایجاد شده بود، بررسی کردند. زخم‌هایی به اندازه ۱۰۰ میلی‌متر مربع روی پشت موش ایجاد شد. باکتری‌های بیولومینسنت به همراه یک پلاسمید که حاوی اپرون ژن lux charge-coupled بررسی شد. حساسگر نوری پلی‌کاتیونیک به صورت موضعی و نور قرمز با طول موج ۶۴۵ نانومتر و توان ۲۴۰ J/cm² به کار برد شد. در عفونت *P.aeruginosa* هر ۳ گروه درمان نشده در ۵ روز مردند. در مقابل ۹۰ درصد موش‌هایی که با PDT درمان شده بودند، زنده ماندند که در شکل ۵ نشان داده شده است.

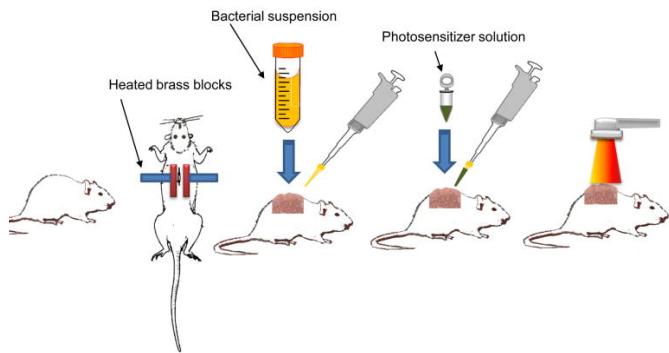
یکی از عمدترين مدل های حيواني که در عفونت های موضعی بافت نرم استفاده می گردد، تزریق سوسپانسیون باکتریابی *E.coli* و *P.aeruginosa* و *S.aureus* به داخل عضله سفت موش می باشد. antibody-targeted *Berthiaum* و همكارانش [۵۸] تأثیر photolysis را بروي از بين رفتن باكتري *P.aeruginosa* در *invivo* به وسیله ايمونو-كونزوگاسيون بررسی کردند. ابتدا آنها باكتري ها را با *Tin(IV)chlorine e6* مخلوط و سپس به آنتي-بادی مونوكلونال متصل کردند و اين مخلوط را در زير پوست پشت موش تزریق کردند. پس از عفونت، کونزوگه های ويژه و غيرويژه در محل عفونت تزریق شدند و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون محل با نوری با طول موج ۶۳۰ نانومتر و با توان ۱۰۰mw cm²، ۱۶۰۰. ۱۰۰۰ جمیع دارند باكتري هایی که تحت تأثیر کونزوگه ويژه قرار داشتند، از بين رفتن در حالی که در حيواناتي که درمان نشده بودند و يا به وسیله کونزوگه غیراختصاصي درمان شده بودند، رشد باكتريال نرمال مشاهده شد.

Gad و همكارانش [۵۹] از باكتري های با ويژگی لومينسنست استفاده نمودند و تأثیر PDT بر عفونت *S.aureus* بافت نرم را مورد بررسی قرار دادند. يك ميليون (۱۰۶) mid-log از باكتري در ۵۰ μl PBS حل شد و در دو ميليمتری داخل ماهیچه سفت موشی که دچار نوتروپني بود تزریق گردید. پس از ۲۴ ساعت PDT با ماده poly-lysine chlorine e6 انجام گردید. در گروه درمان نشده و يا آنهايی که فقط با نور درمان شده بودند کاهش لومينسنست به دوز نور وابستگی نداشت. گروهی که PDT شده بودند نسبت به گروهی که درمان نشده بودند بهبودی بهتری داشتند.

عفونت های دهانی دندانی: از آنجايی که گونه های باكتريال نسبت به آنتي-بيوتيك مقاوم شده اند دندانپزشکان اغلب به وسیله انتخاب جايگزين با رشد باكتري های پاکت پر يو-دنال و از دست دادن دندان ها مقابله می کنند. اولین نگرانی يك ايمپلنتولوژیست، التهاب اطراف ايمپلنت است. شرایط نامساعد اطراف ايمپلنت مانند خونریزی، ترشح چرك، التهاب بافت نرم (موکوزیت اطراف ايمپلنت) می تواند به تخريب متوسط تا شدید استخوان منجر گردد.

