لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۷، دورهٔ ۱۵، شمارهٔ ٤، صفحات: ۹-۲ .

مقاله پژوهشی

اثر کیتوزان بر کارآیی غیرفعال‌سازی فتودینامیکی ضدمیکروبی علیه سلول‌های پلانکتون و بیوفیلم Pseudomonas Aeruginosa

معصومه شهبازی [۱]
زهرا فکری راد [۲]
نسیم کاشف [۳]

خلاصه

مقدمه: غیرفعال سازی فتودینامیکی ضدمیکروبی **aPDI** (**antimicrobial PhotoDynamic Inactivation**) روشی امیدبخش برای از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ازطریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن با ترکیب نور و حساسگر نوری است. تاکنون راه‌های گوناگونی جهت افزایش نفوذپذیری غشای باکتری‌های گرم‌منفی و درنتیجه افزایش اثربخشی **aPDI** بر آن‌ها توسعه یافته است. کیتوزان، پلی‌ساکارید خطی پلی‌کاتیونی دارای قابلیت ایجاد از هم گسیختگی در ساختار غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی است و می‌تواند به‌عنوان افزایش‌دهندهٔ پتانسیل حساسگر نوری مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین هدف ما در این مطالعه بررسی توانایی کیتوزان در بهبود و افزایش کارآیی **aPDI** به‌واسطهٔ متیلن‌بلو برروی سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلم باکتری **Pseudomonas Aeruginosa** بود.

روش بررسی: در محیط آزمایشگاهی، اثر فتوتوکسیک متیلن‌بلو به‌تنهایی (۵۰ µM، دوز نوری ۴۷ J/cm^2) و به‌همراه کیتوزان (۳۰ µg/ml) برروی ۵ جدایهٔ بیمارستانی P. aeruginosa مطالعه شد. همچنین اثر فتوتوکسیک متیلن‌بلو (۲۰۰ µM) و کیتوزان (۱۰۰۰ µg/ml) با دوز نوری ۴۷ J/cm^2 برروی بیوفیلم این جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان کشندگی **aPDI** به‌واسطهٔ متیلن‌بلو کمتراز یک لگاریتم در تعداد باکتری‌ها در فرم پلانکتونی و بیوفیلم بود درحالیکه **aPDI** به‌واسطهٔ متیلن‌بلو و کیتوزان منجر به کاهش ۲/۵ و ۵/۱۵ لگاریتم در تعداد باکتری‌ها به‌ترتیب در فرم پلانکتونی و بیوفیلم شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که کیتوزان سبب افزایش کارآیی aPDI به واسطهٔ متیلن‌بلو علیه باکتری P. aeruginosa در هر دو حالت پلانکتونی و بیوفیلم شد.

واژه‌های کلیدی: غیرفعال‌سازی فتودینامیکی ضدمیکروبی، کارآیی، کیتوزان، Pseudomonas Aeruginosa

۱. *کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

۲. *دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

۳. *دانشیار باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

نویسندهٔ مسئول: نسیم کاشف، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۳۵۵۸
پست الکترونیک: kashefn@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

افزایش باکتری‌های مقاوم بـــه دارو در دنیا تهدیدی جدی برای درمان عفونت‌های شـــدید است. بنابراین، توسعهٔ رویکردهای ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی (aPDI) است[۱]. در aPDI از اســـترس اکســـیداتیو که ناشـــی از جذب نور مرئی توسط حساســـگر نوری و تولید گونه‌های اکسیژن فعال به‌واسطهٔ انتقال انرژی یا الکترون به اکسیژن است، استفاده می‌شود[۲و۳].

