



جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

عنوان طرح: بررسی اثر فتودینامیک تراپی ضد میکروبی بر بیان ژن های فاکتور های ویروالانس تحت کنترل

سیستم کوئروم سنسینگ در *Pseudomonas aeruginosa*

کد طرح: ۳۰۰۸

کد کمیته اخلاق: IR.ACECR.IBCRC.REC.1396.1

مسئول طرح: مجید پرنور- نسیم کاشف

گروه پژوهشی: ترمیم نوری

تاریخ اختتام: شهریور ۱۳۹۷



نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
مجید پرنور	مجری (جهاد)	بیوتکنولوژی پزشکی	استادیار	۴۸۰
نسیم کاشف	مجری	میکروب شناسی پزشکی	دانشیار	۴۸۰
ساغر هندیانی	همکار طرح	میکروب شناسی	دانشجوی دکتری میکروب شناسی	۴۸۰
هاجر واثقی	- همکار طرح	ژنتیک	دانشجوی دکتری ژنتیک پزشکی	۴۸۰

چکیده:

فتودینامیک تراپی (PDT) به عنوان یک تکنیک درمانی جدید و نویدبخش توجه بسیاری را در طول سال‌ها به خود جلب کرده است. این تکنیک دارای مزایای بسیاری است اما متعاقبا مانند تمامی روش‌های درمانی، معایبی نیز دارد. مهم‌ترین مشکل موجود در مقابل فتودینامیک تراپی، احتمال قرارگیری میکروارگانیسم‌های موجود در لایه‌های عمیق‌تر عفونت در معرض غلظت‌های زیر حد کشنده آن (sub-lethal PDT, sPDT) می‌باشد. استرس اکسیداتیو ناشی از sPDT می‌تواند فیزیولوژی و بیان ژن‌ها را در باکتری‌ها تحت تاثیر قرار دهد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات PDT با استفاده از متیلن بلو (MB) و نور قرمز بر بیان ژن‌های کوئروم سنسینگ (QS) و فاکتورهای ویروالانس تحت کنترل سیستم‌های کوئروم سنسینگ در سویه باکتریایی *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و شش جدایه بالینی می‌باشد.

در ابتدا به منظور بدست آوردن غلظت‌های کشنده، اثر PDT بر باکتری *P. aeruginosa* ATCC 27853 با استفاده از تکنیک شمارش تعداد باکتری‌ها بر روی پلیت بررسی گردید. بیان ژن‌های سیستم‌های کوئروم سنسینگ *las* و *rhl* و فاکتورهای ویروالانس رامنولیپید، پیوسیانین و پیلی تحت کنترل این سیستم‌ها با استفاده از تکنیک quantitative real-time PCR برای سویه استاندارد و شش جدایه بالینی اندازه‌گیری شد. به این منظور باکتری‌ها تحت تیمار با sPDT قرار گرفته و سپس استخراج RNA از نمونه‌های تیمار شده و فاقد تیمار انجام شد. سپس cDNA سنتز شده و بیان ژن‌ها با پرایمرهای مناسب بررسی گردید. همچنین آزمون‌های فنوتیپی برای ارزیابی میزان تولید پیگمان پیوسیانین و رامنولیپید در نمونه‌های تیمار شده و فاقد تیمار انجام شد. در ادامه تصاویر میکروسکوپ الکترونی از دو گروه نمونه‌های نامبرده ثبت شد تا میزان تشکیل پیلی و اتصال آنها به سطح مشخص گردد.

نتایج حاصل از شمارش تعداد باکتری‌های موجود در سطح پلیت نشان دهنده توان PDT برای از بین بردن تمامی باکتری‌ها در بازه غلظت‌های مورد تایید سازمان غذا و دارو بود. غلظت‌های پایین‌تر از حد کشنده به عنوان sPDT در نظر گرفته شدند. نتایج آزمون quantitative real-time PCR نشان دهنده کاهش در بیان ژن‌های سیستم‌های کوئروم سنسینگ *las* و *rhl* در تمامی باکتری‌های مورد آزمون در sPDT بود. کاهش در بیان سیستم‌های کوئروم سنسینگ موجب کاهش در ارتباط باکتری با محیط پیرامون و با باکتری‌های موجود در اطراف آن می‌گردد. به این ترتیب تولید فاکتورهای ویروالانس که در *P. aeruginosa* عمدتاً تحت کنترل این سیستم‌های وابسته به جمعیت هستند کاهش می‌یابد. بیان ژن‌های فاکتورهای ویروالانس رامنولیپید و پیلی مطابق انتظار کاهش یافت. همچنین تست‌های فنوتیپی برای رامنولیپید حاکی از کاهش توان باکتری برای تولید آن در مقایسه با نمونه فاقد تیمار بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیز گواه بر کاهش تعداد پیلی موجود در سطح باکتری و کاهش قدرت باکتری در استفاده از آن برای اتصال به سطح بودند. از بین جدایه‌های بالینی مورد آزمون فقط دو جدایه به همراه سویه بالینی *P. aeruginosa* ATCC 27853 قادر به تولید پیگمان پیوسیانین بودند. اما بیان ژن فاکتور ویروالانس پیگمان پیوسیانین در این سه باکتری مورد آزمایش افزایش یافته و مطابق با نتایج فنوتیپی آن بود. این افزایش بیان پاسخی به استرس اکسیداتیو ناشی از sPDT بوده است.



فتودینامیک تراپی در غلظت‌های کشنده قادر به از بین بردن تمامی باکتری‌ها و در غلظت‌های زیر حد کشنده قادر به مهار سیستم‌های کوئروم سنسینگ می‌باشد بنابراین با این مکانیسم باعث کاهش قابل توجه هم در تعداد باکتری‌ها و هم در تولید فاکتور های ویروانس می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فتودینامیک تراپی ضد میکروبی، *Pseudomonas aeruginosa*، کوئروم سنسینگ، پیوسیانین، رامنولپید، پیلی

Archive of SID

فهرست مطالب

۷	مقدمه و ضرورت پژوهش
۱۶	مروری بر پیشینه پژوهش
۲۰	اهداف پژوهش
۲۲	۱-۳ اهداف (کلی - ویژه و کاربردی)
۲۲	۲-۳ سوالات یا فرضیات پژوهشی
۲۴	روش انجام پژوهش
۲۵	۱-۴ مطالعات فنوتیپی
۲۵	۲-۴ سویه های باکتری و شرایط کشت
۲۵	۳-۴ آماده سازی محیط صخس طس ص
۲۵	۴-۴ آماده سازی حساسگر نوری متیلن بلو
۲۶	۵-۴ منبع نوری
۲۶	۶-۴ مراحل غیر فعال سازی فتودینامیکی ح/عظس زگقنح
۲۶	۷-۴ سنجش توان تشکیل پیگمان باکتری
۲۷	۸-۴ سنجش میزان تولید رامنولپید
۲۷	۹-۴ سنجش تشکیل پیلی
۲۸	۱۰-۴ مطالعات ژنوتیپی
۲۹	۱۱-۴ [هظع] ع
۲۹	۱۲-۴ آماده سازی ژل آگارز ۱/۵٪
۳۰	۱۳-۴ بافر بارگزاری
۳۰	۱۴-۴ بافر الکتروفورز
۳۰	۱۵-۴ استخراج
۳۱	۱۶-۴ سنتز
۳۱	۱۷-۴ [نطسک-ضح] د
۳۶	۱۸-۴ آنالیز آماری
۳۷	نتایج پژوهش
۳۸	۱-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر رشد جدایه های ح/عظس زگقنح
۳۸	۲-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر تشکیل پیگمان پیوسیانین

- ۴۱ ۳-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر تولید رامنولیپید
- ۴۳ ۴-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر تشکیل پیلی
- ۴۴ ۵-۵ نتایج [هظ عرض عچ و تایید حضور ژنهای مورد مطالعه در جدایه های تحت مطالعه
- ۴۴ ۶-۵ نتایج تغییرات بیان ژنهای مربوط به سیستم کوثرم سنسینگ و فاکتورهای ویروانس تحت تاثیر فتودینامیک تراپی با استفاده از تکنیک [ک-ض ح د
- ۴۶ بحث
- ۵۵ پیشنهادات
- ۵۶ منابع

فهرست اشکال

- ۳۱ شکل ۴-۱: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن 16S Rrna
- ۳۱ شکل ۴-۲: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن la
- ۳۲ شکل ۴-۳: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن lasR
- ۳۲ شکل ۴-۴: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن phzM
- ۳۳ شکل ۴-۵: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن pilT
- ۳۳ شکل ۴-۶: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن rhlA
- ۳۴ شکل ۴-۷: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن rhlI
- ۳۴ شکل ۴-۸: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن rhlR
- ۴۱ شکل ۵-۱: تشکیل پیگمان سویه ها، لوله سمت راست کنترل بدون تیمار و لوله سمت چپ پس از تیمار فتودینامیک. ۴۱
- ۴۲ شکل ۵-۲: هاله تولید رامنولیپید. ۴۲
- ۴۳ شکل ۵-۳: تصویر سمت راست نمونه کنترل فاقد تیمار فتودینامیک تراپی و تصویر سمت چپ نمونه پس از تیمار فتودینامیک تراپی ۴۳
- ۴۴ شکل ۴-۵: نتایج الکتروفورز محصولات colony PCR برای ژنهای مختلف مورد مطالعه ۴۴
- ۴۶ شکل ۵-۵: نمودار تغییرات بیان ژن های کوثرم سنسینگ و فاکتورهای ویروانس تحت کنترل سیستم کوثرم سنسینگ ۴۶
- ۵۰ شکل ۶-۱: مسیر بیوسنتز رامنولیپید ۵۰
- ۵۳ شکل ۶-۲: مسیر بیوسنتز پیگمان پیوسیانین ۵۳
- ۵۴ شکل ۶-۳ ارتباط بین سیستم های کوثرم سنسینگ و تولید فاکتورهای ویروانس در P. aeruginosa ۵۴

فهرست جداول

۲۷	جدول ۴-۱: توالی پرایمر ها، اندازه قطعات و دمای اتصال آنها برای بررسی بیان ژنها
۳۵	جدول ۴-۲. مواد مورد نیاز برای هر واکنش در PCR Real-time
۳۵	جدول ۴-۳. برنامه Real-time PCR
۳۸	جدول ۵-۱. میانگین کاهش (log ₁₀ SD)
۳۹	جدول ۵-۲. میزان تشکیل پیگمان P. aeruginosa ATCC27853 قبل و بعد از فتودینامیک تراپی
۴۰	جدول ۵-۳. میزان تشکیل پیگمان ایزوله P2 قبل و بعد از فتودینامیک تراپی
۴۰	جدول ۵-۴. میزان تشکیل پیگمان ایزوله P3 قبل و بعد از فتودینامیک تراپی
۴۲	جدول ۵-۵. مقایسه میزان تولید رامنولپید در جدایه های مختلف با تیمار PDT و بدون انجام تیمار



مقدمه و ضرورت پژوهش

از ابتدای تاریخ عفونت های زخم معضل قابل توجهی بوده اند و امروزه نیز چالشی برای پزشکان سراسر جهان می باشند. علی رغم پیشرفت های قابل توجه در کنترل سوختگی ها، هنوز عفونت ها علت عمده مرگ و میر در بیماران دچار سوختگی می باشند. تخریب حرارتی سطح دفاعی پوست و به طور همزمان از کار افتادن پاسخ ایمنی سلولی و همورال میزبان، از عوامل مرتبط با عوارض عفونی در بیماران مبتلا به سوختگی می باشد. اگرچه در ابتدا به علت آسیب حرارتی سطح زخم استریل است اما در نهایت میکروارگانیسم ها روی این زخم ها کلنیزه می شوند. این میکروارگانیسم ها از طریق فلور نرمال دستگاه گوارش و تنفس فوقانی میزبان، از طریق محیط بیمارستان و یا پرستاران و کارکنان بیمارستان در این زخم ها کلنیزه می شوند. خطر ابتلا به عفونت های زخم سوختگی تحت تاثیر عواملی مثل وسعت و عمق آسیب سوختگی، شرایط میزبان، تراکم و تنوع فاکتور های ویروانس فلور میکروبی کلنیزه شده در زخم است. میکروارگانیسم های مختلفی از جمله باکتری های گرم مثبت و گرم منفی قادر به ایجاد عفونت زخم می باشند. از جمله این باکتری ها می توان به *Pseudomonas aeruginosa* اشاره کرد که قادر به ایجاد عفونت های حاد و مزمن می باشد (۱).

P. aeruginosa باکتری میله ای شکل، گرم منفی و هوازی است و عضو رده گاما پرتوباکترهاست. این باکتری یک ارگانیسم آزاد است که معمولا در خاک یافت می شود تقریبا ۴ تا ۱۲٪ از جمعیت های انسانی در دستگاه گوارش دارای *Pseudomonas* هستند (۲). *P. aeruginosa* در درجه اول به عنوان پاتوژن فرصت طلب بیمارستانی مطرح می شود که عفونت های آن با ایجاد اختلال در سیستم دفاعی آغاز می شود. اغلب بیماران دارای نقص سیستم ایمنی مانند افراد مبتلا به سیستمیک فیبروز، بیماران نوتروپنی، سوختگی های شدید، سرطان و ایدز آلوده شده و عفونت های تنفسی، اندوکاردیت، باکتری می، سپتیمی، عفونت زخم، عفونت سیستم ایمنی، عفونت گوش، چشم، استخوان و مفاصل، عفونت های مجاری ادراری و عفونت های پوست و بافت های نرم را ایجاد می کند. سه بیماری مهم در انسان که توسط این باکتری ایجاد می شود، شامل باکتری در بیماران دارای سوختگی شدید، عفونت های حاد تنفسی در افراد دارای سیستمیک فیبروز و کراتیت اولسراتیو حاد در افرادی که از لنز های تماسی استفاده کرده اند می باشد (۳). این باکتری اغلب جزو پاتوژن های خطرناک طبقه بندی می شود زیرا به دوز درمانی آنتی بیوتیک های مرسوم عموما مقاوم است. این مقاومت اصولا ذاتی و ناشی از

نفوذناپذیری غشا خارجی، توانایی تشکیل بیوفیلم، وجود پمپ های افلاکس و همچنین ژن های کروموزومی کد کننده مقاومت های آنتی بیوتیکی می باشد (۴). توانایی این باکتری برای سازگاری و مقاومت ذاتی آن به آنتی بیوتیک ها، موجب بقای آن در طیف وسیعی از ابزار های طبیعی و مصنوعی (از جمله سطوح وسایل پزشکی) می شود. با توجه به مقاومت بالای *P. aeruginosa* گزینه های درمانی محدود، و شیوع این باکتری افزایش یافته و مرگ و میر ناشی از ابتلای به آن رو به افزایش است (۵). این حقیقت که *P. aeruginosa* بطور معمول در محیط وجود دارد، احتمال ابتلا به عفونت های زخم و سوختگی را در افراد دارای سوختگی شدید قبل از بهبود، افزایش می دهد. *P. aeruginosa* بر روی زمین، تخت ها و سینک های بیمارستان وجود داشته و حتی از دست پرستاران قابل کشت است (۶). بعلاوه این باکتری ممکن است به صورت فلور توسط بیمار به بیمارستان وارد شده و پس از جراحی باعث ایجاد آلودگی شود (۷). آمار نشان می دهد که بیش از ۷۰٪ از مرگ و میر های ناشی از سوختگی ها در رابطه با عفونت های ایجاد شده در محل سوختگی و زخم می باشد (۸).

بیماری های ناشی از *P. aeruginosa* ناشی از فاکتور های ویروانس متعدد این باکتری می باشند. این فاکتور ها شامل اجزا سطحی سلول و محصولات خارج سلولی آن می باشند. اجزا سطحی شامل پیلی که باعث اتصال به سطح و سلول میزبان و همچنین عامل حرکتی است. اتصال باکتری به ناحیه زخم و سپس انتشار آن و شروع پاسخ های التهابی وابسته به پیلی و فیمبریه می باشد. بعلاوه پیلی سبب القا پاسخ التهابی در میزبان می گردد. هر سلول دارای یک فلاژل و چندین پیلی تیپ ۴ است که در قطب آن قرار گرفته است. جهش یافته های ناقص در تولید این ساختار ها قادر به بقا در منطقه زخم و سپس حرکت در ارگانسیم میزبان نمی باشند (۹). به نظر می رسد که تماس باکتری به وسیله پیلی با عناصر سلولی میزبان سبب فعال شدن سیستم ترشحی نوع III در باکتری شده که همین عامل موجب افزایش بیان عوامل ویروانس باکتریایی می گردد. توکسین ها و آنزیم های متعددی توسط این سیستم ترشحی به سلول میزبان منتقل می شوند که در نهایت موجب شوک و نکروز بافتی می شوند از جمله اگزوتوکسین A، الاستاز A و الاستاز B، آلکالین پزوتئاز و... پروتئاز های متعددی توسط این باکتری تولید می شود که قادرند ایمونوگلوبولین ها و فیبرین ها را تجزیه کرده و اتصالات محکم سلول های اپیتلیال را از بین ببرند (۱۰). انتشار باکتری درون میزبان وابسته به آنزیم های پروتئازی از جمله الاستاز می باشد.