Shibli و همكارانش [۶۰] طی يك مطالعه pilot اثرهای ايمپلنت در سگ های دورگه نر (دو ساله با ميانگين وزنی ۱۸ کيلوگرام) بررسی کردند. سه ماه پس از کشیدن دندان های پره مولر در ۶ سگ دو رگه نر، ۳۶ ايمپلنت با ۴ پوشش سطحي مختلف (۹ سطح با پوشش سطحي تيتانيوم خالص، ۹ سطح تيتانيوم پلاسمـا-اسپري، ۹ سطح هييدروكسى آپاتيت و ۹ سطح اسييد اچ) جايگزين شد. پس از ۱۴ ماه، سگ ها تحت دربيدمان جراحی اطراف ايمپلنت دندانی و Lethal photosensitization به وسیله ترکيب تولوئیدين بلوز ۲۰۰ J/cm²) و پرتوتابي با يك ليزر ديود ۸۵۰ نانومتر،

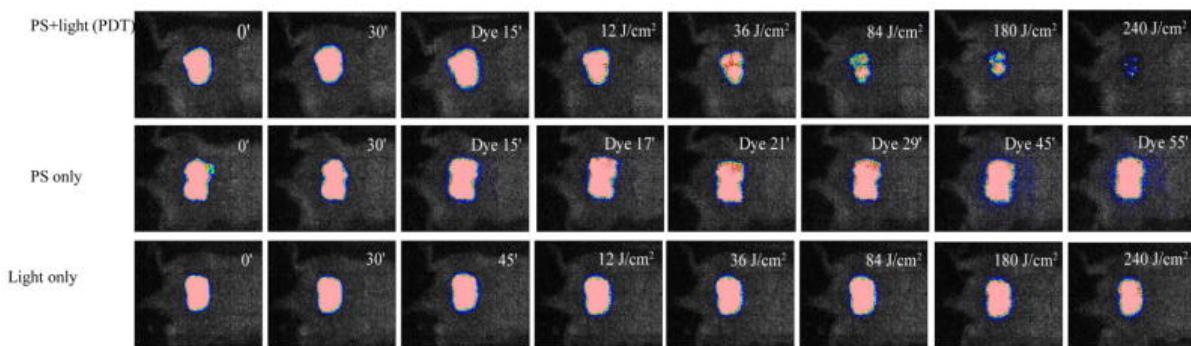
Lambrechts [۵۶] و Dia [۵۷] همكارانشان برای ارزیابي PDT بر روی عفونت های سوختگی حاصل از *A.baumannii* از موش استفاده کردند. مراحل در شکل ۶ نشان داده شده است. باگذاشتن دو بلوك برنجی گرم شده با حرارت ۹۵ درجه سانتي-گراد برای ۱۰ ثانие بروي پشت موش، يك منطقه سوختگی ۲۰۰ ميلى متر مربع ايجاد شد. ۱۰ دقيقه پس از سوختگی، زخم با *A.baumannii* و *S.aureus* پس از عفونت PDT انجام شد بيش از ۳log ۱۰ آلووده شد زمانی که *A.baumannii* غيرفعال و به وسیله آنانليز تصاویر لومينسنست ارزیابی گردید. در مدت زمان يكسانی در گروه كنترل كمتر از ۱۰ log ۱۰ کاهش لومينسنست باكتريابي مشاهده شد و لومينسنست باكتريابي گروهی که فقط نور دريافت کرده بودند در همين زمان ۲ برابر افزایش داشت. زمانی که ۲۴ ساعت پس از ايجاد عفونت PDT انجام شد، بيش از ۱۰ log ۱۰ هر دو باكتري *A.baumannii* و *S.aureus* ترميم زخم را در سوختگی های آلووده شده با *A.baumannii* به تأخير نينداخت اما، در مورد PDT در سوختگی های آلووده شده با *S.aureus* اين تأخير مشاهده گردید.



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

عفونت های بافت نرم: اگرچه عفونت های بافت نرم نسبتاً اندک می باشند اما، آنها می توانند نتایج تخرب کننده ای در پی داشته باشند. گسترش می تواند سریع باشد، میزان مرگ و میر بالاست (بیش از ۵۰٪ درصد) و جراحی های فلچ کننده متناسب تنها راه متوقف کردن این بیماری است. این گروه عفونت ها شامل التهاب فاسیای نکروزه کننده (*S.aureus*، استرپتوکوکسی یا گونه های پلی میکروبیال) gangrene (گونه های کلستریدیوم)، سلولیت های نکروز کننده و (مخلوطی از هوازی و بی هوازی) Fournier's gangrene می باشد. در این عفونت ها برش های مکرر بافت عفونی ضروری است و PDT می تواند در کاهش میزان التهاب باكتري ها و وسعت دربیدمان جراحی سهم عمده ای داشته باشد.