تغییرات ســـاختاری در کلاس‌های مختلف سلول‌های میکروبی می‌تواند بر اثربخشی و مکانیسم عمل aPDI بر بیماریزاهای مختلف تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال باکتری‌های گرم‌مثبت دارای لایه‌های پپتیدوگلیکان ضخیم و متخلخل هســـتند که غشـــاء سیتوپلاســـمی را احاطه کرده‌اند درحالی کـــه باکتری‌های گرم‌منفی حاوی غشـــای خارجی در اطـــراف یک لایه پپتیدوگلیکان نازک هســـتند وغشای سیتوپلاســـمی درون باکتری قرار گرفته اســـت[۴و۵]. برای انجام aPDI به‌طور کارآمد، حساسگر نوری به نفوذ در (یا حداقل اتصال به) دیوارهٔ سلولی باکتری‌ها و رسیدن به غشای پلاسمایی یا سیتوپلاسم نیاز دارد با این حال، موانع غشایی سلول باکتری، انتشار سادهٔ حساسگر نوری به داخل سیتوپلاسم باکتریایی را محدود می کنند[۶ و۷]. بنابراین aPDI درمورد باکتری‌های گرم‌مثبت بسیار ساده‌تر از باکتری‌های گرم‌منفی انجام می‌شود.

به‌منظور افزایـــش کارآیی aPDI در باکتری‌های گرم‌منفی، راهکارهای متفاوتی توسعه یافته است[۸]. پیش‌تیمار با عواملی که نفوذپذیری غشای خارجی را افزایش می‌دهند، مانند نانوذرات پلی‌کاتیونی پلی‌میکســـینB [۹] و EDTA [۱۰]، می‌تواندaPDI در گونه‌های گرم‌منفی را کارآمدتر کند. روش دومی که توســـط چندین گروه پذیرفته شده است، استفاده از حساســـگرهای نوری با بار مثبت اســـت. بار مثبت به آن‌ها کمک می‌کند تا به باکتری‌هایی که بار منفی دارند متصل شـــوند[۱۴-۱۱]. اثر کیتوزان نیز بر کارآیی aPDI به‌عنوان تقویت‌کنندهٔ پتانسیل حساسگرهای نوری مختلف مورد بررسی قرار گرفته است[۱۵و۱۶].

کیتـــوزان یک پلی‌ســـاکارید خطی پلی‌کاتیونی بـــا وزن مولکولی بالا و متشـــکل از N-acetyl-D-glucosamine و D-glucosamine با اتصال β-1,4 اســـت. خصوصیات کاتیونی کیتوزان منحصربه‌فرد است و ویژگی تشـــکیل فیلم، ایمنی و ســـازگاری بیولوژیک عالی سبب ایجاد کاربردهای جدید آن در زمینه‌های دارویی و زیست‌پزشـــکی مانند التیام زخم، مهندسی بافت و رهایش دارو شده است[۱۷و۱۸].

کیتوزان علیه طیف وســـیعی از میکروارگانیسم‌ها فعالیت ضدمیکروبی دارد[۱۹]. این فعالیت ضدمیکروبی به عوامل متعدد درونی و بیرونی مانند pH، گونهٔ میکروارگانیسم، وجود یا عدم وجود کاتیون‌های فلزی، pKa، وزن مولکولی و درجهٔ داستیلاســـیون کیتوزان بستگی دارد[۲۰]. توانایی کیتوزان در افزایش نفوذپذیری غشـــای خارجی در باکتری‌های گرم‌منفی استفاده از آن را به‌عنوان مادهٔ ضدمیکروبی گسترش می‌دهد[۲۱].

Pseudomonas aeruginosa یکی از عوامل بیماری‌زای بیمارستانی مشکل‌آفرین در سراسر جهان است. درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این ارگانیســـم به علت مقاومت درونی گونه‌ها (شـــامل نفوذپذیری کم غشـــاء خارجی همراه با بیان بتالاکتامـــاز و پمپ‌های دفع دارو) و توانایی فوق‌العـــادهٔ آن در به‌دســـت آوردن مقاومـــت به چندین گـــروه از عوامل ضدمیکروبی، اغلب دشوار است[۲۲].P. aeruginosa همچنین قادر به ایجاد عفونت‌هـــای بیوفیلمی مقاوم (ازجمله در ریهٔ بیماران دارای فیبروز کیستیک) است[۲۳]. ترکیبات ماتریکس بیوفیلم نقش مهمی در اجتناب از مکانیسم‌های ایمنی بدن و توانایی حفاظت از باکتری‌ها در مقابل آنتی بیوتیک‌ها ایفا می‌کنند[۲۴]. به‌دلیل شدت عفونت‌هایP. aeruginosa و محدودیت عوامل ضدمیکروبی برای درمان آن‌ها پیدا کردن راه‌های دیگر جهت پیشـــگیری و درمان حیاتی است. در ســـال‌های اخیر، گزارش‌های بســـیاری در مورد اثربخشـــی aPDI علیه P. aeruginosa منتشـــر و مشخص شده اســـت که P. aeruginosa قادر است استرس اکسیداتیو ناشـــی از aPDI را تحمل کند[۲۵-۲۸]. در این باکتری، غشای بیرونی غیرقابل‌نفوذ (که مانع از جذب رنگ توســـط ســـلول‌ها می‌شود)[۵]، 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 مطالعهٔ حاضر، اثر کیتوزان بر کارآیی aPDI به‌واسطهٔ متیلن‌بلو در P. aeruginosa در دو شکل پلانکتونی و بیوفیلم ارزیابی شد.