الاستاز قادر به تجزیه پروتئین های کلاژنی و غیر کلاژنی میزبان بوده و پیوستگی غشای پایه میزبان را بر هم می زند. بعلاوه پروتئازها اثرات شدیدی بر سیستم های ایمنی اکتسابی و ذاتی میزبان دارند؛ به عنوان مثال کموتاکسی منوسیت ها را از بین می برد، در نتیجه در حذف اولیه باکتری توسط فاگوسیت کننده ها از ناحیه زخم نقش دارد (11). همچنین باکتری برای حرکت و تهاجم دارای فلاژل است. سایر فاکتور های ویروالانس باکتری شامل سیدروفور های و LPS آن می باشند که در فریب دادن مکانیسم های سیستم ایمنی و کنترل بیان سایر عوامل ویروالانس حائز اهمیت هستند.

فاکتور ویروالانس دیگر پیوسیاین است. این متابولیت ثانویه، توانایی اکسیده شدن و احیای سایر مولکول ها را دارد. از آنجا که پیوسیاین در pH خون زوئیترو یون می باشد، به سادگی از غشا سلول های میزبان عبور می کند. پیگمان سبز آبی پیوسیاین با خاصیت احیایی خود استرس اکسیداتیو در میزبان ایجاد کرده و موجب عملکرد ناقص کاتالاز و سیستم انتقال الکترون میزبان می شود. بعلاوه پیوسیاین باعث القای آپوپتوز در نوتروفیل ها و ممانعت از فاگوسیتوز سلول های آپوپتوز شده توسط ماکروفاژها می شود (12). پیوسیاین دارای خاصیت آنتی بیوتیکی علیه برخی باکتری ها و قارچ هاست. جمعیت بالای سلولی و شرایط تغذیه ای زیر حد بهینه برای تولید پیوسیاین ضروری می باشد. مطالعات نشان می دهد که پیوسیاین برای تنظیم متابولیسم اولیه در طول فاز رشد تاخیری ضروری است. فاکتور ویروالانس بعدی رامنولیپید است که سورفاکتانت طبیعی تولید شده توسط *P. aeruginosa* بوده و با عملکرد سورفاکتانتی خود باعث کاهش کشش سطحی شده، بعلاوه با دارا بودن خاصیت آنتی بیوتیکی علیه برخی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی این باکتری در رقابت با سایر میکروارگانیسم ها ، قادر به دستیابی به محیط مناسب برای اتصال می شود. خواص ضد ویروسی، قارچی، مایکوپلاسمایی، جلبکی و آمیبی هم برای آن گزارش شده است. همچنین رامنولیپید دارای خاصیت همولیزینی می باشد. از دیگر خواص آن حل کردن فسفولیپید ها و بنابراین بهبود عملکرد آنزیمی فسفولیپاز C و تهاجم هرچه بیشتر *P. aeruginosa* است. مطالعات نشان می دهد که رامنولیپید اثرات متعددی روی سلول های پستانداران دارد مثلا باعث نقص عملکرد پاسخ های کموتاکتیک لوکوسیت ها، ممانعت از عملکرد طبیعی ماکروفاژها و تحریک آزاد شدن سیتوکین ها از سلول های اپیتلیال می شود (13).

توانایی بالای *P. aeruginosa* در تولید انواع فاکتور های ویروانس وابسته به سیستم های تنظیمی بویژه سیستم کوئروم سنسینگ در این باکتری می باشد. کوئروم سنسینگ مکانیسمی مشترک در بین برخی باکتری هاست که امکان سازگاری با شرایط محیطی را به باکتری می دهد. این سازگاری با مولکول های کوچک خودالقا^۱ تنظیم می شوند. غلظت مولکول خودالقا درون محیط، ارتباط مستقیمی با غلظت باکتری های درون آن محیط دارد و زمانی که به غلظت آستانه برسند، به عنوان کوفاکتور فاکتور های تنظیمی رونویسی عمل می کنند. تخمین زده می شود که ۱۰٪ از ژن های ژنوم و بیش از ۲۰٪ از پروتئوم بیان شده باکتریایی توسط کوئروم سنسینگ تنظیم می شود (۱۰) (۱۴) .

اعتقاد بر این است که مکانیسم های تنظیمی که *P. aeruginosa* با استفاده از آن ها بیان ژن های ویروانس را مدیریت می کند می تواند کلید کشف روش های درمانی جدید برای کنترل و بازداری از عفونت های باکتریایی باشد. پیشرفت های مطالعاتی اخیر نشان می دهد که مکانیسم ارتباط سلول به سلول که بطور عمده کوئروم سنسینگ (QS) نامیده می شود نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن های ویروانس *P. aeruginosa* دارد. دو دهه قبل واژه QS توسط سه میکروبیولوژیست به نام برپایه مکانیسم های تنظیمی وابسته به دانسیته جمعیت های باکتریایی در چندین ازگانسیم میکروبی پیشنهاد شد. این ارگانسیم ها شامل *Vibrio fischeri*، *Agrobacterium tumefaciens*، *P. aeruginosa* و *Erwinia carotovora* بودند. از آن زمان سیستم های QS متعددی در بسیاری از باکتری های پاتوژن یافت شده که به تنظیم فاکتور های ویروانس و تشکیل بیوفیلم می پرداختند. باکتری های دارای QS سیگنال های شیمیایی کوچکی را تولید و به محیط آزاد می کنند و در دانسیته های جمعیتی بالا سیگنال های تجمع یافته به رسپتور مربوطه متصل می شوند و بیان رونویسی ژن های هدف متعددی را القا می کنند از جمله آن هایی که مربوط به تولید فاکتور های ویروانس هستند. نکته قابل بحث این است که غلظت اتوایندیوسر فقط ناشی از جمعیت باکتریایی نیست بلکه ترکیبی از میزان انتشار و توزیع جزیی هم هست بنابراین عبارات جایگزین مانند احساس انتشار، احساس تاثیر و احساس درک حد نصاب جمعیت ترکیبی هم پیشنهاد می شود.

¹Autoinducer

با علم به اهمیت بالینی *P. aeruginosa* در انسان، این باکتری به‌عنوان یک ارگانیسم مدل برای مطالعات QS انتخاب شده است. پیشرفت‌های مطالعاتی در دو دهه اخیر ثابت می‌کند که شبکه QS پیچیده‌ای در این پاتوژن وجود دارد که از مجموعه کمی از سیستم‌های مرتبط به هم مانند *las*، *iqs*، *pqs* و *rhl* تشکیل شده است. سیستم‌های QS در *P. aeruginosa* بشدت قابل تطبیق و قادر به پاسخ به علائم بیوکنترل خارجی هستند که پاتوژن را قادر به کنترل بیان ژن‌های ویروالانس می‌کند.

مفهوم QS در *P. aeruginosa* در ادامه مفاهیم مربوطه پروتوتایپ *Vibrio fischeri* در *luxI-luxR* عنوان شد که در آن *luxI* بیوسنتز سیگنال آسیل هموسرین لاکتون (AHL) یعنی N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) و *luxR* فاکتور رونویسی وابسته به AHL را کد می‌کردند. همولوژی بین پروتئین‌های *LasR* و *LuxR* موجب این تصور شد که *LasR* تنظیم‌کننده کلیدی در بیان ژن *lasB* کدکننده متالوپروتئاز الاستاز می‌باشد. بعلاوه *LasR* برای تنظیم رونویسی *aprA*، *lasA* و *toxA* مورد نیاز است و بنابراین تنظیم‌کننده عمومی برای ژن‌های ویروالانس در *P. aeruginosa* می‌باشد. پیشنهاد می‌شود که *lasI* سیگنال‌های AHL دارای خاصیت خودالقایی و ویژگی‌های تنظیم‌کننده الاستاز را تولید می‌کند. یک سال بعد ساختار شیمیایی واقعی اتوآیندیوسر *P. aeruginosa* (PAI) به صورت N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (OdDHL) شناخته شد.

مدت کوتاهی بعد از آن اتوآیندیوسر ثانویه، فاکتور ۲، در *P. aeruginosa* شناسایی شد. این کشف به دنبال مشاهدات پازل‌گونه‌ای بود که غلظت‌های بسیار بالایی از OdDHL برای فعال‌سازی پروموتور *lasB* مورد نیاز بود بنابراین پیشنهاد شد که فاکتور دیگری در PAO1 برای فعال‌سازی *lasB* مورد نیاز می‌باشد. فاکتور ۲ در *P. aeruginosa* به لحاظ ساختاری N-butyrylhomoserine lactone (BHL) می‌باشد. در طی همان سال کشف شد که *RhlR* (پروتئین تنظیمی که توسط کلاستر ژنی *rhlABR* رامنولپید سنتاز کد می‌شود، رسپتور ویژه BHL می‌باشد. ژن *rhlI* که بیوسنتز BHL را کد می‌کند همولوژی قابل توجهی با *lasI* و *luxI* دارد و در پایین دست کلاستر *rhlABR* وجود دارد. بیان *rhlI* می‌تواند تولید چندین ترکیب از جمله

الاستاز، پیوسیانین، همولیزین و رامنولیپید را القا کند و *RhlI* و *RhlR* برای فعال شدن پروموتور های *lasB* و *rhlABR* مورد نیاز هستند.

این اکتشافات کلیدی در سیستم های QS در *P. aeruginosa* تحقیقات دیگر را درباره فعالیت آن ها، رگولون ها و مکانیسم های مولکولی که سیستم های *las* و *rhl* کار می کنند تشویق کرد. نتایج نشان داد که بعد از اتصال اتوایندیوسر های *OdDHL* و *BHL* پروتئین های رسپتور *LasR* و *RhlR* فعال شده و تشکیل کمپلکس می دهند. *LasR-OdDHL* و *RhlR-BHL* به جعبه های *las-rhl* حفاظت شده موجود در پروموتور ژن های هدف متصل می شوند و بنابراین بیان آن ها را افزایش می دهند. مطالعات ترنسکریپتوماتیک روی موتانت های *lasI* و *rhlI* نشان می دهد که رگولون ها در ارتباط پیوسته ای با ژن هایی هستند که برخی به خوبی به *OdDHL* (ماتتد *lasA*)، برخی به *BHL* (مانند *rhlAB*) و برخی بطور مساوی به هر دو پاسخ می دهند و این ژن ها تقریباً ۱۰٪ از ژن های *P. aeruginosa* را تشکیل می دهند و بنابراین بخش عمده ای از فرآیند های فیزیولوژیک و فاکتور های ویروالانس را تشکیل می دهد. برخی از این ژن های ویروالانس کلیدی در جدول ۱ لیست شده اند.

LasR همچنین قادر به القای بیان *RsaL* است که رپرسور رونویسی *lasI* می باشد. اتصال *RsaL* به پروموتور دو جهتی *rsaL-lasL* از بیان هر دو ژن ممانعت می کند که فیدبک منفی را در جهت مخالف فیدبک سیگنال مثبت لویی که قبلاً ذکر شد ایجاد می کند و در نهایت میزان *OdDHL* را تنظیم می کند. از آنجایی که *LasR/OdDHL* و *RsaL* در رقابت برای یک منطقه اتصالی روی ناحیه پروموتوری *lasI* نیستند بازداری با *RsaL* قوی تر از فعال سازی با *LasR* می باشد. *RsaL* همچنین بیان برخی ژن های هدف QS همانند ژن های بیوسنتز پیوسیانین و سیانید ها را ممانعت می کند. طیفی از پروتئین های تنظیمی مثبت و منفی شناسایی شده اند و سیستم های *las* و *rhl* را از مسیر های مختلفی کنترل می کنند.

علاوه بر این دو سیستم، سیستم سوم (PQS) و چهارم (IQS) نیز در این باکتری شناسایی شده اند. سوءمصرف آنتی بیوتیک ها باعث ایجاد فشار انتخابی می شود، که نتیجه آن گسترش سویه های باکتریایی مقاوم است (۱۵). همچنین آنتی بیوتیک ها باعث از بین رفتن باکتری های مفید بدن می شوند، که نقش محافظتی علیه

باکتری های پاتوژن دارند (۱۶). بعلاوه آنتی بیوتیک ها علیه باکتری های درون بیوفیلم موثر نیستند (۱۷). با توجه به محدودیت های آنتی بیوتیک ها نیاز به کشف و توسعه روش های درمانی جدید، به منظور کنترل کارآمد و مدیریت بیماری های عفونی باکتریایی احساس می شود (۱۸). *P. aeruginosa* به دلیل داشتن فاکتور های ویروانس متعدد و توانایی تشکیل بیوفیلم که درمان آنتی بیوتیکی را نا کارآمد می کند، موجب افزایش بیماری های عفونی مزمن می شود (۱۹).

با شیوع روز افزون عفونت های زخم و سوختگی ناشی از *P. aeruginosa* مقاوم به دارو، نیاز به راهکار های جایگزین یا مکمل احساس می شود. فتودینامیک تراپی ضد میکروبی^۲ (APDT) یکی از راهکار های امیدبخش است. PDT روش غیر تهاجمی است که از ترکیب حساسگر نوری، اکسیژن و نور مرئی، باعث تولید رادیکال های اکسیژنی فعال میشود که بطور انتخابی سلول های در حال رشد سریع را نابود می کنند (۲۰). در حضور اکسیژن، حساسگر نوری برانگیخته شده، انرژی یا الکترون را به اکسیژن مولکولی داده و تولید گونه های فعال اکسیژنی^۳ (ROS) می کند. رادیکال های اکسیژنی آزاد شده از طریق اکسیداسیون لیپید غشای سیتوپلاسمی، نوکلئیک اسید و آنزیم های غشایی موجب تخریب سلول باکتری می شوند (۲۱).

PDT بیش از صد سال پیش با مشاهده مرگ میکروارگانیسم ها در مجاورت ترکیب نور مرئی و رنگ های مضر در شرایط آزمایشگاه کشف شد. از آن زمان این روش برای درمان سرطان، ناهنجاری های مربوط به چشم و در مورد بیماری های پوستی به کار می رود. طی سال های اخیر اثرات ضد میکروبی PDT مجددا مورد مطالعه قرار گرفته و به عنوان گزینه درمانی برای درمان طیف وسیعی از عفونت های موضعی، در حال بررسی است (۲۲). با علم به مقاومت باکتری ها به اغلب ترکیبات دارویی، APDT از گزینه های مورد توجه و نسبتا اثر بخش در زمینه درمان بسیاری از عفونت های میکروبی مطرح می شود. پس از تجربیات اولیه متخصصین بر روی نمونه های آزمایشگاهی، روند مطالعه آن برای درمان بیماری های عفونی و موضعی ادامه یافت (۲۳). مزایایی که APDT را به عنوان گزینه درمانی مناسب معرفی کرده اند، شامل موارد زیر است:

^۲Antimicrobial photodynamic therapy

^۳Reactive oxygen species

۱- عدم مقاومت باکتری های مقاوم به دارو به این روش درمانی به علت اهداف متعدد سلولی آن و کوتاه بودن عمر گونه های فعال اکسیژنی ایجاد شده، ۲- اثربخشی فوری آن بر روی باکتری ها، ۳- وسیع الطیف بودن آن شامل عملکرد علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، ۴- عدم سمیت آن به ویژه در غلظت های پایین حساسگر نوری بر سلول های انسان، ۵- عدم اثر بر فلور میکروبی به علت استفاده موضعی از آن، ۶- کاهش شدت بیماری با اثر بر فاکتور های ویروانس مانند توکسین ها (۲۴).

مطالعات پیشین به بررسی اثرات APDT علیه باکتری ها، با استفاده از حساسگر های نوری متفاوت، دوز نوری و باکتری های متفاوت پرداخته است. اما اثر APDT با رنگ متیلن بلو بر بیان ژن های فاکتور های ویروانس وابسته به کوئروم سنسینگ در باکتری *P. aeruginosa* تا به حال مطالعه نشده است. مطالعه مولکولی بیان ژن های تحت کنترل کوئروم سنسینگ اطلاعات دقیقی در مورد اثر APDT بر بیان ژن ها در اختیار قرار می دهد که می توان بر مبنای آن روش های درمانی موجود را بهبود بخشید.

