Investigation of photodynamic and rhamnolipid inhibition on the dermatophyte biofilm

Razieh Askari[1], Fatemeh Zaboli[1*], Hamidreza Pordeli[2], Hami Kaboosi[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

Corresponding author e-mail: microbiol_sci@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: The lack of success in treating diseases related to dermatophytes is often due to the formation of biofilm, which makes dermatophytes resistant to antifungals. Therefore, it seems that finding therapeutic solutions to inhibit biofilm formation can help in the treatment of dermatophytosis. Based on this, in the present research, an attempt was made to evaluate the inhibition of dermatophyte biofilm production using photodynamic therapy and rhamnolipid biosurfactant. The aim of this research was to investigate the simultaneous effect of photodynamic and rhamnolipid on biofilm inhibition in dermatophytes.

Materials and Methods: In this study, five dermatophyte species including three isolates of *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton verrucosum* and two isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* were evaluated. Biofilms were treated with rhamnolipid and visible light irradiation, and their effects on reducing light absorption and biofilm formation were measured.

Results: The results showed that the combination of these two methods has a significant effect in inhibiting the growth and formation of biofilm in dermatophytes. Especially, a significant decrease in average light absorption and biofilm formation was observed in Trichophyton species.

Conclusion: These findings indicate the high potential of using combined methods in treating fungal infections and managing biofilms. The current research can be used as a basis for future studies in the field of new treatments for fungal infections.

Keywords: Dermatophyte, Surfactant, Rhamnolipid, Photodynamics, Biofilm

Received: Sep 24, 2024 **Revised:** Nov 12, 2024 **Accepted:** Nov 13, 2024

How to cite this article: Askari R, Zaboli F, Pordeli H, Kaboosi H. Investigation of photodynamic and rhamnolipid inhibition on the dermatophyte biofilm. Daneshvar Medicine 2024; 32(4):1-10. doi: 10. 10.22070/DANESHMED.2024.19639.1548

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی اثر همزمان مهار فتودینامیکی و رامنولیپیدی بر تشکیل بیوفیلم در درماتوفیت‌ها

راضیه عسکری[۱]، فاطمه زابلی[۱*]، حمیدرضا پردلی[۲]، حامی کابوسی[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

*نویسنده مسئول: فاطمه زابلی **Email: microbiol_sci@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: عدم موفقیت در درمان بیماری‌های مرتبط با درماتوفیت‌ها اغلب به دلیل تشکیل بیوفیلم است که باعث می‌شود درماتوفیت‌ها در برابر ضد قارچ‌ها مقاوم باشند. بنابراین به نظر می‌رسد که یافتن راهکارهای درمانی جهت مهار تشکیل بیوفیلم، می‌تواند به درمان درماتوفیتوز کمک کند. بر همین اساس در تحقیق حاضر تلاش شد تا مهار تولید بیوفیلم درماتوفیت‌ها با استفاده از درمان فتودینامیکی و همچنین بیوسورفکتانت رامنولیپید مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از این تحقیق بررسی اثر همزمان فتودینامیکی و رامنولیپیدی بر مهار بیوفیلم در درماتوفیت‌ها بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، پنج گونه درماتوفیت شامل سه ایزوله *تریکوفیتون منتاگروفایتس*[۱]، *تریکوفیتون روبروم*[۱] و *تریکوفیتون وروکوزوم*[۱] و دو ایزوله *میکروسپوروم کنیس*[۱] و *میکروسپوروم جیپسئوم*[۱] مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیوفیلم‌ها تحت درمان با رامنولیپید و تابش نور مرئی قرار گرفتند و تأثیرات آن‌ها بر کاهش جذب نوری و تشکیل بیوفیلم مورد سنجش قرار گرفت

نتایج: نتایج نشان داد که ترکیب این دو روش تأثیر قابل توجهی در مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در درماتوفیت‌ها دارد. به‌خصوص، کاهش معناداری در میانگین جذب نوری و تشکیل بیوفیلم در گونه‌های تریکوفیتون مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالای استفاده از روش‌های ترکیبی در درمان عفونت‌های قارچی و مدیریت بیوفیلم‌ها می‌باشد. پژوهش حاضر می‌تواند به عنوان مبنایی برای مطالعات آینده در زمینه درمان‌های نوین عفونت‌های قارچی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: درماتوفیت، سورفاکتانت، رامنولیپید، فتودینامیک، بیوفیلم

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۰۳
اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۳

مقدمه

عفونت‌های قارچی به‌ویژه عفونت‌های ناشی از درماتوفیت‌ها، به عنوان یکی از مشکلات شایع در بهداشت عمومی و پزشکی شناخته می‌شوند که می‌توانند منجر به عوارض جدی در افراد به ویژه در گروه‌های آسیب‌پذیر مانند بیماران با سیستم ایمنی ضعیف شوند (۱). درماتوفیت‌ها، از جمله گونه‌های مختلف تریکوفیتون و میکروسپوروم، به‌خوبی شناخته شده‌اند که موجب عفونت‌های جلدی، مانند پای ورزشکار و قارچ ناخن می‌شوند (۲).