روش بررسی

جدایه‌های باکتریایی و شرایط رشد

پنج جدایهٔ P. aeruginosa از زخم‌های حاد ســـوختگی در پنج بیمار مختلف از بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری تهران دریافت شد. جدایه‌ها با آزمون‌های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند[۳۱]. جدایه‌ها برروی محیط کشـــت نوترینـــت آگار (Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجهٔ ســـانتی‌گراد برای ۲۴-۱۸ ســـاعت رشد داده شدند.

حساسگر نوری و منبع نور

متیلن‌بلـــو (Methylene Blue: MB) (Merck, Germany)، به عنوان حساسگر نوری استفاده شد. محلول ذخیرهٔ MB (۲۰۰ میکرومولار) در بافر فســـفات (pH ۷/۲) تهیه و پس از عبـــور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون به‌مدت ۲ هفته در دمای ۴ درجهٔ ســـانتی‌گراد نگهداری می‌شـــد. محلول

ذخیره برای رسیدن به غلظت‌های مورد نظر رقیق می‌شد.

منبع نـور، لیزر دیـود (MUSTANG-Russia) با طول‌موج ۶۵۰ نانومتر و توان خروجی ۳۰ میلی‌وات بود.

سنجش تشکیل بیوفیلم با رنگ کریستال ویوله

جدایه‌ها به‌مدت یک شـب در محیط تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy Broth: TSB) غنی‌شـده با ۰/۲ درصـد گلوکز گرمخانه‌گذاری 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 شـد. میکروتیتر پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از تشکیل بیوفیلم، محیط کشـت به آرامی تخلیه و هر چاهک توسـط محلول استریل ۰/۹ درصد کلرید سدیم برای حذف سلول‌های پلانکتونی شسته شد. سپس سلول‌ها با استفاده از اتانول ۹۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه تثبیت و با رنگ کریستال ویولـه ۰/۴ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شـدند. پس از چندین بار شستشـو، چاهک‌ها در معرض هوا خشـک شدند. برای تخمین کمی تراکم بیوفیلم، کریستال ویولهٔ واردشده به داخل بیوفیلم در اسید استیک ۱۰ درصد حل شـد و شـدت جذب رنگ حل‌شـده در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه پلیت‌خوان (HiperionMPR4+,Germany) اندازه‌گیری گردید[۳۲].