مروری بر پیشینه پژوهش

Hamblin و همکاران در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار از مدل های عفونت زخم موش برای ارزیابی اثرات PDT در درمان عفونت های ناشی از *Escherichia coli* و *P. aeruginosa* استفاده کردند. آن ها از حساسگر نوری کانژوگه L-lysin و chlorin و نور لیزر 660 nm استفاده کردند. نتایج حاصله نشان داد هر ۳ گروه کنترل فاقد تیمار، ظرف مدت ۵ روز مردند، در حالی که ۹۰٪ از موش های تیمار شده با PDT زنده

ماندند(۲۵). Hamblin و همکاران در سال ۲۰۰۵ پیشنهاد کردند که زمانی که زخم های آلوده با *P. aeruginosa* با PDT تیمار می شوند، نسبت به زمانی که با نیترات نقره تیمار می شوند سریع تر بهبود می یابند. علت این امر غیر فعال سازی فتودینامیکی^۴ (PDI) فاکتور های ویروانس آن مانند پروتئاز می باشد. آن ها از حساسگر نوری کانژوگه پلی کاتیونی و تابش نور قرمز استفاده کردند(۲۶). Garcez و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر PDT را با حساسگر polyethyleniminechlorin و نور لیزر علیه باکتری های گرم منفی *P. aeruginosa* و *Proteus mirabilis* در عصب کشی دندان به کار بردند و نتیجه گرفتند PDT به تنهایی کاهش ۹۵٪ بیولومینسانس باکتریایی را به دنبال داشت(۲۷). Garcez و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات ضد میکروبی PDT را با حساسگر نوری متیلن بلو و نور لیزر علیه بیوفیلم های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی در بافت های سخت دندانی بررسی کردند. آن ها ۱۰ دندان انسان را با *P. aeruginosa* و *Enterococcus faecalis* بیولومینسانس به مدت ۳ روز کشت دادند و ساختار و مورفولوژی بیوفیلم های باکتریایی را با استفاده از SEM قبل و بعد از PDT مقایسه کردند. در نهایت گزارش کردند PDT قادر به نفوذ در ماتریکس خارج سلولی بیوفیلم ها و تخریب آن ها می باشد و میزان کاهش وابسته به دوز نور تابشی است(۲۸). Kashef و همکاران در سال ۲۰۱۳ PDT را علیه سویه های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از حساسگر نوری هیپرسین و دوز نوری 48 J/cm^2 لامپ LED بررسی کرده و کاهش لگاریتمی در تعداد سویه های استاندارد *P. aeruginosa*، *S. aureus*، *E. coli* و *E. faecalis* را به ترتیب معادل ۰/۷، ۶/۳، ۶/۲ و ۶/۵ گزارش کردند(۲۹). Kashef و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر sub-lethal PDT را با استفاده از رنگ های تولوئیدن بلو (TBO) و متیلن بلو (MB) روی حساسیت آنتی بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلم ۴۰ سویه بالینی *S. aureus* بررسی کردند. نتایج نشان داد که sub-lethal MB/TBO-PDT مقاومت به آنتی بیوتیک های اریترومایسین، آموکسی سیلین-کلاولونیک و آمیکاسین را افزایش می دهد. بعلاوه توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه ها بعد از دوبار قرار گرفتن در معرض PDT نسبت به نمونه شاهد فاقد تیمار با PDT افزایش یافت. با این حال زمانی که از دوزهای lethal PDT استفاده شد باعث مرگ ومیر و کاهش مقاومت به این آنتی بیوتیک ها

⁴Photodynamic inactivation

شده (۳۰). Pourhajibagher و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر sublethal PDT را همراه با حساسگر نوری TBO علیه ایزوله های بالینی *Acinetobacter colistin-resistant, extensively drug-resistant* و *baumannii* (CR-XDR-AB) و *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 بررسی کردند و توانایی تشکیل بیوفیلم، *outer membrane integrity* و پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی آن ها را بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشاندهنده کاهش ویرولانسی سویه ها و افزایش حساسیت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده بود. Lei و همکاران در سال ۲۰۱۵ PDT را با حساسگر δ -aminolevulinic acid و نور لیزر ۶۳۰nm برای زخم های پوستی مزمن عفونی با *P. aeruginosa* استفاده کردند. نتایج به دست آمده نشان دهنده بهبود سریع تر زخم های مزمن بود (۳۱).

مطالعات انجام شده بر کنترل کوئروم سنسینگ از ترکیبات مهار کننده AHL یا آنالوگ های رقابتی آن استفاده کرده اند. از جمله این مطالعات می توان به این موارد اشاره کرد:

Geske و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که آنالوگ های سنتتیک AHL از تشکیل بیوفیلم و سیستم کوئروم سنسینگ بر پایه LasR در *P. aeruginosa* PAO1 ممانعت می کند (۳۲).

Smith و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که آنالوگ های سنتتیک AHL بیان *LasI AHL synthase* را کاهش می دهند و سبب کاهش بیان فاکتور های ویرولانسی پیوسیانین و الاستاز و تغییر در فنوتیپ بیوفیلم *P. aeruginosa* می شوند (۳۳).

Ishilda و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که آنالوگ های سیکلوپنتیل AHL بیان *lasI* و *rhlA* تولید فاکتور های ویرولانسی از جمله پیوسیانین، الاستاز، رامنولیپید و تشکیل بیوفیلم را ممانعت کرده ولی روی رشد باکتری تاثیر نمی گذارند (۳۴).

Skinderose و همکاران در سال ۲۰۰۸، Tateda و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Ichimiya و همکاران در سال ۱۹۹۶ اثر مهار آنتی بیوتیک آزیترومایسین را بر سیستم کوئروم سنسینگ نشان دادند (۳۵) (۳۶) (۳۷).

Rasmussen و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که پنی سیلیک اسید و پاتولین بیان ژن های کوئروم سنسینگ *P. aeruginosa* را با اثر بر روی پروتئین های تنظیمی *RhlR* و *LasR* کنترل می کند (۳۸).



Skinderose و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که مانولید (ترکیب سسترتینوئید مشتق شده از

ارگانیسیم دریایی *Luffariellavariabilis*) فعالیت ضد کوئروم سنسینگ و ضد بیوفیلمی علیه *P.*

Archive of SID



اهداف پژوهش

Archive of SID

در مقدمه ذکر شده، خلاصه ای از مشکلات مرتبط با عفونت های زخم و درمان آن ها بیان شد. درمان فعلی عفونت ها با دو مشکل عمده مواجه است: ۱- افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی، ۲- قرار گرفتن باکتری در ساختار بیوفیلم که هر دوی این عوامل منجر به شکست در درمان می شوند.

ظهور باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و پیشرفت آهسته در شناسایی عوامل ضد میکروبی جدید و موثر منجر به پژوهش های عمده جهت کشف استراتژی های درمانی جایگزین شده است. PDT مشخص شده که باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک همانند باکتری های نوع وحشی به PDT حساس هستند. بنابراین این روش امکان درمان عفونت های ناشی از عوامل بیماری زای میکروبی به خصوص سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک را فراهم آورده است. یکی از ویژگی های مفید PDT، کاربرد موضعی این روش بویژه در موارد عفونت های مرتبط با سوختگی های شدید می باشد. در این مطالعه سعی شده اثر PDT بر تولید فاکتور های ویبرولانس مهم *P. aeruginosa* بررسی شود؛ تا عملکرد موثر این روش بر سویه های بالینی تایید شود. لذا در این پژوهش اهداف زیر دنبال شد:

۱- اهداف (کلی - ویژه و کاربردی) (Objectives: General- Specific & Applied):

- ۱- بررسی اثر فتودینامیک تراپی ضد میکروبی در تشکیل پیگمان و رامنولپید و پیلی در باکتری *P. aeruginosa*
- ۲- بررسی اثر فتودینامیک تراپی ضد میکروبی بر بیان برخی از ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلم پیگمان و رامنولپید و پیلی
- ۳- بررسی اثر فتودینامیک تراپی ضد میکروبی بر بیان برخی از ژن های سیستم های کوئروم سنسینگ (*rhl* و *las*)

۲-۳ سوالات یا فرضیات پژوهشی (Hypothesis):

- ۱- آیا APDT بیان ژن پیوسیانین (*phzM*) باکتری *P. aeruginosa* را تغییر می دهد؟
- ۲- آیا APDT بیان ژن رامنولپید (*rhlA*) باکتری *P. aeruginosa* را تغییر می دهد؟

- ۳- آیا APDT بیان ژن پیلی (*pilT*) باکتری *P. aeruginosa* را تغییر می دهد؟
- ۴- آیا APDT بیان ژن *rhlI* مربوط به کوئرم سنسینگ را تغییر می دهد؟
- ۵- آیا APDT بیان ژن *rhlR* مربوط به کوئرم سنسینگ را تغییر می دهد؟
- ۶- آیا APDT بیان ژن *lasI* مربوط به کوئرم سنسینگ را تغییر می دهد؟
- ۷- آیا APDT بیان ژن *lasR* مربوط به کوئرم سنسینگ را تغییر می دهد؟
- ۸- آیا ارتباطی بین تغییرات بیان ژنهای مربوط به کوئرم سنسینگ با تغییرات ژن پیوسیانین وجود دارد؟
- ۹- آیا ارتباطی بین تغییرات بیان ژنهای مربوط به کوئرم سنسینگ با تغییرات ژن رامنولپید وجود دارد؟
- ۱۰- آیا ارتباطی بین تغییرات بیان ژنهای مربوط به کوئرم سنسینگ با تغییرات ژن پیلی وجود دارد؟



روش انجام پژوهش

Archive of SID

۳-۱ مطالعات فنوتیپی

به منظور بررسی اثر فتودینامیک تراپی بر بیان ژن های ویروانس باکتری *P. aeruginosa*، ۳ فاکتور ویروانس مهم این باکتری انتخاب شد. این فاکتور ها شامل پیلی تیپ IV، رامنولپید و پیگمان پیوسیائین می باشند.

۳-۲ سویه های باکتری و شرایط کشت

سویه های *P. aeruginosa* ATCC 27853 و ۵ ایزوله باکتریایی *P. aeruginosa* در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. ایزوله های بالینی از عفونت های زخم های سوختگی جمع آوری شده و در Skim milk نگهداری می شدند و با رعایت شرایط استریل در پلیت های نوترینت آگار کشت داده شدند.

۳-۳ آماده سازی محیط Skim milk

8/5 گرم از پودر Skim milk وزن شده و به حجم ۸۵ ml رسانده شد و به همراه ۱۵ ml گلیسرول به طور جداگانه به ترتیب به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه در دمای ۱۱۰ و ۱۲۱ درجه اتوکلاو شدند سپس با رعایت شرایط استریل، این دو ماده با هم ترکیب شدند. ۱ ml از آن توسط سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب استریلی ریخته شد. سپس از کشت های ۲۴ ساعته باکتری ها در محیط NA چند کلنی با لوپ برداشته و در میکروتیوب ها تلقیح شد. میکروتیوب ها در فریزر 20°C - نگهداری شدند.

۳-۴ آماده سازی حساسگر نوری متیلن بلو (MB):

محلول ذخیره با غلظت $3200\ \mu\text{M}$ در آب مقطر آماده شد. بدین صورت که ۰/۰۱ گرم از MB در ۱۰ ml آب کاملاً حل و سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل گردید و در یخچال در شرایط تاریکی نگهداری شد. قبل از آزمایش تا غلظت $6/25\ \mu\text{M}$ به صورت رقت های دوتایی رقیق شد.

۳-۵ منبع نوری

برای همه آزمایشات منبع نوری مورد استفاده لیزر کم توان ساطع کننده نور با توان خروجی ۳۰ mW و طول موج ۶۵۰ nm می باشد. با استفاده از فرمول زیر میزان دوز نوری (J/cm^2) که مرتبط با مدت زمان تابش بود، محاسبه شد. تمام آزمایش ها در میکروتیوب ۲ ml با قطر دهانه ۱ میلی متر انجام شد. با توجه به فرمول، در آزمون غیر فعال سازی سویه های پلانکتونی، با مدت تابش ۱۰ دقیقه میزان دوز نوری $22/29 J/cm^2$ است.

$$\frac{\text{توان خروجی (W)} \times \text{زمان تابش دهی (sec)}}{\text{مساحت (cm}^2\text{)}} = \text{انرژی دانسیته (J/cm}^2\text{)}$$

۳-۶ مراحل غیر فعال سازی فتودینامیکی *P. aeruginosa*

در ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها، سوسپانسیونی با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. ۵۰۰ μl از سوسپانسیون باکتری و ۵۰۰ μl حساسگر نوری MB در یک میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با نور قرمز لیزر مورد تابش قرار گرفت. پس از پایان زمان تابش، چندین مرتبه پیپتاژ انجام شد؛ سپس رقت های سریالی ده تایی تهیه و از هر رقت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت نوترینت آگار منتقل شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در $37^\circ C$ گرمخانه گذاری شدند. کلنی های رشد کرده بر سطح محیط پس از ۲۴ ساعت شمارش شدند. تمامی مراحل سه مرتبه تکرار شد و گروه های کنترل عبارت بودند از: کنترل مثبت که هیچ تیماری بر روی آن انجام نشد (بدون رنگ و بدون تابش)، گروهی که تنها در معرض تابش منبع نور قرار گرفت و گروهی که تنها با رنگ مجاور بود.

۳-۷ سنجش توان تشکیل پیگمان باکتری

به منظور سنجش میزان تولید پیگمان پیوسیانین، باکتری ها در محیط LB آگار کشت شبانه داده شده و در سالین ۰/۹٪ معادل ۰/۵ مک فارلند شد. محیط کشت LB براث دارای ۱٪ گلیسرول و ۱٪ NaCl آماده شده و

۵ ml از آن به هر لوله آزمایش استریل منتقل شد. سپس ۰/۵ ml سوسپانسیون باکتری به محیط اضافه شده و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور 37°C انکوبه شد. پس از آن لوله ها از انکوباتور خارج شده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. ۱ ml از هر لوله به میکروتیوب استریل منتقل شده و سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm) به مدت ۱۰ دقیقه) شد. سپس مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و ۱ ml کلروفرم به آن اضافه و ورتکس شد. پس از تغییر رنگ سبز به آبی، مجدداً سانتریفیوژ انجام شده و مایع رویی دور ریخته شد و ۵۰۰ μl از ۰/۱N HCl به آن اضافه و ورتکس شد. پس از تشکیل رنگ ارغوانی، ۲۰۰ μl از هر میکروتیوب به یک چاهک از میکروتیترپلیت ۹۶ خانه منتقل و با استفاده از الیزا ریدر در طول موج ۵۴۵ nm خوانده شد. اعداد بدست آمده در ضریب فاکتور ۱۷/۶۷ ضرب شد تا میزان تشکیل پیوسیانین مشخص گردد (۳۹). همین مراحل برای سویه هایی که مورد تیمار فتودینامیکی قرار گرفته بودند نیز انجام شد.

۳-۸ سنجش میزان تولید رامنولپید

به منظور سنجش میزان تولید رامنولپید محیط کشت سنتتیک متیلن بلو آگار ساخته شد به این ترتیب که محیط LB آگار با ۰/۲٪ CTAB و ۰/۰۵٪ متیلن بلو ترکیب و اتوکلاو شد. پس از توزیع در پلیت و بسته شدن آگار، با استفاده از پیپت ۵ ml استریل چاهک هایی در محیط جامد ایجاد شد. مجدداً باکتری ها به روشی که توضیح داده شد آماده و تحت تیمار فتودینامیک تراپی قرار گرفتند. ۳ μl از سوسپانسیون هر باکتری به یک چاهک منتقل و ۷۲ ساعت در تاریکی در 37°C گرماگذاری شد. سپس به مدت ۶ ساعت در یخچال قرار گرفت تا هاله تولید رامنولپید مشخص شود. در نهایت پلیت ها با ترانس ایلومینیتور مشاهده و قطر هاله اندازه گیری شد.

۳-۹ سنجش تشکیل پیلی

به منظور سنجش میزان تشکیل پیلی قبل و بعد از فتودینامیک تراپی، از میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده شد. باکتری ها پس از تیمار با فتودینامیک تراپی بر روی شیشه فیکس شده و به مدت ۲ ساعت در تماس با

گلو تارالدهید ۴٪ قرار گرفتند پس مراحل آگیری با قرار دادن شیشه ها در اتانول ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و نمونه ها با میکروسکوپ الکترونی (Vega3 Imu TESCAN, Czeck republic) مشاهده و عکس برداری گرفته شد (۴۰).

۱۰-۳ مطالعات ژنوتیپی

جهت انجام مطالعاتی ژنوتیپی تغییرات بیان ژن های فاکتور های ویروالانس پس از انجام فتودینامیک تراپی، ابتدا ژن های مورد نظر انتخاب شد. این ژن ها برای پیل، pilT، برای رامنولیپید rhlA و برای پیوسیانین phzM بود. همچنین به منظور بررسی اثر فتودینامیک تراپی بر سیستم های کوئروم سنسینگ در باکتری Pseudomonas، دو سیستم تنظیمی اصلی آن یعنی las و Rhl انتخاب شد. ژن های مورد نظر lasI, lasR, rhlI و rhlR بودند. پرایمر ژن ها با استفاده از برنامه الیگو ۷ طراحی شده و اختصاصیت آن ها با انجام blast در پایگاه اطلاعات داده مربوط به نوکلئیک اسید (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس سکانس ها سفارش داده شد. توالی پرایمر ها، اندازه قطعات و دمای اتصال در جدول ۴-۱ آورده شده است.

جدول ۳-۱: توالی پرایمر ها، اندازه قطعات و دمای اتصال آنها برای بررسی بیان ژنها

Genes		Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size
rhlA	F	GAGCGCTTCGAGGTCAATCAC	61	258
	R	CTGATGGTTGCTGGCTTTCAGG		
pilT	F	TCGTCCACGAATCGAAGAAGTGC	62	121
	R	TCGCCGACCAGGATGATGTC		
phzM	F	AGACTTCTACAGCTACCTGAAGC	60	166
	R	GATGGCCTTGGTCAATTCGC		
lasI	F	CCGTTTCGCCATCAACTCTGG	61	153
	R	CGGATCATCATCTTCTCCACGC		
lasR	F	GCAGCACGAGTTCTTCGAGG	61	183
	R	GCGTAGTCCTTGAGCATCCAC		

rhII	F	CCGACGCCTACCTGCTCAAG	62	222
	R	TGCGAACGAAATAGCGCTCCA		
rhIR	F	CGCCACACGATTCCCTTCAC	61	150
	R	GCTCCAGACCACCATTTCCGA		
16S rRNA	F	GGCTCAACCTGGGAACTGCA	62	137
	R	CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGC		

۱۱-۳ Colony PCR

برای اطمینان از صحت تمامی پرایمر ها، colony PCR انجام شد. به این منظور باکتری ها شبانه در محیط LB آگار کشت داده شدند. یک کلنی از باکتری به سالین ۰/۹٪ استریل منتقل شد. colony PCR با ۲۰ μl ماستر میکس (Sinaclone, Iran)، پرایمر های فوروارد و ریورس، آب و سوسپانسیون باکتری انجام شد. مراحل انجام colony PCR: یک سیکل ۹۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل ۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، ۶۱ به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه؛ انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ °C و انکوباسیون نهایی در ۴ °C بود. سپس قطعات تکثیر شده با ژل آگارز ۱/۵٪ دارای DNA safe stain الکتروفورز و با استفاده از UV transilluminator (Sabz, Iran) مشاهده شد.