بیوفیلم‌ها را می‌توان به‌عنوان مجموعه‌ای عملکردی و پیچیده از یک یا چند گونه میکروبی توصیف کرد که در یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی محصور شده و به یکدیگر یا به سطحی جامد متصل می‌باشند. این ساختارها ممکن است شامل یک گونه میکروبی منفرد و یا ترکیبی از گونه‌های مختلف مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها باشند (۳). میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم از نظر فنوتیپی با همتایان پلانکتونی خود تفاوت‌های زیادی نشان می‌دهند؛ به‌عنوان نمونه، در مقایسه با سلول‌های پلانکتونی، مقاومت بالاتری در برابر عوامل ضدمیکروبی دارند (٤).

درمان فتودینامیکی شامل استفاده از رنگ‌های غیرسمی یا مواد حساس به نور در ترکیب با نور مرئی و بی‌ضرر در طول موج‌های خاص است که موجب تحریک این مواد حساس به نور می‌شود. پس از تحریک، این مواد در حضور اکسیژن، انرژی یا الکترون‌ها را به مولکول‌های اکسیژن منتقل می‌کنند، که به تولید فرآورده‌های اکسیژن فعال مانند اکسیژن منفرد یا رادیکال‌های هیدروکسیل منجر می‌شود. این فرآیند منجر به اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌های غشای سیتوپلاسمی و اسیدهای نوکلئیک، و در نهایت مرگ میکروارگانیسم می‌گردد (۵). از آنجا که رادیکال‌های آزاد به صورت غیراختصاصی عمل کرده و طیف گسترده‌ای از اهداف سلولی را غیرفعال می‌کنند، تاکنون مقاومتی در میکروارگانیسم‌ها نسبت به این روش مشاهده نشده است. از دیگر مزایای این روش می‌توان به سرعت بالای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، تخریب عوامل حدت، و کاهش هزینه‌های درمان اشاره کرد. روشی مشابه با نام غیرفعال‌سازی فتودینامیکی برای عفونت‌های موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما در عفونت‌های سیستمیک مانند باکتریمی کاربرد ندارد. اخیراً این روش برای غیرفعال‌سازی اجرام میکروبی و همچنین مهار تشکیل بیوفیلم نیز به کار گرفته شده است (٦).

عوامل فعال‌کننده سطح، که معمولاً به عنوان سورفاکتانت‌ها شناخته می‌شوند، پس از حل شدن در آب تمایل به تجمع در سطح دارند و کشش سطحی آب را کاهش می‌دهند. سورفاکتانت‌ها مولکول‌های آمفی‌پاتیکی هستند که دارای بخش آب‌گریز غیرقطبی و بخش یونی متصل به آن می‌باشند (۷). بیوسورفاکتانت‌ها، یا سورفاکتانت‌های با منشأ میکروبی، نخستین بار به عنوان ترکیبات خارج سلولی در فرآیند تخمیر هیدروکربن در اواخر دهه ۱۹٦۰ کشف شدند. اصطلاح بیوسورفاکتانت به هر ترکیبی اطلاق می‌شود که از سیستم‌های بیولوژیکی تولید شده و دارای خواص فعال‌کننده سطح مشابه با سورفاکتانت‌های شیمیایی باشد (۸). رامنولیپیدها یکی از شناخته‌شده‌ترین بیوسورفاکتانت‌ها هستند که توسط سودوموناس آئروژینوزا و چندین سویه دیگر باکتریایی تولید می‌شوند. ساختار رامنولیپید شامل یک یا دو مولکول رامنوز متصل به یک یا دو مولکول بتا هیدروکسی دکانوئیک اسید است (۹). رامنولیپیدهای تولیدشده توسط سودوموناس آئروژینوزا به دلیل خواص سطحی و توانایی نفوذ به غشا، دارای فعالیت ضدمیکروبی هستند. این ترکیبات با کاهش هیدروفوبیسیته سطح بستر، تعاملات هیدروفوب میان سطح و دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها را کاهش داده و در نتیجه از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کنند و میزان چسبندگی آن‌ها را کم می‌نمایند (۱۰). مهار تشکیل بیوفیلم‌های باکتریایی توسط رامنولیپیدها احتمالاً به دلیل تغییر در هیدروفوبیسیته