تعیین حداقل غلظت مهارکنندهٔ رشـد (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقـل غلظـت مهارکننـدهٔ بیوفیلـم (Minimum Biofilm Inhibition Concentration: MBIC) بـرای کیتوزان بـا وزن مولکولی پاییـن (۱۰۷ کیلودالتـون) با درجهٔ داستیلاسیون ۸۵-۷۵ درصد از شرکت Sigma Aldrich خریداری شد. کیتوزان در محلول اسید استیک (۱ درصد V/V) در دمای اتاق به‌مدت یک شب با استفاده از همزن مغناطیسی حل شد تا غلظت نهایی ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (pH ۵/۵) به‌دسـت آید. محلول پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون، استریل و با کلرید سدیم ۰/۹ درصد استریل تا غلظت موردنظر رقیق شـد[۳۳]. ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی در محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم (غلظت ۰/۵ مک‌فارلند) و ۹۵ میکرولیتر از محیط مولرهینتون بـراث به هر چاهک در میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه اضافه شـد و با ۱۰۰ میکرولیتـر از محلول‌های کیتوزان با غلظت نهایی ۳۱ تـا ۴۰۰۰ میکروگـرم در میلی‌لیتر تیمار گردیـد. MIC به‌عنوان پایین‌ترین غلظت کیتوزان مورد نیاز برای توقف کامل رشـد باکتری‌ها پس از انکوباسـیون در دمای ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد درمدت ۲۴ ساعت تعریف شـد. به‌منظور تعیین MBIC کیتـوزان، بیوفیلم باکتری همان طور که در بالا توصیف شـد، آماده گشـت و با محلول‌های کیتوزان با غلظت‌های نهایی ۳۱ تا ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار شد و مورد ارزیابی قرار گرفت[۳۴].

غیرفعال‌سـازی فتودینامیکـی ضدمیکروبـی جدایه‌هـای P. aeruginosa در شکل پلانکتونی

۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی (10^6-10^7 CFU/ml) در میکروتیتـر پلیت ۹۶ خانه ریخته شـد و بـا MB (غلظت نهایی ۵۰ میکرومـولار) و کیتوزان (غلظت نهایی ۳۱ میکروگـرم در میلی‌لیتر) در تاریکی و دمای ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد برای ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس هر سوسپانسیون باکتریایی در معرض نور قرمز با شدت ۴۷ J/cm^2 قرار گرفت. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسـیون میکروبی برروی محیط نوترینت‌آگار با سـری رقت‌های ۱۰ تایی پخش شد و کشت داده شـد. کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری در تاریکی به‌مدت ۲۴ سـاعت و در دمای ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد شمارش شدند. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. کنترل‌ها 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.

غیرفعال‌سـازی فتودینامیکـی ضدمیکروبـی جدایه‌هـای P. aeruginosa در شکل بیوفیلم

بیوفیلم باکتریایی به‌صورتی‌که در بالا شرح داده شد، تشکیل شد. MB یـا MB + کیتوزان (به‌ترتیب در غلظت‌هـای نهایی ۲۰۰ میکرومولار و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شـد و پلیت در دمای ۳۷ درجـهٔ سـانتی‌گراد و در تاریکی به‌مدت ۱۵ دقیقـه گرمخانه‌گذاری شـد. سـپس چاهک‌ها به‌دقـت تخلیـه و بیوفیلم‌ها شسـته شـدند. بیوفیلم‌های تیمارشـده، با نور لیزر به‌مدت ۱۰ دقیقه (۴۷ J/cm^2) تابش شدند. بیوفیلم‌ها کنده و نمونه‌های همگن‌شده به‌صورت سریالی رقیق شدند سـپس روی محیط نوترینت‌آگار پخش و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در تاریکی به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

تحلیل آماری

داده‌ها به‌صورت میانگین لگاریتمی± انحراف معیار بیان شـد. مقایسهٔ بیـن میانگین گروه‌ها با اسـتفاده از آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و آزمـون post hoc Tukey تجزیه و تحلیل شـد. $p<0/05$ به لحاظ آماری معنی‌دار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

تشکیل بیوفیلم

جـدول ۱ توانایی تشـکیل بیوفیلم ۵ جدایـهٔ P. aeruginosa را بر اساس آزمون کریستال‌ویوله نشان می‌دهد. فنوتیپ تولید-کنندهٔ بیوفیلم با جذب نوری بیشتر از ۱۷/۰ در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر مشخص شد[۳۵]. تمام جدایه‌ها قادر به تولید بیوفیلم قوی بودند.

جدول۱: توانایی تشکیل بیوفیلم ۵ جدایهٔ **P. aeruginosa**. جذب نوری کریستال ویوله در ۴۹۲ نانومتر تعیین شد و به شکل میانگین± انحراف معیار گزارش شد.