۱۲-۳ آماده سازی ژل آگارز ۱/۵٪

ابتدا ۴۵ گرم از پودر آگارز را وزن کرده و درون یه ظرف شیشه ای می ریزیم، سپس ۳۰ ml بافر TBE 0.5X به آن اضافه می کنیم. ظرف شیشه ای را درون مایکروویو حرارت داده تا زمانی که مایع شفاف شود. سپس ۱ μl از DNA safe stain را به آن منتقل کرده و پس از خنک شدن آن را در سینی مخصوص ژل (Tray) که شانه مخصوص ایجاد چاهک روی آن سوار شده است می ریزیم و صبر می کنیم تا کاملاً ببندد. شانه را خارج کرده و سینی را درون تانک الکتروفورز قرارداده و نمونه ها را بارگزاری می کنیم.

۳-۱۳ بافر بارگزاری

برای بارگزاری راحت تر نمونه ها ابتدا آن ها را با رنگ مخصوص (Loading buffer dye) مخلوط کرده و به درون چاهک منتقل می نماییم.

این بافر مخصوص دارای ۳ ویژگی است:

- ۱- باعث میشود نمونه ها در ته چاهک ها قرار گیرند.
- ۲- باعث رنگ دار شدن نمونه و مشاهده آن در طی فرایند بارگذاری میشود.
- ۳- مانند اسیدهای نوکلئیک در میدان الکتریکی حرکت میکند

۳-۱۴ بافر الکتروفورز

بافر درون تانک الکتروفورز و بافری که با آن ژل را میسازیم (در اینجا TBE 0.5X) باید یکسان باشد.

۳-۱۵ استخراج RNA

ابتدا تیمار فتودینامیکی همانند آنچه ذکر شد انجام شده و سپس میکروتیوب ها در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد تا رنگ MB اضافی خارج شود. سپس دو مرحله شستشو با سالین صورت گرفت و پس از آن به میزان ۱/۲۰ حجم هر میکروتیوب، بتا مرکاپتو اتانول به آن اضافه شد. این ترکیب یک ترکیب مهار کننده RNase می باشد. سپس هر میکروتیوب حاوی سوسپانسیون باکتری، سه مرحله در دمای جوش به مدت ۵ دقیقه و بلافاصله در فریزر ۲۰- قرار گرفت. این امر به شکستن دیواره باکتری کمک می کند. در مرحله بعد ۰/۵ ml محلول RNX-Plus (Sinaclone, Iran) سرد به هر میکروتیوب منتقل شده و ۱۰-۵ ثانیه ورتکس و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۲۰۰ µl کلروفرم (Merck, Germany) به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه شیک شد سپس به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه و در نهایت ۱۵ دقیقه در °C و ۴ و ۱۲۰۰۰ rpm انکوبه شد. فاز آبی به میکروتیوب ۱/۵ml جدید منتقل شد، ۲۰۰ µl ایزوپروپانول (Merck,

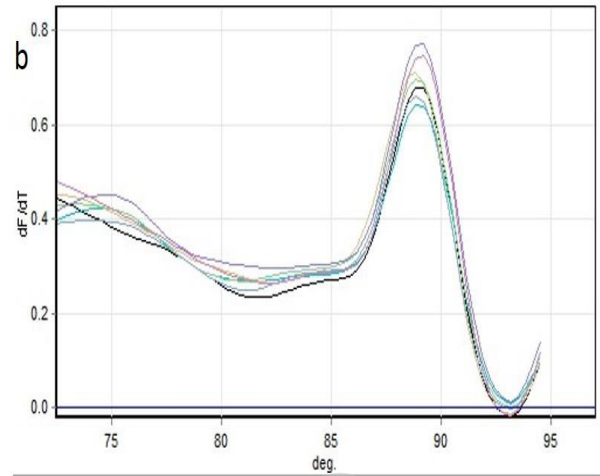
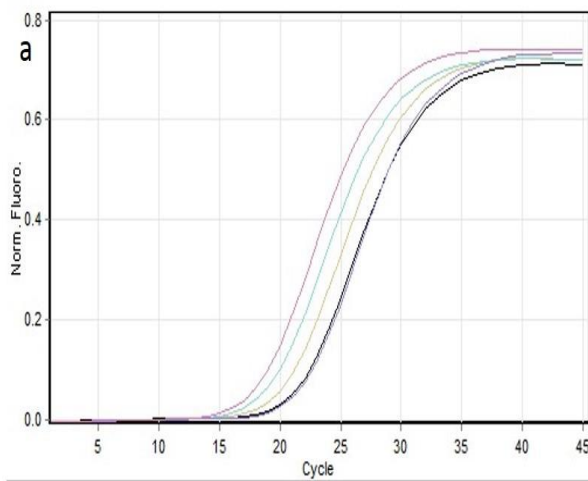
Germany) به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ در 4°C با ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه، سوپرناتانت دور ریخته شده و ۱ ml اتانول ۷۵٪ (Bidestan, Iran) به آن اضافه و در 4°C به مدت ۸ دقیقه با ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شده و به RNA درون هر تیوب اجازه خشک شدن در دمای اتاق داده شد. در نهایت به هر تیوب ۵۰ μl آب دیونیزه استریل اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب $60-5^{\circ}\text{C}$ قرار داده شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از ND-1000 Nanodrop اندازه گیری شد.

۱۶-۳ سنتز cDNA

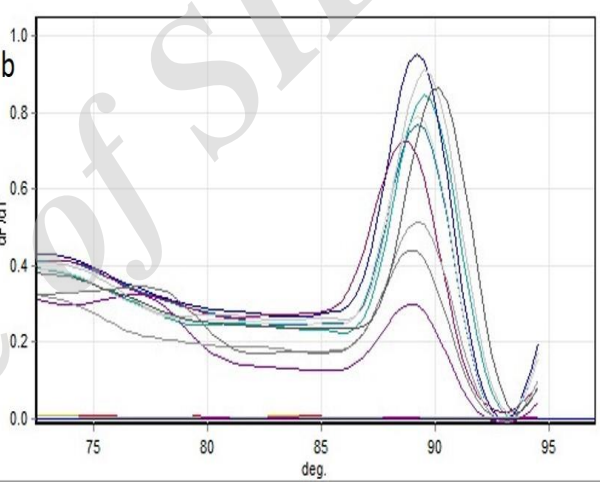
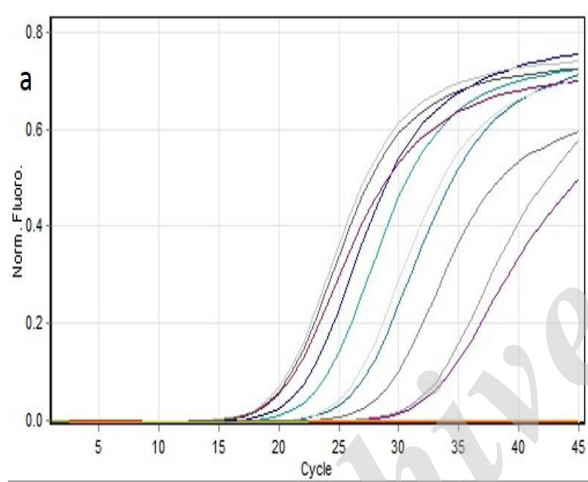
پس از استخراج RNA، سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت سنتز Thermo Scientific کشور آمریکا سنتز گردید.

۱۷-۳ Real-time PCR

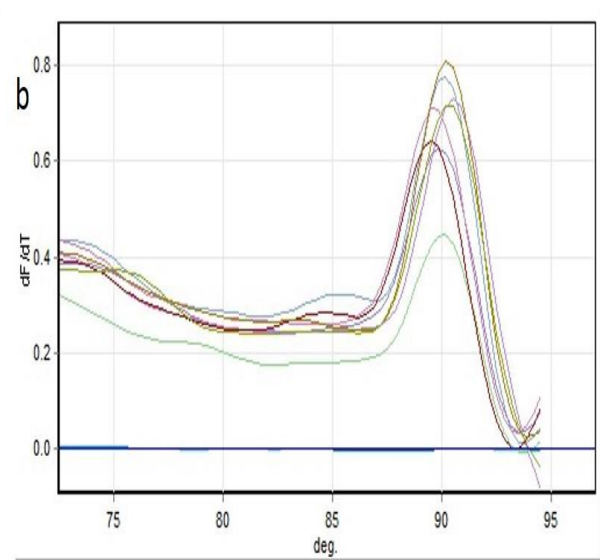
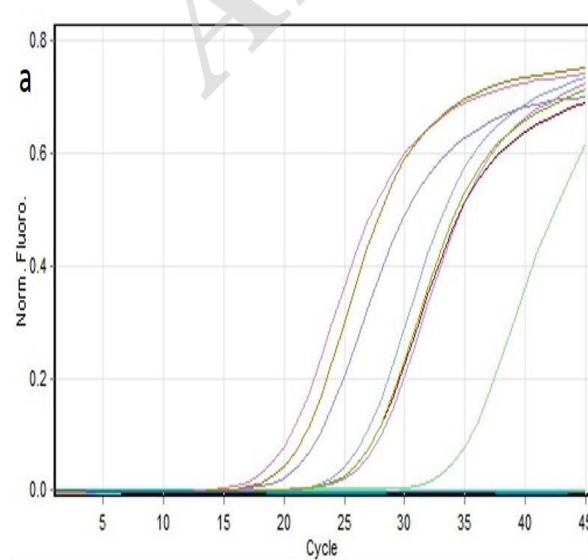
در نهایت تغییرات بیان این ژن ها در باکتری های تیمار شده با فتودینامیک تراپی در مقایسه با باکتری های بدون تیمار از تکنیک real time-PCR با استفاده از کیت محصول شرکت Genaxxon آلمان مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر مربوط به چگونگی انجام آزمایش با نمایش منحنی های تکثیر و ذوب هر کدام از ژن ها در اشکال (۱-۳ تا ۸-۳) نمایش داده شده است.



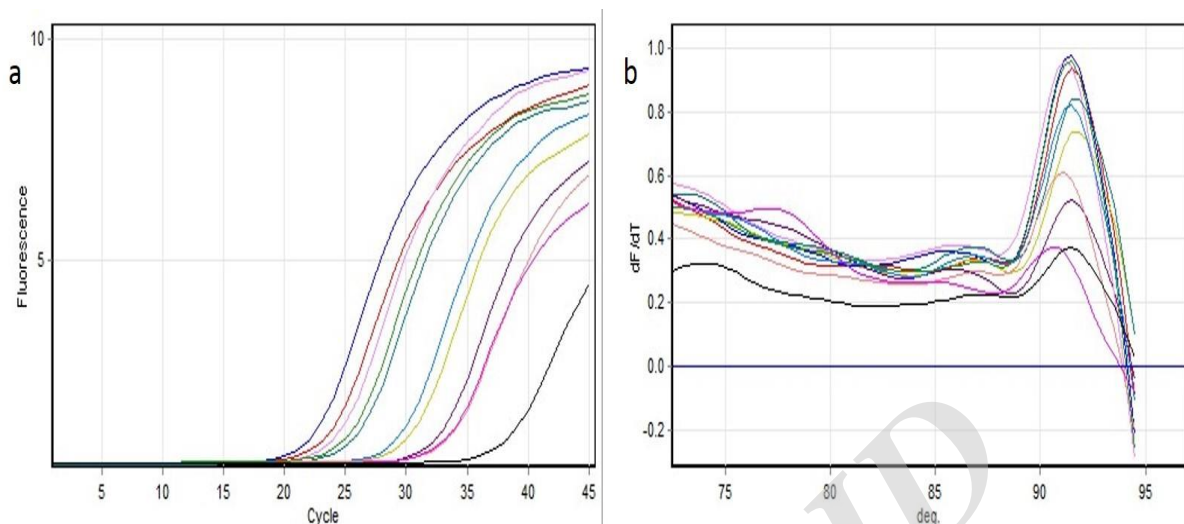
شکل ۱-۳: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *16S rRNA*



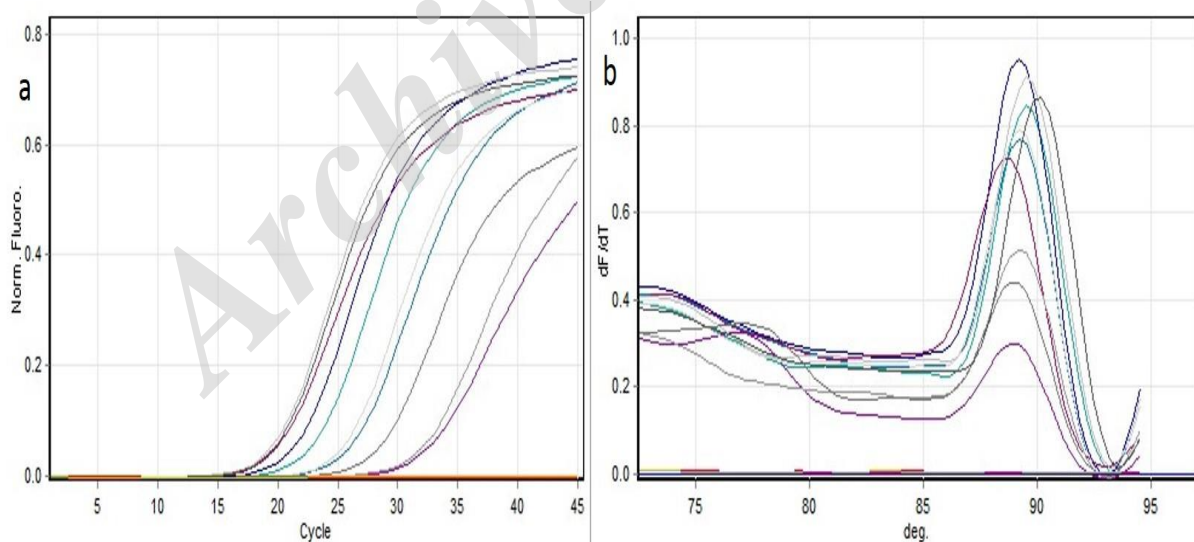
شکل ۲-۳: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *la*



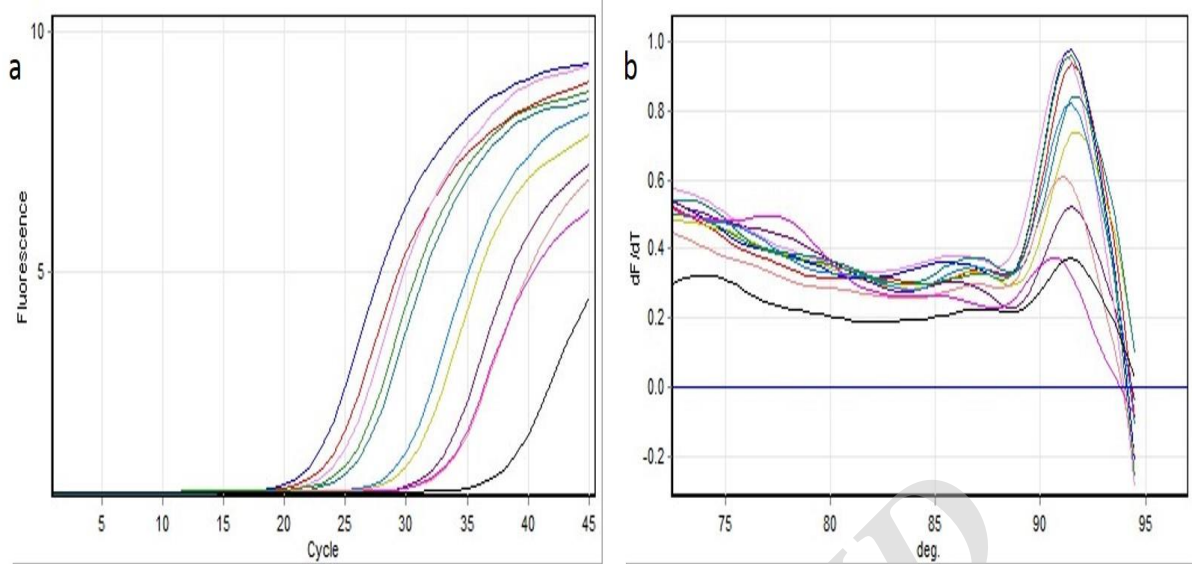
شکل ۴-۳: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *lasR*