سطح و اختلال در ویژگی‌های چسبندگی میکروارگانیسم‌ها رخ می‌دهد. تیمار بیوفیلم با رامنولیپیدها منجر به حذف پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی شده و در نتیجه با کاهش تعاملات هیدروفوب و تخریب میکروکلنی‌ها، تشکیل بیوفیلم را مختل می‌سازد (۱۱).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر همزمان این دو روش بر مهار بیوفیلم در درماتوفیت‌ها می‌باشد. با توجه به اینکه ترکیب این دو رویکرد ممکن است به طور چشمگیری اثر بخشی درمان را افزایش دهد، این تحقیق می‌تواند به عنوان یک گام مهم در توسعه درمان‌های نوین برای عفونت‌های قارچی مطرح گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

نمونه‌های درماتوفیت از آزمایشگاه‌های تشخیص بالینی مختلف در شهر گرگان و همچنین از دانشگاه علوم پزشکی گلستان جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها شامل سه گونه تریکوفیتون و دو گونه میکروسپوروم بودند. پس از انتقال به آزمایشگاه، گونه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA)کشت داده شده و به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. شناسایی درماتوفیت‌ها از طریق تجزیه و تحلیل ماکروسکوپی مورفولوژی کلنی‌ها و مشاهده میکروسکوپی ماکروکنیدی‌ها انجام شد (۱۲). همچنین، شناسایی مولکولی ایزوله‌ها با استفاده از واکنش PCRبرای تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 انجام گردید. در این فرآیند از پرایمرهای (5′-ITS-1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)و ITS-4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) استفاده شد. پس از تعیین توالی این قطعات، توالی‌های مذکور در پایگاه داده NCBI بلاست شده و گونه‌ها شناسایی شدند (۱۳). رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA X و به روش Maximum Likelihood انجام گرفت.

اعمال همزمان نورتابی و رامنولیپید

برای ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های مورد مطالعه تحت تأثیر درمان فتودینامیکی و رامنولیپید، مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^4 سلول به ۲ میلی‌لیتر محیط کشت potato dextrose مایع همراه با مقادیر ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت رامنولیپید در پلیت‌های ۹۶ چاهکی اضافه شد. انکوباسیون به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در مرحله بعد، متیلن بلو به عنوان القاگر نوری، در غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک حاوی بیوفیلم افزوده شد. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی، بیوفیلم‌ها تحت تابشLED با شدت ۱۰۰ مگاوات بر سانتی‌متر مربع، طول موج ۶۳۵ نانومتر، فاصله یک سانتی‌متری و به مدت ۶۰۰ ثانیه قرار گرفتند. جذب نوری مربوط به چاهک های تیمار شده و بدون حضور قارچ‌های درماتوفیت به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. توانایی تشکیل بیوفیلم از طریق کم کردن جذب نوری نمونه از جذب نوری کنترل ارزیابی گردید (۱۴).

آنالیز میکروسکوپ الکترونی

آنالیز میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) به‌منظور بررسی ساختار بیوفیلم در حضور بیوسورفکتانت رامنولیپید در بالاترین غلظت (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و تحت تابش نور مرئی با شدت $100 cm^2/mW$ انجام شد. برای این منظور، پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، بیوفیلم‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر گلوتارآلدهید ۲,۵ درصد در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت تثبیت شدند. سپس نمونه‌ها به‌طور دو بار با بافر کاکودیلات شسته شده و به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول‌های ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد دهیدراته شدند. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد خشک شده و با لایه‌ای از ذرات طلا پوشش داده شدند تا زیر میکروسکوپ SEM مورد بررسی قرار گیرند (۱٤).