جدایه‌های P. aeruginosa	جذب نوری در ۴۹۲ نانومتر
P3	۲/۰۹ ± ۰/۱۵
P17	۲/۵۹ ± ۰/۴۲
P18	۳/۵ ± ۰/۱
P24	۳/۰۵ ± ۰/۱۱
P26	۲/۵ ± ۰/۱۸

مقادیر MIC و MBIC برای کیتوزان

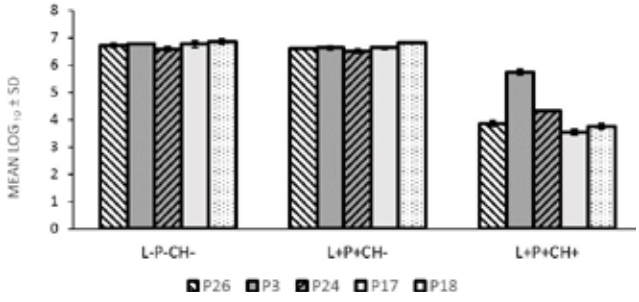
مقادیر MIC برای کیتوزان در تمام پنج جدایه برابر ۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و MBIC ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در ادامهٔ این مطالعه MIC ½ و MBIC ½ کیتوزان (به‌ترتیب ۳۱ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلم درنظر گرفته شدند.

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

هیچ‌گونه اثرکشندگی به‌واسطهٔ تابش نور یا MB به‌تنهایی مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). تعداد باکتری‌ها کاهش قابل ملاحظه‌ای در حضور MB + کیتوزان، در تاریکی در مقایسه با کنترل‌های تیمارنشده نشان ندادند ($p>0/05$). مطابق نمودار ۱، غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو منجر به کاهش قابل توجهی در شمارش تعداد باکتری‌های زندهٔ هر جدایه در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار نشد ($p>0/05$). درحالیکه نتایج غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو به‌همراه کیتوزان سبب کاهش قابل‌توجهی در تعداد باکتری‌ها از ۱ تا ۳ لگاریتم شد. به‌عنوان مثال تعداد باکتری‌های زندهٔ جدایهٔ P. aeruginosa P3 پس‌از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو ۰/۱ ±۶/۶ لگاریتم بود، درحالیکه این تعداد پس از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو و کیتوزان به ۰/۱ ±۵/۷ لگاریتم رسید. جدایهٔ P. aeruginosa P17 درمقابل غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو و کیتوزان نسبت به سویهٔ P3 حساس‌تر بود (تعداد سلول زنده پس از تیمار برابر ۰/۰۶ ± ۳/۵ لگاریتم بود).

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

همان‌طورکه در نمودار ۲ نشان داده شده است، غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو در حضور کیتوزان اثر ضد بیوفیلمی قابل ملاحظه‌ای داشت ($p<0/001$)، میانگین کاهش لگاریتمی ۱۵/۵ در بیوفیلم جدایه‌های P. aeruginosa) درحالی‌که غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو به تنهایی میانگین کاهش لگاریتمی ۱/۰۴ را در بیوفیلم‌ها نشان داد. به‌عنوان مثال تعداد سلول‌های زنده در بیوفیلم P. aeruginosa P3 پس از



نمودار۱: غیرفعال‌سازی فتودینامیکی ضدمیکروبی با متیلن‌بلو در ۵ جدایهٔ P. aeruginosa. CFU/ml ۱۰۷- ۱۰۶ باکتری با غلظت ۵۰ µM از متیلن‌بلو یا متیلن‌بلو + کیتوزان (۳۱ µg/ml) تیمارشده و با دوز نوری ۴۷ J/cm۲ تابش شدند. (کیتوزان :CH، حساسگرنوری :P، نور لیزر :L)