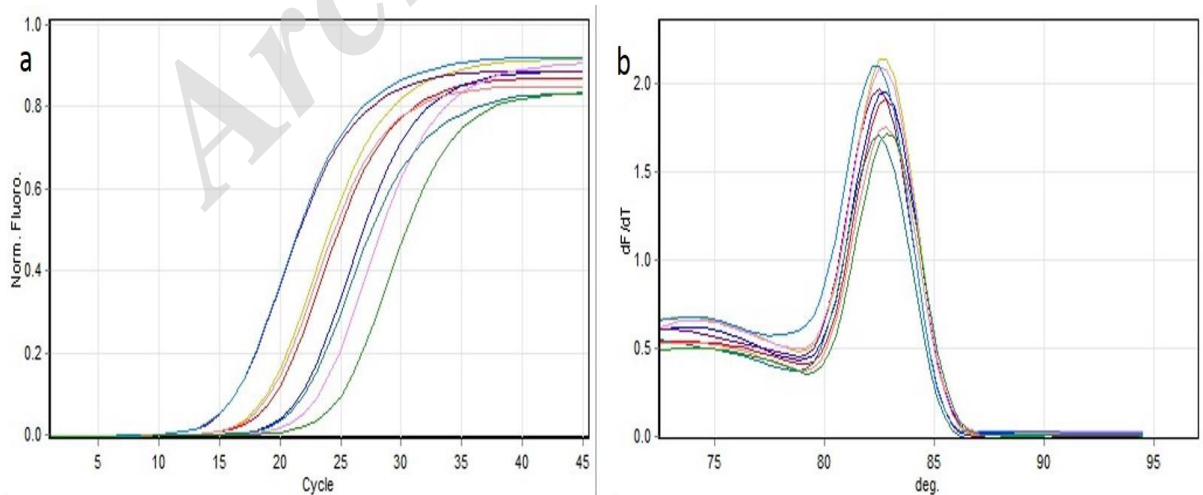
شکل ۳-۴: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *phzM*



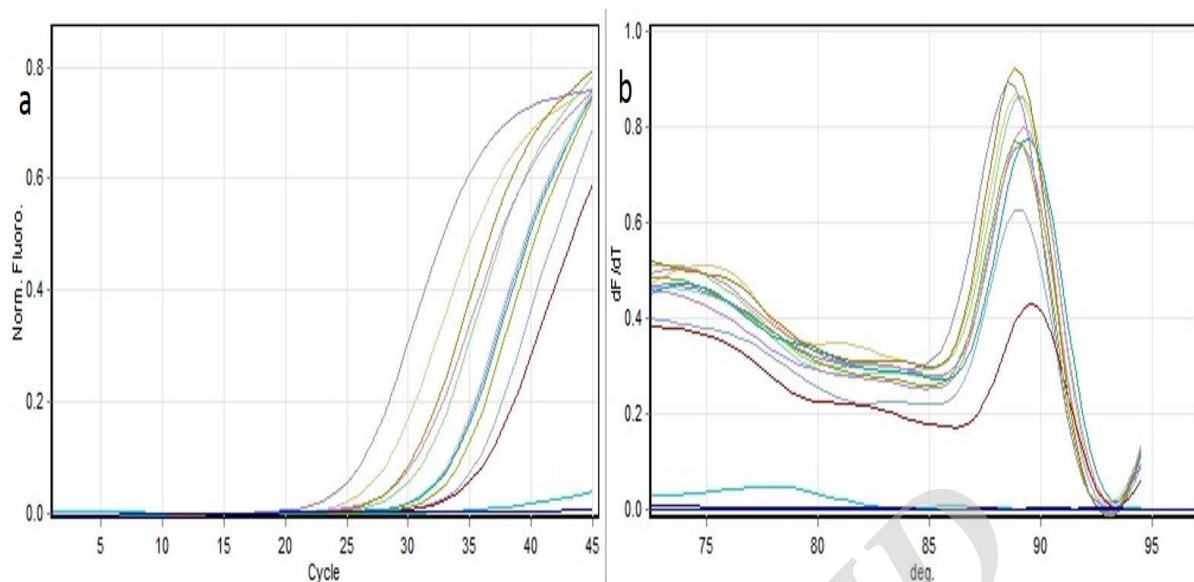
شکل ۳-۵: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *pilT*



شکل ۳-۶: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *rhIA*



شکل ۴-۷: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *rhII*



شکل ۳-۸: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *rhlR*

اطلاعات مربوط به مواد مورد استفاده در انجام این آزمایش در جدول ۲-۳ آمده است.

جدول ۲-۴. مواد مورد نیاز برای هر واکنش در PCR Real-time

مراحل	مواد	مقادیر
1	ddH ₂ O	3.4
2	Forward primer	0.3 pmol
3	Reverse primer	0.3 pmol
4	Syber Green master mix	5
5	total volume	9

برنامه انجام Real-time PCR با استفاده از دستگاه Corbett شرکت کیاژن کشور آلمان در جدول شماره ۴-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۴. برنامه Real-time PCR	
Cycle	Cycle point
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 61°C, hold 15 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 20 secs, acquiring to Cycling A([Green])[1][1])
Melt (72-95°C) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green])[1][1])	

۱۸-۴ آنالیز آماری

آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و مقایسه بین میانگین گروه های مختلف با استفاده از آزمون One-way ANOVA بررسی گردید. مقادیر $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد. به منظور بررسی تغییرات بیان ژن در بین گروه ها از روش $\Delta\Delta CT$ و آزمون T.test استفاده شد.



Archive of SID

نتایج پژوهش

۱-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر رشد جدایه‌های *P. aeruginosa*

برای ارزیابی میزان کاهش سلولی پس از فتودینامیک تراپی، کاهش لگاریتمی هر باکتری در مقایسه با گروه کنترل ارزیابی شد. در تمامی غلظت‌ها کاهش لگاریتمی قابل توجهی مشاهده شد. در غلظت $1600 \mu\text{M}$ هیچ کدام از باکتری‌ها قادر به رشد نبودند. جدول ۱-۵ میزان کاهش $\log_{10} \pm \text{SD}$ را برای تمامی باکتری‌ها در تمامی غلظت‌های استفاده شده نشان می‌دهد. کمترین غلظتی که باعث کاهش $3\log_{10}$ در تعداد باکتری‌ها شده بود به عنوان غلظت کشنده در نظر گرفته شد. بنابراین به ترتیب غلظت ۲۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۵۰ و ۴۰۰ برای سویه‌های ATCC، P1، P2، P5، P6 و P7 در نظر گرفته شد.

غلظت متیلن بلو با ۱۰ دقیقه تابش نور	ATCC	P1	P2	P3	P5	P6	P7
1600	فاقد رشد	فاقد رشد	فاقد رشد	فاقد رشد	فاقد رشد	فاقد رشد	3.72 ± 1.1
800	فاقد رشد	3.06 ± 0.84	فاقد رشد	فاقد رشد	فاقد رشد	فاقد رشد	3.73 ± 1.1
400	4.04 ± 1.2	3.17 ± 0.88	3.15 ± 0.87	3.65 ± 0.22	فاقد رشد	فاقد رشد	3.94 ± 1.2
200	3.22 ± 0.9	3.23 ± 0.9	3.21 ± 0.89	3.04 ± 1.28	3.45 ± 0.98	3.92 ± 1.18	2.64 ± 0.72
100	2.4 ± 1.0	1.98 ± 0.63	3.31 ± 0.96	3.14 ± 0.56	3.8 ± 0.14	3.9 ± 1.18	2.68 ± 0.73
50	2.36 ± 0.66	1.82 ± 0.64	2.17 ± 0.64	2.45 ± 1.11	3.76 ± 1.11	3.85 ± 1.14	2.01 ± 0.63
25	1.38 ± 0.7	1.34 ± 0.72	1.33 ± 0.72	2.03 ± 0.79	2.66 ± 0.72	2.07 ± 0.63	1.5 ± 0.68
12.5	1.18 ± 0.76	1.13 ± 0.77	1.13 ± 0.77	1.93 ± 0.3	1.45 ± 0.69	1.28 ± 0.73	1.01 ± 0.8
6.25	1.17 ± 0.76	1.12 ± 0.78	1.11 ± 0.78	1.31 ± 0.59	1.25 ± 0.74	1.11 ± 0.78	1.06 ± 0.8

کنترل‌های به کار رفته شامل کنترل رنگ بدون تابش نور و کنترل تابش نور بدون رنگ هیچ تفاوت معناداری با کنترل مثبت بدون نور و رنگ نشان ندادند.

۲-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر تشکیل پیگمان پیوسیانین

از بین تمامی سویه‌ها تنها سویه *P. aeruginosa* ATCC 27853 و همچنین دو ایزوله بالینی P2 و P3 قادر به تشکیل پیگمان بودند. نتایج بدست آمده نشان داد که در غلظت‌های کشنده، سلول‌هایی که از

فتودینامیک زنده باقی مانده اند قادر به تشکیل پیگمان هستند اما میزان آن افزایش یافته است. نتایج تولید پیگمان در جدول ۲-۵، ۳-۵ و ۴-۵ نشان داده شده است.

همانطور که در بخش قبل توضیح داده شد نتایج OD بدست از هر سویه در ضریب فاکتور ۱۷/۰۷۶ ضرب شده و به صورت جداگانه در جداول نشان داده شد. نتایج قبل و بعد از PDT نشان دهنده تاثیر قابل توجه آن بر کاهش میزان تولید پیگمان می باشد. شکل ۱-۵ میزان تولید پیگمان سویه ها را قبل و بعد از PDT نشان می دهد.

جدول ۲-۵. میزان تشکیل پیگمان *P. aeruginosa* ATCC27853 قبل و بعد از فتودینامیک

تراپی

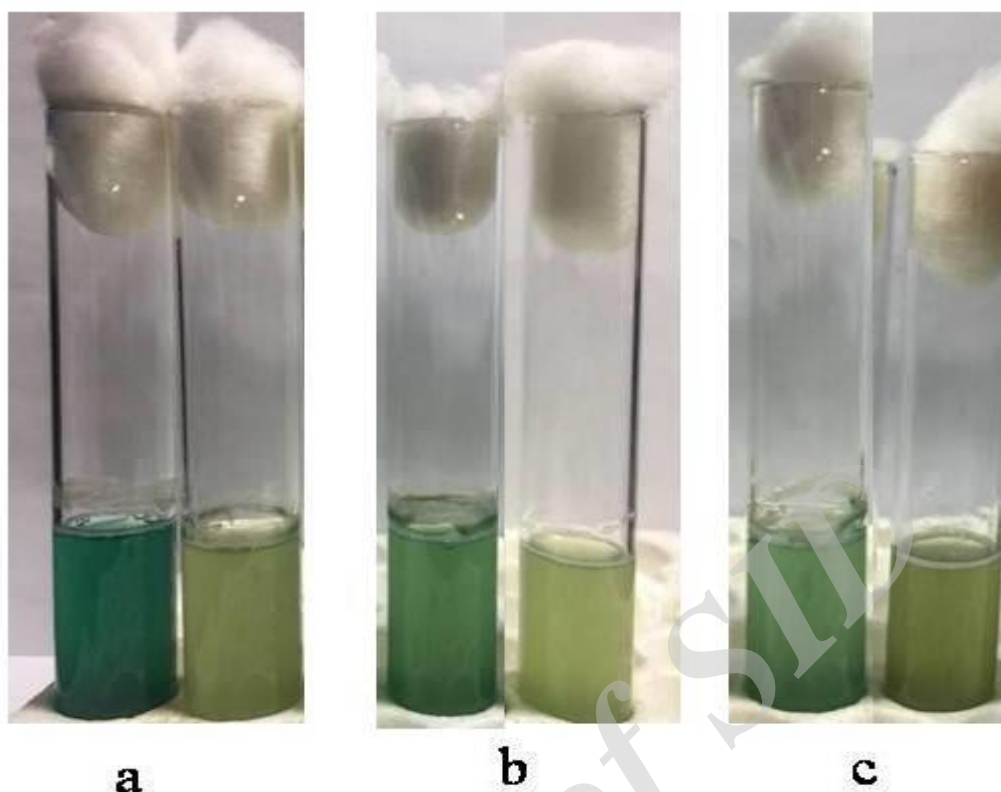
Test	جذب نوری		تولید پیگمان (µg/ml)	
	After PDT	control	After PDT	Control
Sample 1	0.472	0.239	8.055624	4.079013
Sample 2	0.465	0.261	7.936155	4.454487
Sample 3	0.468	0.28	7.987356	4.77876
mean	0.468333	0.26	7.993045	4.43742

جدول ۳-۵. میزان تشکیل پیگمان ایزوله P2 قبل و بعد از فتودینامیک تراپی

Test	جذب نوری		تولید پیگمان (µg/ml)	
	After PDT	control	After PDT	Control
Sample 1	0.354	0.248	6.044904	4.234848
Sample 2	0.309	0.231	5.276484	3.944556
Sample 3	0.397	0.252	6.779172	4.303152
mean	0.353333	0.243667	6.03352	4.160852

جدول ۴-۵. میزان تشکیل پیگمان ایزوله P3 قبل و بعد از فتوداینامیک تراپی

Test	جذب نوری		تولید پیگمان ($\mu\text{g/ml}$)	
	After PDT	control	After PDT	Control
Sample 1	0.196	0.105	3.346896	1.79298
Sample 2	0.211	0.168	3.603036	2.868768
Sample 3	0.145	0.125	2.47602	2.1345
mean	0.184	0.132667	3.141984	2.265416



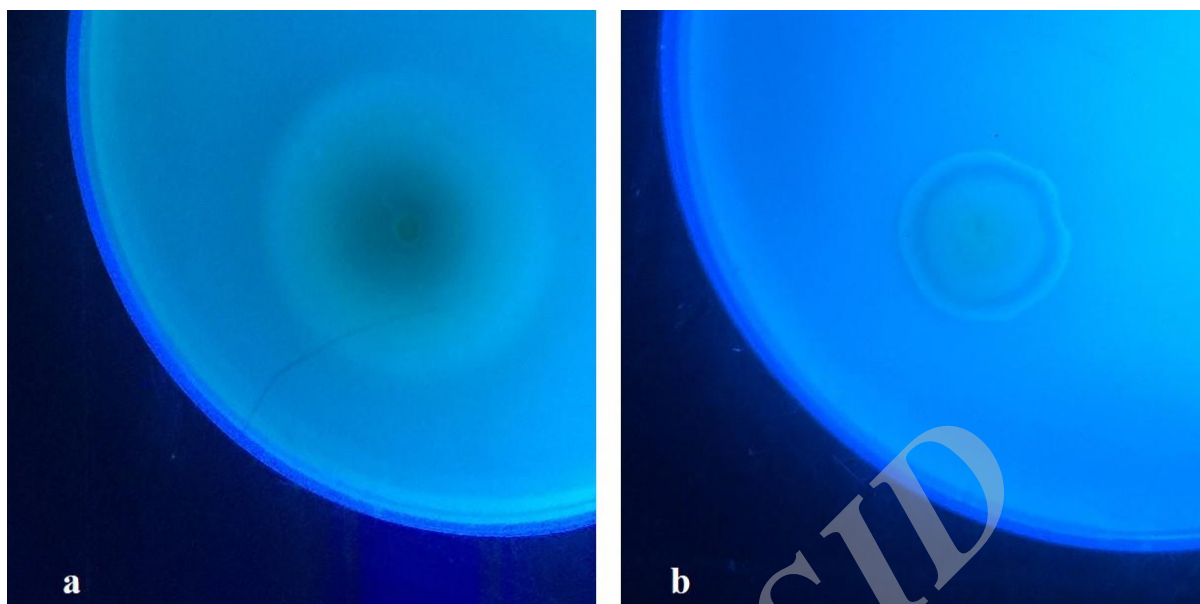
شکل ۵-۱: تشکیل پیگمان سویه ها، لوله سمت راست کنترل بدون تیمار و لوله سمت چپ پس از تیمار

فتودینامیک. (a) سویه ATCC، (b) ایزوله P2 و (c) ایزوله P3

۳-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر تولید رامنولیپید

تست رامنولیپید با اندازه گیری هاله اطراف چاهک و مقایسه بین قبل و بعد از اثر فتودینامیک تراپی بررسی گردید. پس از ۷۲ ساعت باکتری‌هایی که توان تشکیل رامنولیپید را داشته‌اند تولید هاله می‌کنند حال مقایسه نتایج تیمارهای باکتریها بابت از فتودینامیک تراپی با نمونه کنترل همان تیمار موید کاهش میزان تولید رامنولیپید در جدایه‌های تولید کننده می‌باشد.

نتایج در جدول ۵-۵ و شکل ۵-۲ نمایش داده شده است.