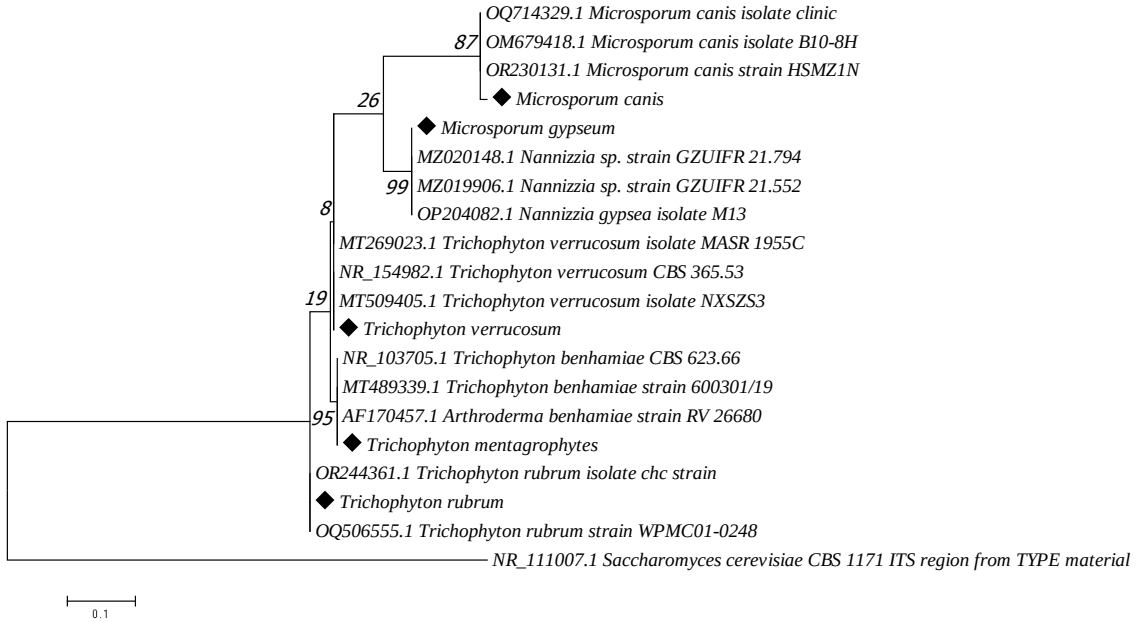
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات به صورت سه بار تکرار انجام شدند. داده‌های کمی به‌دست‌آمده از مراحل مختلف آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. به‌علاوه، برای بررسی‌های بیشتر از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. سطح معناداری با مقدار $P < 0.05$ تعیین شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی سویه‌های درماتوفیت

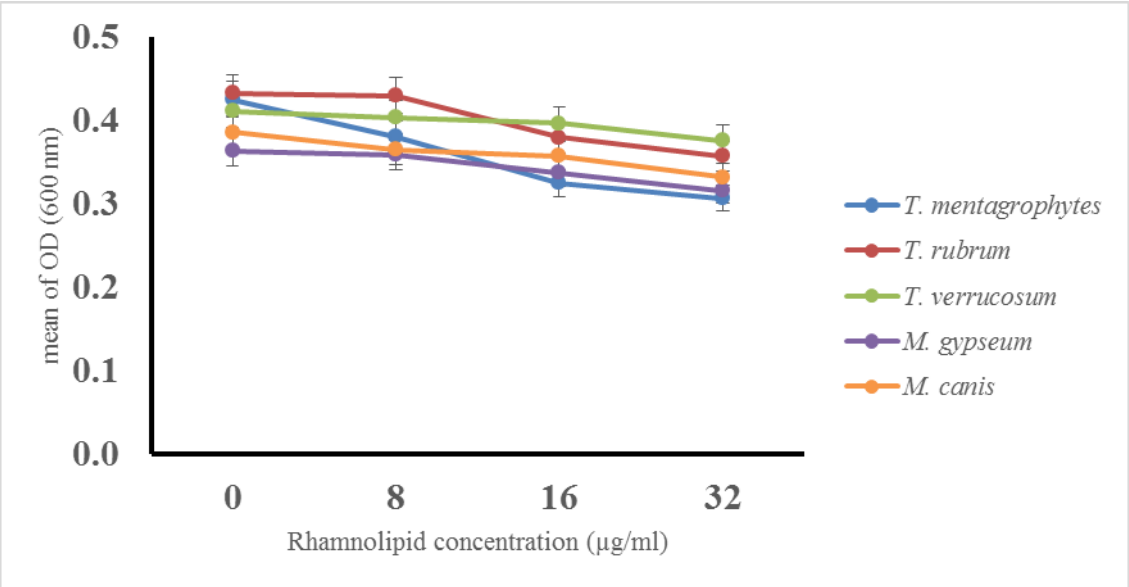
در این تحقیق، سه ایزوله از جنس تریکوفیتون شناسایی شدند: *تریکوفیتون منتاگروفایتس*، *تریکوفیتون روبروم* و *تریکوفیتون وروکوزوم*. *تریکوفیتون منتاگروفایتس* به‌عنوان گونه‌ای با رشد نسبتاً سریع شناخته می‌شود که کلونی پودری تشکیل می‌دهد. در مقابل، *تریکوفیتون روبروم* دارای رشد نسبتاً آهسته است و کلونی‌های کرکی با سطحی سفید رنگ تولید می‌کند. *تریکوفیتون وروکوزوم* نیز با رشد بسیار آهسته و ایجاد کلونی‌های پودری شکل که به رنگ سفید تا خاکستری هستند، مشخص می‌شود. علاوه بر این، دو ایزوله از جنس میکروسپوروم نیز شناسایی شدند: *میکروسپوروم کنیس* و *میکروسپوروم جیپسئوم*. کلونی *میکروسپوروم کنیس* پس از یک هفته به‌خوبی رشد کرده و دارای سطحی صاف، پنبه‌ای یا دانه‌ای شکل بود که با رنگ سفید مایل به زرد و تولید پیگمان زرد طلایی در محیط کشت قابل تشخیص است. *میکروسپوروم جیپسئوم* نیز به‌واسطه تشکیل کلنی‌های سفید و پنبه‌ای شناسایی گردید. علاوه بر شناسایی ماکروسکوپی، تأیید شناسایی مولکولی سویه‌ها نیز انجام شد. در شکل ۱، درخت فیلوژنی با استفاده از روش Maximum Likelihood، بوت‌استرپ ۱۰۰۰ و ساکارومیسز سرویزیه به‌عنوان گروه خارج از محاسبه (Outgroup) رسم شده است.