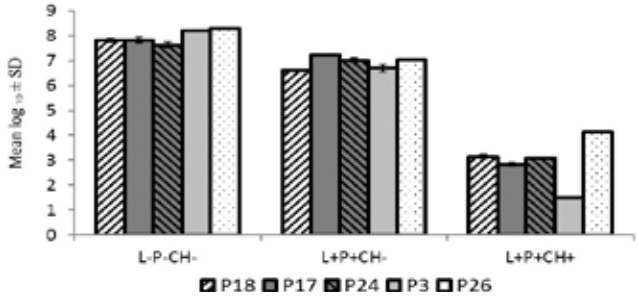
غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو ۰/۲ ±۶/۷ لگاریتم بود درحالی‌که این تعداد پس از غیرفعال‌سازی با متیلن‌بلو در حضور کیتوزان به ۰/۲ ± ۱/۸ رسید. غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با متیلن‌بلو و کیتوزان سبب کاهش log ۴/۱ در تعداد سلول‌های P. aeruginosa P26 نسبت به نمونهٔ کنترل شد (تعداد سلول زندهٔ بیوفیلم پس از تیمار ۰/۰۱ ± ۴/۲ بود).

مخلوط متیلن‌بلو و کیتوزان در تاریکی تا حدودی برای بیوفیلم جدایه‌ها اثر کشندگی داشت (میانگین کاهش لگاریتمی ۱/۰۷).

بحث

براساس مطالعات انجام‌شده به‌نظر می‌رسد که P. aeruginosa دربرابر اثرهای کشندهٔ aPDI تحمل دارد. روش‌های مختلفی برای بهبود اثربخشی aPDI درمورد باکتری‌ها طراحی شده است. هدف این مطالعه بررسی اثر کیتوزان بر کارآیی MB-aPDI برروی جدایه‌های P. aeruginosa به دو شکل پلانکتونی و بیوفیلم بود.

براساس نتایج به‌دست‌آمده غلظت ۵۰ میکرومولار MB به‌تنهایی با تابش ۴۷ J/cm2 در کاهش سلول‌های پلانکتونی P. aeruginosa ناموفق بود. در مقابل، انکوباسیون همزمان MB (۵۰ میکرومولار)



نمودار۲: تعداد سلول‌های زنده در بیوفیلم جدایه‌های **P. aeruginosa** پس از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی ضدمیکروبی با متیلن‌بلو. غلظت نهایی متیلن‌بلو ۲۰۰ µM، غلظت نهایی کیتوزان ۱۰۰۰ µg/ml، دوز نوری ۴۷ J/cm۲. (کیتوزان :CH، حساسگرنوری :P، نور لیزر :L)

و کیتوزان (۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) با همان شدت تابش نور، سبب کاهش ۲/۵ لگاریتم در جدایه‌ها شد. نتایج نشان‌دهندهٔ افزایش اثربخشی MB-aPDI به‌وسیلهٔ کیتوزان در سلول‌های پلانکتونی P. aeruginosa است. این نتیجه ممکن است به‌علت توانایی کیتوزان در افزایش نفوذپذیری غشای بیرونی باکتری‌ها و تسهیل ورود MB به درون سلول‌ها باشد.

MB (۲۰۰ میکرومولار) قادر به غیرفعال‌کردن سلول‌های بیوفیلم P. aeruginosa به‌همراه تابش نور بود. مطالعات نشان داده است که باکتری‌ها در شکل بیوفیلم در مقایسه با اشکال پلانکتونی نسبت به عملکرد aPDI مقاوم‌تر هستند[۳۶و۳۷]. درحقیقت سلول‌های درون بیوفیلم ازنظر برخی ویژگی‌ها مانند میزان رشد، ترکیب دیوارهٔ سلولی و وجود ادهسین بین سلولی پلی‌ساکاریدی با سلول‌های پلانکتونی متفاوت هستند که ممکن است جذب حساسگر نوری و نفوذ نور را مختل کنند و فرآیند حساسیت به نور را کاهش دهند[۳۸،۲۴و۳۹]. از سوی دیگر، مطالعات نشان داده است که پمپ‌های دفع دارو در بیوفیلم‌های باکتریایی بسیار فعال هستند و حساسگرهای فنوتیازینیوم مانند MB سوبسترای این پمپ‌ها در باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی می‌باشند[۴۰].

در این مطالعه، به‌منظور بهبود کارآیی aPDI با استفاده از MB در باکتری P. aeruginosa درحالت بیوفیلم از کیتوزان که پلی‌ساکاریدی خطی و پلی‌کاتیونی است، استفاده کردیم. کیتوزان به‌عنوان عامل ضدبیوفیلم در مطالعات مختلف به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر مواد ضدمیکروبی استفاده شده است[۴۵-۴۱].