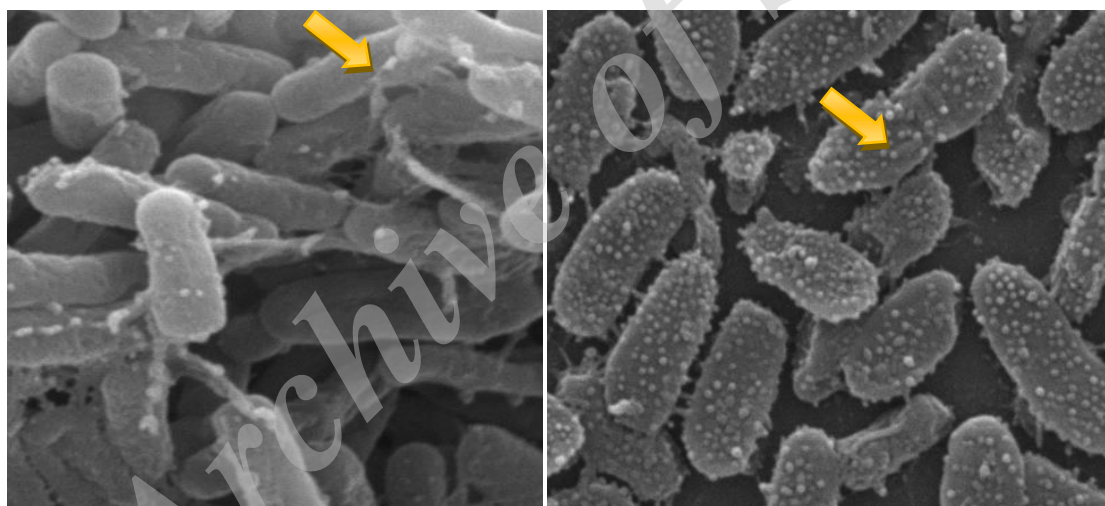
شکل ۵-۲: هاله تولید رامنولیپید. تصویر ایجاد چاهک و رشد و تولید هاله در جدایه ... پرتوتابی نشده سمت چپ (a). تصویر سمت راست پلیت پس کاهش هاله در جدایه ای که پرتو تابی شده.

جدول ۵-۵. مقایسه میزان تولید رامنولیپید در جدایه های مختلف با تیمار PDT و بدون انجام تیمار

هاله تولید رامنولیپید (mm)		
باکتری	فاقد تیمار	تیمار با PDT
ATCC	۱۶	۱۳
P1	۱۹	۱۵
P2	۱۶	۱۲
P3	۱۶	۱۴
P5	فاقد توان تولید	فاقد توان تولید
P6	۱۱	۹
P7	۱۲	۹

۴-۵ نتایج غیر فعال سازی فتودینامیکی بر تشکیل پیلی

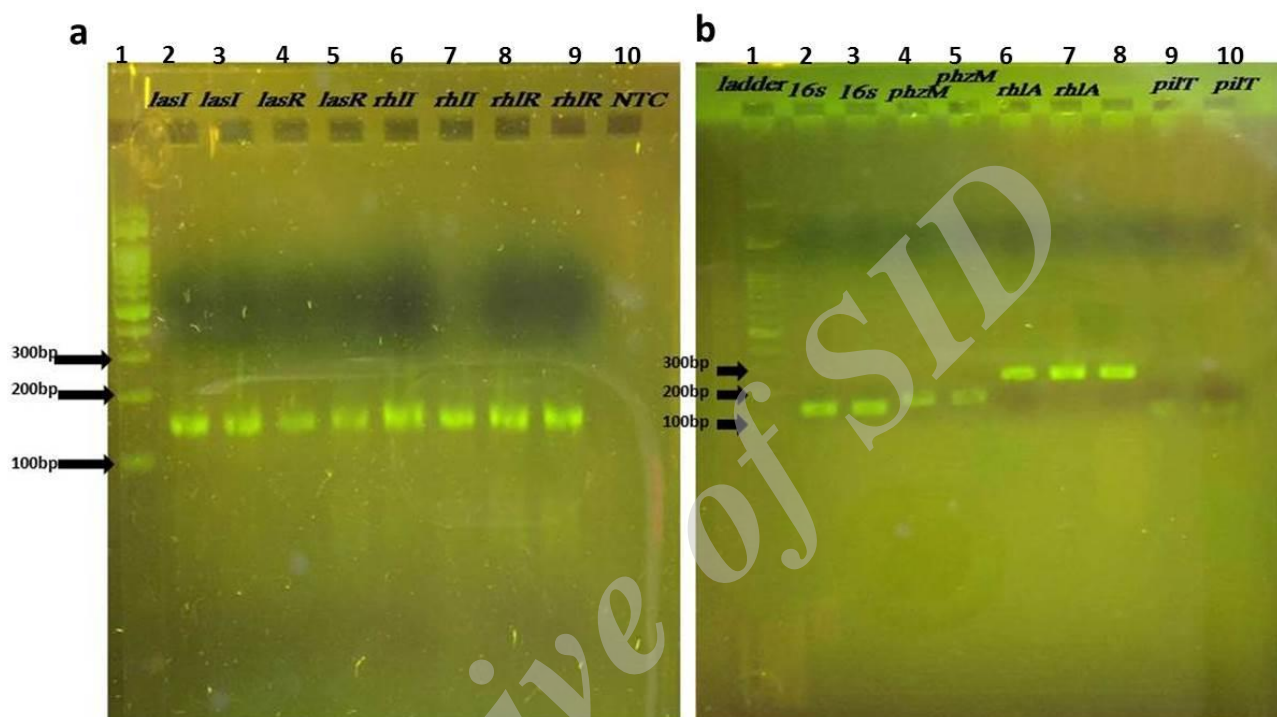
تصاویر میکروسکوپ الکترونی با بزرگ نمایی ۱ میکرون به خوبی نمایانگر وجود یا عدم وجود پیلی قبل و بعد از فتودینامیک می باشد. در شکل ۳-۵ تصویر سمت راست نشان دهنده باکتری کنترل که تولید کننده پیلی است می باشد و تصویر سمت چپ نشان دهنده تاثیر فتودینامیک بر باکتری است که این اثر به صورت کاهش پیلی نمایان شده است. در تصویر پیلی به شکل نقاط سفید کوچک بر سطح باکتری قابل مشاهده است. همانطور که با فلش مشخص شده در نمونه کنترل تعداد زیادی پیلی روی سطح مشاهده می شود اما در نمونه تیمار شده تعداد کاهش قابل توجهی داشته است.



شکل ۳-۵: تصویر سمت راست نمونه کنترل فاقد تیمار فتودینامیک تراپی و تصویر سمت چپ نمونه پس از تیمار فتودینامیک تراپی

۵-۵ نتایج colony PCR و تایید حضور ژنهای مورد مطالعه در جدایه های تحت مطالعه

صحت پرایمرها و حضور ژنهای مورد مطالعه در جدایه های تحت مطالعه با استفاده از تکنیک colony PCR بررسی شد و نتایج آن در شکل ۴-۵ نشان داده شده است.



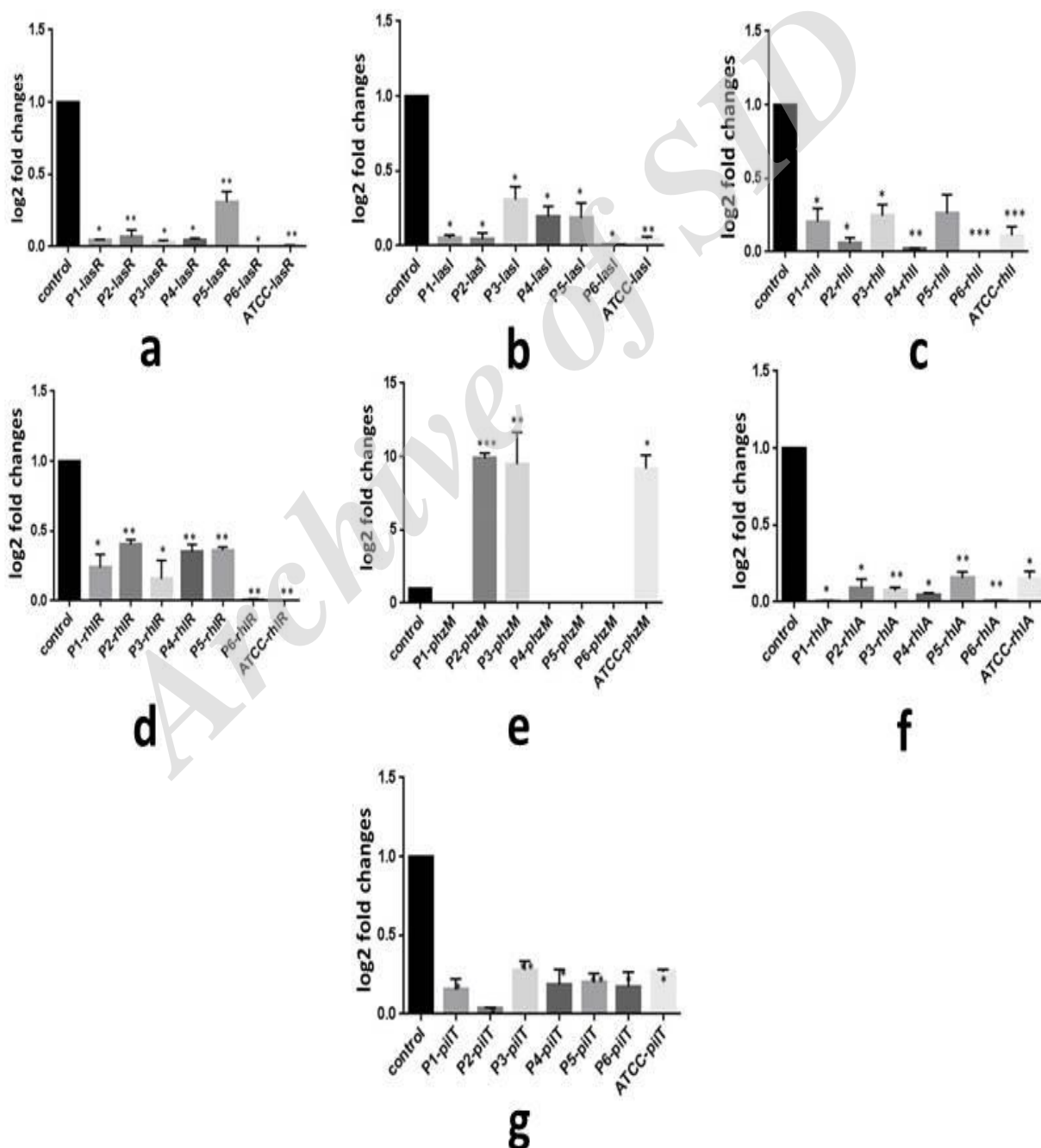
شکل ۴-۵: نتایج الکتروفورز محصولات به دست آمده از colony PCR برای ژنهای مختلف مورد مطالعه.

چاهک های 1a و 1b: سایز مارکر 100bp (شرکت فرمنتاز)، چاهک های 2a و 2b: محصول PCR ژن *lasI*، چاهک های 4a و 5a: محصول PCR ژن *lasR*، چاهک های 6a و 7a: محصول PCR ژن *rhII*، چاهک های 8a و 9a: محصول PCR ژن *rhIR*، چاهک های 10a: محصول PCR ژن *NTC*، چاهک های 2b و 3b: محصول PCR ژن *16srRNA*، چاهک های 4b و 5b: محصول PCR ژن *phzM*، چاهک های 6b-8b: محصول PCR ژن *rhIA*، چاهک های 9b و 10b: محصول PCR ژن *pilT*

۶-۵ نتایج تغییرات بیان ژن های مربوط به سیستم کوئرم سنسینگ و فاکتورهای ویرولانس تحت تاثیر فتودینامیک تراپی با استفاده از تکنیک Real-time PCR

پس از انجام آزمون فتودینامیک تراپی بر ایزوله های باکتریایی مورد آزمون و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، میزان بیان ژن های سیستم های کوئروم سنسینگ (*lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*) و ژن های فاکتور

های ویروالانس (phzM, pilT, rhlA) با استفاده از real-time PCR بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده‌ی تغییرات در سطح بیان ژن های کوئروم سنسینگ و فاکتور های ویروالانس بودند (شکل ۵-۵). در تمامی ژن های سیستم های کوئروم سنسینگ کاهش بیان مشاهده شد. به علاوه در بیان ژن های پیلی و رامنولپید تحت کنترل سیستم های کوئروم سنسینگ هم کاهش قابل توجهی مشاهده شد. تنها در مورد ژن های پیوسیانین افزایش بیان در باکتری *P. aeruginosa* مشاهده شد.





شکل ۵-۵: نمودار تغییرات بیان ژن های کوئروم سنسینگ و فاکتور های ویروانس تحت کنترل سیستم کوئروم سنسینگ. (a) تغییرات بیان ژن lasI در جدایه های مختلف، (b) تغییرات بیان ژن lasR در جدایه های مختلف، (c) تغییرات بیان ژن rhII در جدایه های مختلف، (d) تغییرات بیان ژن rhIR در جدایه های مختلف، (e) تغییرات بیان ژن pilT در جدایه های مختلف، (f) تغییرات بیان ژن rhIA در جدایه های مختلف، (g) تغییرات بیان ژن phzM در جدایه های مختلف.

بحث

استفاده گسترده و نامناسب از آنتی بیوتیک ها به تدریج منجر به توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی فراگیر شد و این مقاومت روز به روز در حال افزایش است. دقیقا سه سال قبل از گرفتن تاییدیه بالینی، اولین مورد از مقاومت به پنی سیلین در سال ۱۹۴۰ منتشر شد. در پی افزایش جهانی مقاومت به آنتی بیوتیک ها، تلاش های گسترده ای برای توسعه راهکارهای درمانی نوین انجام شده است. طی سال های اخیر تنها تعداد کمی آنتی بیوتیک جدید مورد تایید قرار گرفته اند، با این حال این عوامل بسیار گران بوده، دارای عوارض جانبی هستند و دسترسی به آنها محدود می باشد. به زودی ممکن است به عصر قبل از آنتی بیوتیک برگردیم. بنابراین یافتن روش های درمانی جدید که از نظر ایمنی مطلوب تر باشند و به راحتی باکتری ها قادر به توسعه مقاومت علیه آنها نباشند، امری حیاتی به نظر می رسد. این مکانیسم های درمانی جدید باید به گونه ای باشند که بر روی هدف های مختلفی در باکتری تاثیر گذاشته، هزینه بالا نداشته باشند و از نظر ایمنی در سطح قابل قبولی قرار بگیرند (۴۱). تعدادی از این راهکارها به صورت خلاصه ذکر شده است

۱- استفاده از درمان های ترکیبی آنتی بیوتیکی

۲- استفاده از نانو تکنولوژی توسط نانوذرات

۳- استفاده از ترکیبات گیاهی

۴- استفاده از فتودینامیک تراپی

۵- استفاده از فاژ تراپی

فتودینامیک تراپی مزایای قابل توجهی نسبت به روش های مرسوم درمانی از جمله استفاده از آنتی بیوتیک ها دارد از جمله اینکه فعالیت وسیع الطیف آنها علیه انواع مختلف پاتوژن ها (از جمله باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها و تک یاخته ها). در حالی که سایر ترکیبات ضد میکروبی بالاخص آنتی بیوتیک ها تنها علیه یک یا دو نوع پاتوژن موثرند.

فتودینامیک تراپی عملکرد موثر موضعی دارد و در نتیجه عوارض جانبی که در مصرف سیستمیک آنتی بیوتیک - ها مشاهده می شود، در این روش کمتر دیده می شود. در اولین گزارش همبلین و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان

دادند که استفاده از فتودینامیک تراپی بر روی موش‌های غیر آلوده به باکتری، منجر به ضایعات و عوارض جانبی نمی‌شود و به این واسطه صدمه‌ای به بافت میزبان مشاهده نشد (۴۲).

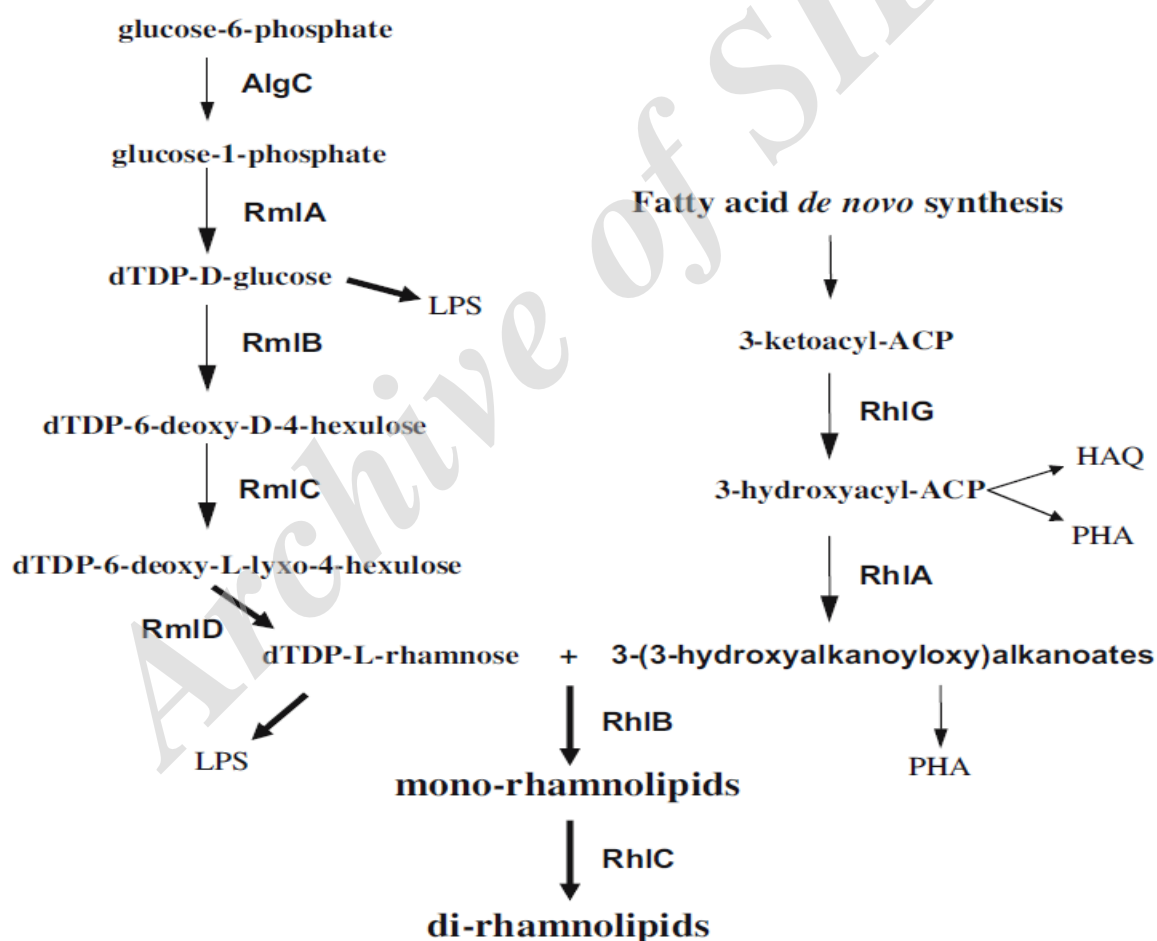
در فتودینامیک تراپی عامل اصلی ضد میکروبی، تولید اکسیژن منفرد است که مکانیسم اثر غیر اختصاصی دارد و بر روی اهداف سلولی متنوعی مانند غشا، آنزیم‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک موثر است و تاکنون در باکتری‌ها مقاومتی به این روش مشاهده نشده است. به نظر می‌رسد که این روش امکان درمان عفونت‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای میکروبی به خصوص سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها را فراهم نموده است. نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌تواند نشان دهنده کارایی فتودینامیک تراپی در مهار تولید فاکتورهای ویروالانس پیگمان پیوسیانین، رامنولیپید و پیلی باشد.