کاربرد فتوینامیک تراپی در عفونت‌های موضعی



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

Sigusch و همکاران [۶۵] مطالعه‌ای برروی در PDT عفونت‌های پریودنتال سگ‌های شکاری انجام دادند. ناحیه زیر لثه حیوانات با *P.gingivalis* و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم آلوده شد. دو حساسگر نوری e6 و chlorine e6 به کار برده شدند. پروسه PDT با هریک از حساسگرهای نوری و نور لیزر ۶۲۴ نانومتر سبب کاهش چشمگیر علایم التهاب مانند قرمزی و Bop در مقایسه با گروه کنترل گردید. PDT با chlorine e6 با PDT با BLC1010 هیچ گردید، در حالی که پس از PDT با BLC1010 با P.*gingivalis* کاهشی دیده نشد. فوزوباکتریوم نوکلئاتوم می‌تواند با chlorine e6، 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 شایع‌ترین نماهای بالینی عفونت HIV می‌باشد که در ۸۴٪ بیماران مبتلا مشاهده می‌گردد. به نظر می‌آید که یک پیشگویی کننده غیروابسته نقص ایمنی در بیماران مبتلا به ایدز می‌باشد. کاندیدا آلبیکنس بیشترین ارگانیسم 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 میکروارگانیسم‌ها آلوده شده بودند به ۵۰۰ µg/ml در غلظت‌های متفاوتی از ۰/۰۰ میلی‌متر MB آغشته شد. پس از ۱۰ دقیقه موش‌ها تحت تابش لیزر دیود ۶۴۶ نانومتر با یک دیفیوزر سیلندریکال قرار گرفتند. نتایج نشان داد که موفقیت PDT وابسته به MB بود و زمانی که MB به ۵۰۰ µg/ml رسید، میکروارگانیسم‌ها به صورت کامل ریشه‌کن شدند.

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

بیماری پریودنتال نتیجه از بین رفتان ساختارهای نگهدارنده دندان به وسیله فعالیت میکروارگانیسم‌های 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 برروی از بین بردن میکروارگانیسم‌ها در دهان موش‌های نر Sprague-Dawley (با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم) بررسی کردند. مولر ماجیزیلاری در هر موش با CFU ۱۰۸ از باکتری *P.gingivalis* آغشته شد و بلا فاصله با لیزر ۴۸J و طول موج ۳۰۶ 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 deAlmeida [۶۴] و [۶۲] تأثیر PDT را برروی درمان بیماری پریودنتال با استفاده از رت‌های سالم و رت‌های با نقص ایمنی (که با دگزاماتازون درمان می‌شوند) بررسی نمودند. در این مطالعه رت‌های نر Wistar (۳۳۰-۲۵۰) مورد استفاده قرار گرفتند. سیم‌هایی آلودهای که روی اولین مولر مندیبول رت‌ها گذاشته شده بود موجب ایجاد پریودنتیت گردید. PDT با متیلن بلو یا تولوئیدین بلو ۰ برروی 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 بروی آنها انجام شده بود نسبت به گروه کنترل کمتر بود. به علاوه PDT نسبت به Scaling&Root Planing در رت‌هایی که از دگزاماتازون 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 ۴۸ J/cm² در حدود ۶۳۵ نانومتر و ۴۸ J/cm² قرار گرفت. پس از آنکه نور به ۴۸ J/cm² رسید، تقریباً ۹۷ درصد باکتری ها از بین رفتند. بهبود زخم تسريع 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 زخم های دهانی رت بررسی نمودند. رت های نر Wistar با وزن ۱۸۰-۱۵۰ گرم در این مطالعه شرکت داده شدند. زخم ها در قسمت کام ناحیه مولر اول ماگزیلا، لنه و بافت همبند زیرین ناحیه ایجاد شد. پس از اینکه رگ های خونی بسته شد، ۲۰ µl streptococcus spp. ۲×۱۰⁸ CFU در زخم یا سوسپانسیون اکتینومایسین ویسکوز شامل ۱۰⁸ میلی متر محلول تزریق شد. ۲۴ ساعت پس از ایجاد عفونت، ۱۰ میلی متر 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, Guterman 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, Schnurpeil 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-Sudakovitz 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. Komerk 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.