در این مطالعه MB (در غلظت نهایی ۲۰۰ میکرومولار) سمیت در تاریکی نشان نداد، درحالی‌که MB و کیتوزان (۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) سمیت تاریکی حدود ۱/۰۷ لگاریتم نشان دادند که ممکن است به‌علت فعالیت ضد بیوفیلم/ضدباکتری کیتوزان باشد. aPDI به‌واسطهٔ MB و کیتوزان برروی بیوفیلم ازپیش‌تولیدشدهٔ باکتری، کاهش لگاریتمی ۷/۰۴ - ۴/۱۴ در مقایسه با کنترل نشان داد. ممکن است کیتوزان سبب افزایش حساسیت باکتری‌های درون بیوفیلم به اثرهای فتوتوکسیک MB با تسهیل ورود آن به داخل بیوفیلم P. aeruginosa شده باشد. اگرچه ما این فرضیه را به‌طور خاص آزمایش نکرده‌ایم.

در مطالعهٔ Gsponer و همکاران، اثر کیتوزان بر جذب پورفیرین و غیرفعال‌سازی نوری Escherichia coli با این حساسگر بررسی شد. کیتوزان، مقدار پورفیرین (TPPS 4-) متصل‌شده به باکتری را افزایش داد در عین حال غیر فعال‌سازی این باکتری در حضور کیتوزان با موفقیت انجام شد[۴۶]. در مطالعهٔ Chein و همکاران نیز اثر کیتوزان بر افزایش کارآیی غیرفعال‌سازی نوری تولوییدن‌بلو بر Candida albicans در دو حالت پلانکتون و بیوفیلم بررسی شد. در این مطالعه سلول‌ها بعد از اثر غیرفعال‌سازی نوری با کیتوزان تیمار شدند. اثر قارچ‌کشی کیتوزان برروی سلول‌های آسیب‌دیدهٔ ناشی از غیرفعال‌سازی نوری به‌خوبی مشهود بود[۴۷].

مطالعات متعددی اثر ضدمیکربی فرمول‌های مختلف کیتوزان را به‌تنهایی و در ترکیب با aPDI برروی سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلم ارزیابی کرده‌اند [۱۶،۱۵و۵۳-۴۸]. داراب‌پور و همکاران، اثر نانوذرات کیتوزان را بر کارآیی aPDI به‌واسطهٔ MB بر بیوفیلم P. aeruginosa بررسی کردند. aPDI به‌واسطهٔ مخلوطی از نانوذرات کیتوزان و MB اثر غیرفعال‌سازی قابل‌توجهی علیه بیوفیلم باکتری نشان داد درحالی‌که aPDI ناشی از MB به‌تنهایی باعث کاهش تعداد سلول‌ها کمتر از ۱ لگاریتم شد[۱۶]. Chen و همکاران نیز نانوذرات کیتوزان را به‌همراه اریتروزین (ER) برای اثربخشی aPDI بر سلول‌های پلانکتونی و بیوفیلم Streptococcus mutans، P.aeruginosa و C.albicans آزمایش کردند. این سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات کیتوزان و ER یا ER به‌تنهایی، در معرض تابش نور قرار گرفتند. اثر فتوتوکسیک نانوذرات کیتوزان به همراه ER به‌طور معنی‌داری بیشتر از ER در فرم آزاد بود[۵۳]. بنابراین به‌طور کلی، این مطالعات نشان می‌دهند که کاربرد همزمان aPDI و کیتوزان برای ریشه‌کن کردن عفونت‌های میکروبی بسیار امیدوارکننده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، کیتوزان که ترکیبی ارزان و غیرسمی است، می‌تواند اثرهای فتوتوکسیک متیلن‌بلو را برروی جدایه‌های بالینی P. aeruginosa در فرم پلانکتونی و بیوفیلم افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تهران انجام شده است.

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, Szewczyk 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. Oniszczuk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczuk 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, Nurmiaho-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, andahpC-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, Tavaria 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. Breser 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 inactivacion 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.