نقش باکتری *P. aeruginosa* در انواع مختلف عفونت‌ها به علت وجود فاکتورهای ویروالانس متعدد و توانایی اتصال و کلونیزاسیون غیر قابل برگشت به سطوح ثابت شده است. Doig و همکاران نشان دادند که پیلی تیپ IV در مراحل اولیه اتصال و کلونیزاسیون باکتری روی سطوح مانند سلول‌های انسانی و ابزار پزشکی ضروری است (۴۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در غلظت زیر حد کشنده یعنی غلظت 0.012 mM متیلن بلو و تابش لیزر با توان 23 J/cm^2 بیش از ۲ فولد تغییر در بیان ژن‌های سیستم‌های کوئروم سنسینگ اتفاق افتاد که در پی آن کاهش بیان ژن‌های پیلی به میزان بیش از ۱,۷ فولد مشاهده شد. این نتایج تایید در راستای نتایج به دست آمده از مطالعه Glessner و همکارانش که نقش سیستم‌های las و rhl در تولید پیلی تیپ IV را اثبات کردند بوده موید این مسئله است که هر دو این سیستم‌ها در تولید و کنترل پیلی تیپ IV دخیل هستند. به علاوه آن‌ها سیستم rhl را برای اتصال پیلی تیپ IV به سلول‌های اپی تلیال برونش انسان معرفی کردند (۴۴).

کنترل تولید رامنولیپید (RL) پیچیده است زیرا با بسیاری از فاکتورهای ژنتیکی و محیطی/تغذیه‌ای تحت تاثیر قرار می‌گیرد. همانند متابولیت‌های ثانویه، بیوسنتز آن در انتهای فاز لگاریتمی یا ابتدای فاز سکون شکل می‌گیرد. دو فاکتور در این امر نقش دارند: تنظیم وابسته به دانسیته سلولی و محدودیت مواد غذایی خاص.

در اواسط ۱۹۹۰، Urs Ochsner و همکارانش با استفاده از استراتژی موتاژنیز *random transposon* و *genetic complementation*، ژن های بیوسنتتیک و تنظیمی اولیه را شناسایی کردند که در کلاستر ژنی *rhl* قرار داشت و مسئول سنتز *RL* ها بود. شکل ۶-۱ نمایش مراحل تولید *RL* را به اختصار نشان می دهد. *RhlA* و *RhlB* توسط ژن هایی که در یک اپران قرار داشتند کد می شدند و در کنار ژن های *rhlI* و *rhlR* قرار داشتند. آنچه که یافته اصلی آنها بود این بود که بیان *rhlAB* بطور مثبت با الگوی وابسته به دانسیته سلولی یعنی سیستم *QS* کنترل می شد.

Rhamnolipids Biosynthetic Pathway



شکل ۶-۱: مسیر بیوسنتز رامنولپید



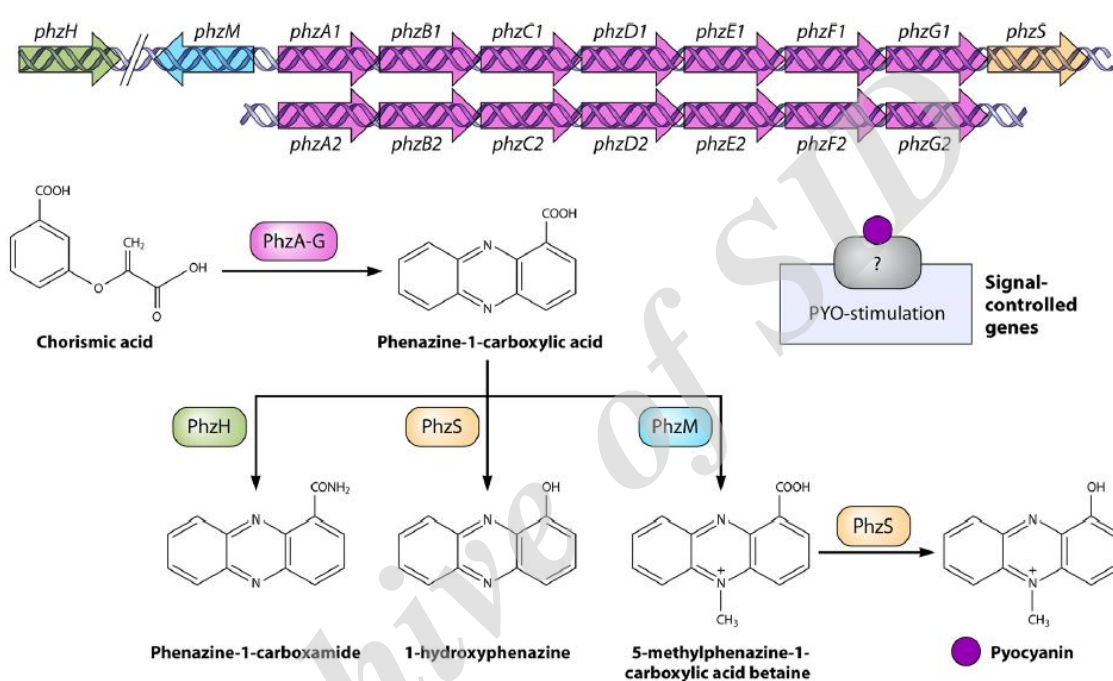
در مورد بیوسنتز RL محصول *RhlI* یعنی C4-HSL باعث فعال کردن *RhlR* می‌شود. کمپلکس *RhlR/C4-HSL* به توالی ویژه‌ای در ناحیه تنظیمی *rhlAB* متصل شده و رونویسی را فعال می‌کند. نکته جالب این است که *RhlR* زمانی که به لیگاند خود متصل نیست به عنوان رپرسور رونویسی عمل می‌کند. میزان بیان *rhlAB* هم بستگی به غلظت محیطی این سیگنال دارد. بیان رامنوزیل ترانسفراز ثانویه که توسط *rhlC* کد می‌شود هم به‌طور هم‌زمان با *rhlAB* از مسیر تنظیمی QS مشابه تنظیم می‌گردد (۴۵).

رامنولیپید نیز مانند پیلی تیپ IV در اتصال باکتری به سطوح نقش دارد. به‌علاوه در پیشبرد اتصال باکتری و تولید ساختارهای قارچی شکل برای گردهم آوری باکتری‌ها ضروری می‌باشد. هر دو این فاکتورهای ویروالانس، پیلی تیپ IV و رامنولیپید، تحت کنترل سیستم‌های کوئروم سنسینگ هستند بنابراین اگر عاملی بیان ژن‌های کوئروم سنسینگ را تغییر دهد می‌تواند بطور غیر مستقیم روی بیان ژن‌های این فاکتورهای ویروالانس اثر بگذارد. این عامل می‌تواند غیر فعال سازی فتودینامیکی بویژه در غلظت‌های زیر حد کشنده باشد. نتیجه این کاهش بیان ژنی، مسدود کردن اتصال و کلونیزاسیون باکتری و در نهایت کاهش توان باکتری برای ایجاد بیماری می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن رامنولیپید در نمونه‌هایی که تحت تیمار زیر حد کشنده غیرفعال‌سازی فتودینامیکی قرار گرفتند در مقایسه با نمونه‌های فاقد تیمار بیش از ۲٫۵ فولد کاهش داشته است. از آنجایی که رامنولیپید فاکتور اساسی در کلونیزاسیون و تشکیل میکروکلنی در باکتری‌ها می‌باشد به نظر می‌رسد که غیر فعال‌سازی فتودینامیکی در غلظت‌های زیر حد کشنده از وقوع این اتفاق پیشگیری می‌کند. کاهش بیان ژن رامنولیپید با کاهش تولید این فاکتور در آزمون‌های فنوتیپی تایید شد. به این ترتیب که هاله تولید رامنولیپید در نمونه تحت تیمار قطر کمتری نسبت به نمونه فاقد تیمار داشت. آزمون فنوتیپی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه و سپس ۳۰ دقیقه انکوباسیون در یخچال خوانده شد و می‌تواند نشان دهنده اثر ماندگار غیرفعال‌سازی فتودینامیکی بر بیان ژن در باکتری باشد. این اثر ماندگار طی نسل‌های متعدد در باکتری حفظ می‌شود. به نظر می‌رسد در مجموع نتایج می‌تواند یک ارتباط مستقیم بین سیستم‌های تنظیمی کوئروم سنسینگ و تولید فاکتورهای ویروالانس بویژه پیلی تیپ IV و رامنولیپید را نشان دهند. از آنجایی که غیرفعال‌سازی دینامیکی برای درمان عفونت‌های موضعی به کار می‌رود نتایج این پژوهش می‌تواند نویدبخش مزایای استفاده از این تکنیک برای

بازداری از عفونت‌های باکتریایی وابسته به سطوح از جمله عفونت‌های زخم مزمن و عفونت‌های ناشی از سوختگی باشد. همچنین میکروگراف‌های بدست آمده از SEM می‌تواند گواه این ادعا باشند که غیر فعال سازی فتودینامیکی در غلظت‌های زیر حد کشنده قادر بوده اتصال باکتری‌ها به سطح و کلونیزاسیون آنها را در مقایسه با کنترل فاقد تیمار به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد؛ به گونه‌ای که باکتری‌های تحت تیمار اتصال بسیار پراکنده و منفرد داشته که نشان از کاهش تعداد پیلی در آنها می‌باشد. به علاوه اجتماعات باکتریایی فاقد ساختارهای مشخص میکروکلنی می‌باشد که خود گواهی بر کاهش توان باکتری در تولید رامنولپید است.

از سوی دیگر پیوسیانین اولین و معروف‌ترین عضو خانواده فنازین‌ها می‌باشد که تنها توسط *P. aeruginosa* تولید می‌شوند. فنازین‌ها مولکول‌های پیگمنته، هتروسیکلیک، دارای نیتروژن و دارای فعالیت احیایی هستند که توسط تعداد قابل توجهی از باکتری‌ها از جمله گونه‌های *Pseudomonas* ترشح می‌شوند. فنازین‌ها طیف وسیعی از فعالیت‌های سمی را نسبت به ارگانیزم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی نشان می‌دهند که با توجه به جهت قرارگیری حلقه هتروسیکل در آنها متعدد می‌باشند. این سمیت مزیت رقابت حذفی و افزایش توان بقا در محیط‌های پر جمعیت را به باکتری تولید کننده آن اعطا می‌کند. این اختصاصیت موجب تشخیص سریع این پاتوژن فرصت طلب می‌گردد. این فنازین آبی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ویروانس این پاتوژن هم در عفونت‌های حاد و هم در عفونت‌های مزمن می‌باشد که قادر به مهار کردن تکثیر لنفوسیت‌ها، تخریب سلول‌های اپیتلیال با تولید رادیکال‌های هیدروکسیل، غیرفعال کردن بازدارنده‌های پروتئاز (و بنابراین ادامه تخریب بافت ناشی از این آنزیم) و در نهایت اهداف متعدد درون سلولی می‌باشد. در کنار این عملکرد به عنوان فاکتور ویروانس و تسهیل کننده انتقال الکترون عمل کرده و پیوسیانین به‌عنوان یک مولکول سیگنال دهنده در *P. aeruginosa* عمل می‌کند. در طول فاز سکون، مجموعه‌ای از ژن‌ها را کنترل کرده که به تحریک PYO منجر می‌شود. این ژن‌ها شامل ژن‌های مربوط به افلاکس و ردوکس و ژن‌های کسب آهن می‌باشند (۴۶).

شکل ۶-۲ نشان دهنده اپرون تولید کننده پیوسیانین می باشد. این اپران تحت کنترل سیستم کوئروم سنسینگ *rhl* قرار دارد. در این مطالعه ژن *phzM* مورد بررسی قرار گرفت که تولید کننده یکی از آنزیم‌های اصلی در تبدیل فنازین به پیوسیانین می باشد.



شکل ۶-۲: مسیر بیوسنتز پیگمان پیوسیانین

اگرچه علی‌رغم ویژگی‌های امیدوار کننده غیر فعال‌سازی فتودینامیکی برای بازاری از اتصال باکتری به سطوح، در طول این پژوهش ما با چالشی مواجه شدیم که نشان دهنده امکان ایجاد مقاومت در باکتری *P. aeruginosa* پس از یکبار قرار گرفتن در معرض غلظت زیر حد کشنده غیر فعال‌سازی فتودینامیکی بود. باکتری‌ها از طرق مختلف قادر به ایجاد مقاومت به غیر فعال‌سازی فتودینامیکی هستند یکی از مهم‌ترین این روش‌ها، افزایش تولید پیگمان به منظور مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از غیر فعال‌سازی فتودینامیکی و ROS تولید شده می‌باشد. تولید پیگمان در *P. aeruginosa* نتیجه تولید انواعی از پیگمان‌ها می‌باشد اما پیگمان پیوسیانین مهم‌ترین پیگمان برای غلبه بر استرس ROS در این باکتری است (۴۷).

نتایج Real-time PCR نشان داد که برخلاف کاهش بیان در سیستم تنظیمی کوئروم سنسینگ *rhl*، بیان ژن *phzM* به طرز قابل توجهی افزایش یافت. این ژن یکی از ژن‌های اپران کد کننده پیوسیانین می‌باشد که افزایش بیان آن نشان از افزایش بیان کل اپران دارد. نکته قابل توجه در این افزایش بیان این است که پیوسیانین علاوه بر سیستم *rhl* تحت کنترل سیستم کوئروم سنسینگ *pqs* هم می‌باشد. کاهش بیان ژن‌های سیستم *Rhl* و افزایش غیر منتظره در بیان ژن *phzM* این احتمال را تقویت می‌کند که سیستم کوئروم سنسینگ سوم در باکتری *P. aeruginosa* یعنی *pqs* می‌تواند حلقه گم شده این زنجیره باشد. البته این موضوع بعنوان یک پیشنهاد می‌تواند در پژوهش‌های آتی مورد آزمایش قرار بگیرد. دلیل دیگری بر افزایش بیان در ژن پیوسیانین در کاهش بیان سیستم کوئروم سنسینگ *Las* نهفته است، اینست که در حالت عادی *lasR* به پروموتور بازدارنده تنظیمی *lasI* یعنی *RsaL* متصل می‌شود این اتصال باعث بازداری از بیان ژن‌های پیگمان پیوسیانین و در نهایت تولید آن می‌گردد (۴۷). در اثر غیر فعال‌سازی فتودینامیکی در غلظت زیر حد کشنده بیان *las* کاهش یافت که نتیجه آن کاهش *RsaL* می‌باشد. پیامد همه این‌ها می‌تواند توجیه کننده افزایش بیان و تولید پیگمان پیوسیانین باشد.

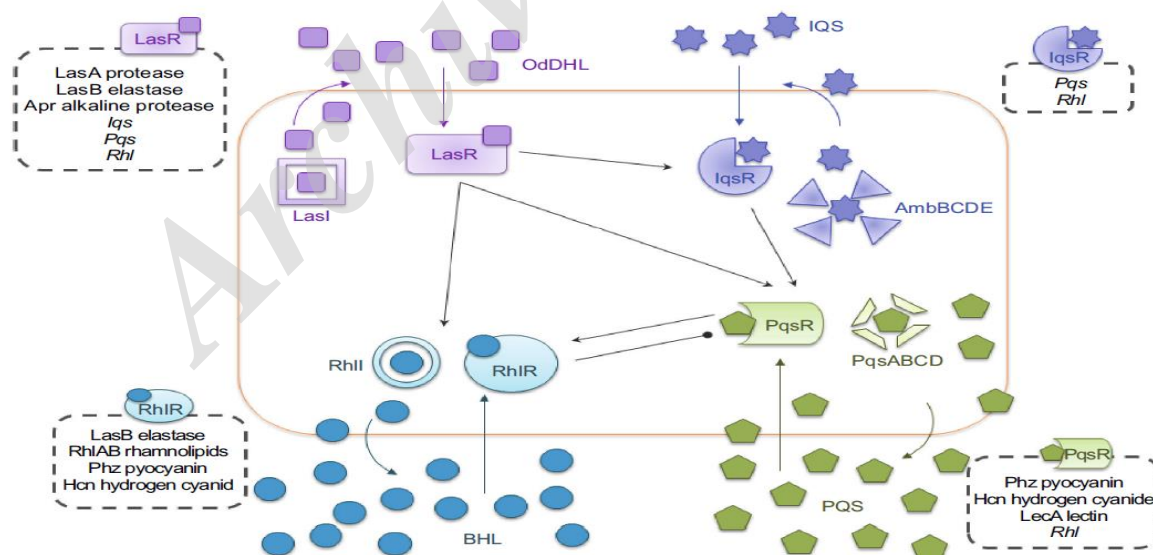


Figure 3. Schematic representation of the four QS signaling networks in *P. aeruginosa* and their respective regulons. Arrows indicate a stimulatory effect. Perpendicular lines indicate an inhibitory effect.

شکل ۳-۶ ارتباط بین سیستم های کوئروم سنسینگ و تولید فاکتور های ویروالانس در *P. aeruginosa*

همانطور که در شکل ۶-۳ مشخص می باشد سیستم las حلقه ابتدایی سیستم های کوئروم سنسینگ در *P. aeruginosa* می باشد که مسئول فعال کردن سیستم کوئروم سنسینگ دوم یعنی rhl است. تنظیم تولید پیگمان پیوسیانین تحت کنترل سیستم rhl می باشد. نتایج بدست آمده از Real-time PCR به وضوح نشان دهنده کاهش در بیان ژن های *lasI* و *lasR* است که به دنبال آن کاهش در بیان *rhlI* و *rhlR* مشاهده می شود. در نتیجه بیان ژن های تحت کنترل نیز کاهش یافته است. نتایج آزمون های فنوتیپی و ژنوتیپی این پژوهش در راستای هم و نشان دهنده کارایی فتودینامیک تراپی بر تنظیم تولید فاکتورهای بیماری زایی و در نتیجه کنترل ویروانس این باکتری از طریق کاهش توان در اتصال به سطوح می باشند.

بررسی مطالعات صورت گرفته در مورد اثر فتودینامیک تراپی بر بیان فاکتور های ویروانس باکتری *P. aeruginosa* نشان می دهد که تاکنون هیچ پژوهشی در این زمینه با استفاده از رنگ متیلن بلو و نور لیزر همزمان صورت نگرفته است.

در سال ۲۰۰۰ Komerik و همکاران در مطالعه ای به بررسی اثر فتودینامیک تراپی با استفاده از نور لیزر و رنگ تولوئیدین بلو بر فاکتور های ویروانس باکتری *P. aeruginosa* پرداختند و گزارش کردند که فعالیت LPS و پروتئاز های این باکتری پس از فتودینامیک تراپی به شدت کاهش یافت (۴۸).

Sharma و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر فتودینامیک تراپی را با رنگ تولوئیدین بلو بر بیان فاکتور های ویروانس ترشحی *P. aeruginosa* یعنی فسفولیپاز C و پروتئاز ها را بررسی کرده و متوجه شدند پس از فتودینامیک تراپی فعالیت این آنزیم ها کاهش یافت و گزارش کردند که فتودینامیک تراپی در درمان عفونت های این باکتری کارآمد می باشد (۴۹).

Viviana T. Orlandi و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر رنگ های تولوئیدین بلو و TMPyP را همراه با نور لیزر بر پیگمان های *P. aeruginosa* مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که پس از تولید پیگمان توسط این باکتری، کارایی فتودینامیک تراپی قویا کاهش می یابد. این امر نه تنها به حفظ ویروانس خود باکتری کمک می کند، بلکه باعث حفظ سایر باکتری های موجود در محیط عفونت می شود زیرا پیگمان های این باکتری به محیط

اطراف ریخته شده و در نقش عامل حفاظتی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از فتودینامیک تراپی عمل می کند (۵۰).

در این مطالعه اثر فتودینامیک تراپی با استفاده از نور لیزر کم توان و رنگ متیلن بلو بر تولید فاکتورهای ویروالانس *P. aeruginosa* مطالعه شد و به نظر می رسد نتایج بدست آمده نشان دهنده کاهش بیان ژن های فاکتورهای ویروالانس به خصوص فاکتورهایی که در آغاز اتصال و کلونیزاسیون باکتری در موضع نقش دارند شده و باعث کاهش بیان ژن های سیستم های کوئروم سنسینگ که در عفونت زایی این باکتری نقش موثر دارد شده است. بنابراین علی رغم افزایش میزان پیگمنتسیون برخی جدایه ها، با توجه به مهار بیان ژنهایی مانند پیلی و رامنولپید که در اتصال و کلونیزاسیون غیر قابل برگشت این باکتری نقش دارند، می توان چنین پیشنهاد کرد که فتودینامیک تراپی در کنار سایر درمان ها به عنوان راهکار کمکی و مبتنی بر خاصیت آنتی-کوئروم سنسینگ باشد. همچنین با توجه به اثر فتو دینامیک تراپی در کاهش قابل توجه تعداد باکتری ها و اثر آن در کاهش اثر تولید فاکتورهای ویروالانس اتصالی به نظر می رسد می تواند بعد از انجام مطالعات تکمیلی به عنوان تکنیکی مفید در کاهش بار میکروب های پاتوژن در زخم های سطحی مورد استفاده قرار گیرد.

پیشنهادات

- در ادامه این مطالعه بررسی ارتباط بین افزایش بیان پیگمان هایی همچون پیوسیانین و سیستم کوئروم سنسینگ pqs پیشنهاد می گردد.
- بررسی و مقایسه اثر فتودینامیک تراپی بر روی بار میکروب های پاتوژن در نمونه های حیوان مدل و نهایتاً در بیماران دارای زخم های مزمن و زخم های ناشی از سوختگی پیشنهاد می گردد.
- بررسی و مقایسه تاثیر استفاده از غیرفعال سازی فتودینامیکی قبل از به کارگیری کاتترها و سوندها بر روی همین ابزارها و هم موضع به کارگیری آنها و تاثیر آن در کاهش عفونت های بیمارستانی نیز می تواند از پیشنهادات این مطالعه باشد.



منابع

۱. Church D, Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. Burn Wound Infections. Clin Microbiol Rev. 2006;19:403-34.
۲. Okhiria O, A. The role of biofilm in wounds. 2010.
۳. Japoni A, Farshad, S., Alborzi, A. Pseudomonas aeruginosa: Burn Infection ,Treatment and Antibacterial Resistance. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2009;11(3):244-53.
۴. Yang L, Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., Molin, S. Distinct roles of extracellular polymeric substances in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Environ Microbiol 2011;13:1705-07.
۵. Hidron A, I., Edwards, J, R., Patel, J., Horan, T, C., Sievert, D, M., Pollock, D, A., Fridkin, S, K. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infection Control & Hospital Epidemiology 2008;29(11):996-1011.
۶. Chitkara Y, K., Feierabend, T, C. Endogenous and exogenous infection with Pseudomonas aeruginosa in a burns unit. international surgery. 1981;66(3):237-40.
۷. Phillips L, G., Heggers, J, P., Robson, M, C., Boertman, J, A., Meltzer, T., Smith, D, J, Jr. The effect of endogenous skin bacteria on burn wound infection. Annals of plastic surgery. 1989;23(1):35-8.
۸. Naqvi Z, A., Hashmi, K., Kharal, S, A . Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) in burn patients. Pakistan Journal of Pharmacology. 2007;24:7-11.
۹. Rahme L, G., Stevens, E,J., Wolfort, S, F., Shao, J., Tompkins, R, G., Ausubel, F, M. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. science. 1995;268(5219):1899-902.
۱۰. Kipnis E, Sawa, T., Wiener-Kronish, J. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Médecine et Maladies Infectieuses. 2006;36:78-91.
۱۱. Sato H, Okinaga, K., Saito, H. . Role of pili in the pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa burn infection. journal of microbiology and immunology. 1988;63(4):131-9.
۱۲. Bianchi S, M., Prince, L, R., McPhillips, K., et al. . Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of Pseudomonas aeruginosa. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2008;177(1):35-43.
۱۳. Fujita K, Akino, T., Yoshioka, H. Characteristics of the heatstable extracellular hemolysin from Pseudomonas aeruginosa. Journal of infections and immunology. 1988;56:1385-7.
۱۴. Heeb S, Fletcher, M, P., Chhabra, S, R., Diggle, S, P., Williams, P., Camara, M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. FEMS Microbiology Reviews. 2011;35(2):247-74.
۱۵. Epps L, C., Walker, P, D. Fluoroquinolone consumption and emerging resistance. US Pharmacology. 2006;10:47-54.
۱۶. Guarner F, Malagelada, J.-R. Gut flora in health and disease. The Lancet. 2۰۰۳;۳۶۱(۹۳۵۶):۱۲-۱۹.
۱۷. Høiby N, Ciofu, O., Bjarnsholt, T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiology. 2010;5(11):1663-74.
۱۸. Cegelski L, Marshall, G, R., Eldridge, G, R., Hultgren, S, J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nature Reviews Microbiology. 2008;6(1):17-27.
۱۹. Sharma G, Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., Gabrani, R. Pseudomonas aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets. Biologicals. 2014;42(1):1-7.
۲۰. Babilas P, Szeimies ,R, M. The use of photodynamic therapy in dermatology. Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia. 2010;145(5):613-30.

- ۲۱ Valko M, Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M, T., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006;39(1):44-9.
- ۲۲ Dai T, Huang, Y-Y., Hamblin M, R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2009. ۸۸-۱۷۰:(۳-۶);
- ۲۳ Jori G, Fabris, C, Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., Roncucci, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2006;38(5):468-81.
- ۲۴ Schäfer M, Schmitz, C., Horneck, G. High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen. *International Journal of Radiation Biology*. 1998;74(2):249-53.
- ۲۵ Hamblin M, R., O'Donnell, D, A., Murthy, N., Contag, C, H., Hasan, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2002;75:51-7.
- ۲۶ Hamblin M, R., Zahra, T., Contag, C, H., McManus, A, T., Hasan, T. . Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *Journal of Infectious Diseases*. 2003;187:1717-25.
- ۲۷ Garcez A, S., Nuñez, S, C., Hamblin, M, R., Suzuki, H., Ribeiro, M, S. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *Journal of Endodontics*. 2010;36(9):1463-6.
- ۲۸ Garcez A, S., Nuñez, S, C., Azambuja, Jr, N., Fregnani, E, R., Rodriguez, H, M.H., Hamblin, M, R., Suzuki, H., Ribeiro, M, S. Effects of Photodynamic Therapy on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Biofilms by Bioluminescence Imaging and Scanning Electron Microscopic Analysis. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2013;31(11):519-25.
- ۲۹ Kashef N, Borghei, Y, S., Djavid, G, E. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(2):150-5.
- ۳۰ Kashef N, Akbarizare, M., Kamrava, S, K. Effect of sub-lethal photodynamic inactivation on the antibiotic susceptibility and biofilm formation of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(4):368-73.
- ۳۱ Lei X, Liu, B., Huang, Z., Wu, J. A clinical study of photodynamic therapy for chronic skin ulcers in lower limbs infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Dermatological Research*. 2015;307(1):49-55.
- ۳۲ Geske G, D., Wezeman, R, J., Siegel, A, P., Blackwell H, E. Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(37):12762-3.
- ۳۳ Smith K, M., Bu, Y., Suga, H. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chemistry and Biology*. 2003;10. ۷۱-۵۶۳:(۶)
- ۳۴ Ishida T, Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H., Kato, J. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-acyl cyclopentylamides. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(10):3183-8.
- ۳۵ Skindersoe W, E., Alhede, M., Phipps, R., et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(10):3648-63.
- ۳۶ Tateda K, Comte, R., Pechere, J-C., K'ohler, T., Yamaguchi, K., van Delden, C. Azithromycin inhibits quorumsensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(6):1930-3.
- ۳۷ Ichimiya T, Takeoka, K., Hiramatsu, K., Hirai, K., Yamasaki, T., Nasu, M. The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Chemotherapy*. 1996;42(3):186-91.
- ۳۸ Rasmussen T, B., M. E. Skindersoe, M, E., Bjarnsholt, T., et al. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*. 2005;151(5):1325-40.

- ۳۹ Zahra Ahmadbeigi AS, Ahya Abdi-Ali. The effect of Cyclamen coum extract on pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa*. *int j phytomed*. 2014;6(2):177-81.
- ۴۰ Hendiani s A-A, A., Mohammadi, P., Kharrazi, sh. Synthesis of silver nanoparticles and its synergistic effects in combination with imipenem and two biocides against biofilm producing *Acinetobacter baumannii*. *Nanomed J* 2015;2(3):291-8.
- ۴۱ Tubby S. The effect of light-activated antimicrobial agents on bacterial virulence factors and key modulators of inflammation. London: UCL (University College London); 2011.
- ۴۲ Gad F, Zahra, T., Francis, K, P., Hasan, T., Hamblin, M, R. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 2004;3:451-8.
- ۴۳ Doig P T, T ,Sastry, P, A., Lee, K, K., Hodges, R, S., Paranchych, W., Irvin, R, T. Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. *Infect Immun*. 1988;56(6):1641-6.
- ۴۴ Glessner A S, R, S., Iglewski, B, H., Robinson J, B. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Twitching Motility. *J Bacteriol*. 1999;181(5):1623-29.
- ۴۵ Abdel-Mawgoud A, M., Hausmann, R., Le'pine, F., M'uller, M, M., De'ziel, E. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. *Biosurfactants*. 2010:13-55.
- ۴۶ Lau G, W., Hassett, D, J., Ran, H., Kong, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*. 2004;10(12):599-606.
- ۴۷ Lee J Z, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *protein cell*. 2015;6(1):26-41.
- ۴۸ Kömerik N, Wilson, M., Poole, S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol*. 2000;72(5):676-80.
- ۴۹ Sharma M, Bansal, H., Gupta, P, K. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. *Curr Microbiol*. 2005;50(5):277-80.
- ۵۰ Orlandi V, T., 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.

Abstract:

Photodynamic Therapy (PDT) has been considered as an attractive, new and promising technique for years. Despite all its advantages, like all other treatment methods have disadvantages as well. The most important problem with photodynamic therapy is the possibility of microorganism's growth in the deeper layers of the wounds in sub-lethal PDT doses (sPDT). The oxidative stress caused by sPDT can affect the physiology and expression of genes in bacteria. This study was conducted to evaluate the effects of PDT using methylene blue (MB) and red light on the expression of quorum sensing genes (QS) and virulence factors controlled by quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853 and six clinical isolates.

Initially, to obtain the lethal concentrations, the effect of PDT on *P. aeruginosa* ATCC 27853 was investigated by counting the number of bacteria on the plate. Gene expression variations of Las and Rhl quorum sensing systems and virulence factors (Rhamnolipid, Pyocyanin, and Pili) were evaluated using quantitative real-time PCR for standard strain and six clinical isolates. Hence, first the bacteria were treated with sPDT, and then total RNA was extracted from both treated and untreated samples. Then, cDNA was synthesized and the gene expression changes were evaluated with appropriate primers. Also, phenotypic tests were performed to assess of the production of Pyocyanin and Rhamnolipid pigment in treated and untreated samples. Finally, the images of the electron microscope were recorded from the two groups of samples, to determine the formation of pili on the surface of bacteria.

The results of bacteria counting indicates the potential of PDT to eliminate all bacteria in the range of approved concentrations of the Food and Drug Administration. Sub-lethal concentrations were considered as sPDT. Quantitative real-time PCR results showed significant decreases in the expression of both las and rhl quorum sensing systems genes in all strains in sPDT. Reducing the expression of quorum sensing systems decreases the bacterial communication with their environment and the bacteria around it. The expression of rhamnolipid and pili genes had a reduction as expected. Also, phenotypic tests for rhamnolipid showed a decrease in treated samples compared to non-treated samples. Electron microscopy images also showed a decrease in the number of piles on the surface of the bacteria and reduction of the bacterial adherent potential on the surface. Only two clinical strain and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were able to produce Pyocyanin pigment from the isolates. However, expression of the Pyocyanin pigment in these bacteria increased and were in line with their phenotypic results.

Photodynamic therapy in lethal concentrations can eliminate all bacteria and at sub-lethal concentrations can inhibit quorum sensing systems. Therefore, this mechanism can reduce both the number of bacteria and the production of virulence factors.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy, *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum Sensing, Pyocyanin, Rhamnolipid, Pili



medical laser research center, ACECR.

final report(title):

Evaluation of the effect of antimicrobial photodynamic therapy on gene expression of quorum sensing-controlled virulence factors of Pseudomonas aeruginosa

Code: 3008

Research group:

deprtment of photo healing and regeneration

Principal Investigator (BY):

majid pornour- nasim kashef

Date:

septamber 2018