شکل ۱. درخت فیلوژنی با متد Maximum Likelihood method، بوت استرپ ۱۰۰۰ و *ساکارومیسز سرویزیه* به عنوان Outgroup (ایزوله ها با علامت مشکی مشخص شده‌اند)

ارزیابی اعمال همزمان نورتابی و رامنولیپید بر تشکیل بیوفیلم

میانگین کاهش جذب نوری برای *تریکوفیتون منتاگروفایتس* در این بخش، از چاهک کنترل (بدون رامنولیپید) که مقدار آن تقریباً ۰/٤١٦ بود، به ۰/۲۳۳ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رامنولیپید رسید. این کاهش جذب نوری کمی بیشتر از کاهش مشاهده‌شده در استفاده از بیوسورفکتانت رامنولیپید به‌تنهایی بود (نمودار ۱). برای *تریکوفیتون روبروم*، میانگین جذب نوری در چاهک بدون رامنولیپید ۰/٤۳٤بود؛ اما با افزودن رامنولیپید در غلظت‌های مختلف و نوردهی همزمان، کاهش نسبی جذب نوری در اثر تأثیر بر بیوفیلم این درماتوفیت مشاهده گردید. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این بیوسورفکتانت، میانگین جذب نوری به حدود ۰/۲۸٦ رسید که نشان‌دهنده‌ی تأثیر مهارکنندگی بیشتری نسبت به حضور رامنولیپید به‌تنهایی بود. در مورد *تریکوفیتون وروکوزوم*، یک الگوی کاهشی مشخص با اعمال همزمان فرآیند فتودینامیک و بیوسورفکتانت رامنولیپید در هر سه غلظت استفاده‌شده مشاهده گردید. به‌طوری‌که میانگین جذب نوری در چاهک کنترل تقریباً ۰/٤۰۳و در چاهک حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رامنولیپید تقریباً ۰/۱۸۸ بود. این نتایج نشان‌دهنده‌ی اثر مهارکنندگی بر تشکیل بیوفیلم این درماتوفیت بود که بیش از دو برابر برآورد گردید. در این بخش، گونه‌های میکروسپوروم مقاومت نسبی بیشتری در برابر تأثیر همزمان نوردهی و بیوسورفکتانت نشان دادند و کمترین میزان مهار شدگی بر تشکیل بیوفیلم در آن‌ها ثبت شد. برای میکروسپوروم جیپسئوم، میانگین جذب نوری از ۰/۳٦٦ در چاهک بدون رامنولیپید به ۰/۲٦٤ در چاهک حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از این بیوسورفکتانت کاهش یافت. همچنین برای *میکروسپوروم کنیس*، تغییرات جذب نوری از ۰/۳۸۲ در چاهک کنترل به ۰/۲۹٦در بالاترین غلظت رامنولیپید در چاهک‌های تحت فتودینامیک ارزیابی گردید. تغییرات مشاهده‌شده برای تمامی گونه‌های مورد مطالعه از نظر آماری معنادار بودند ($P<0.05$) (جدول ۱).



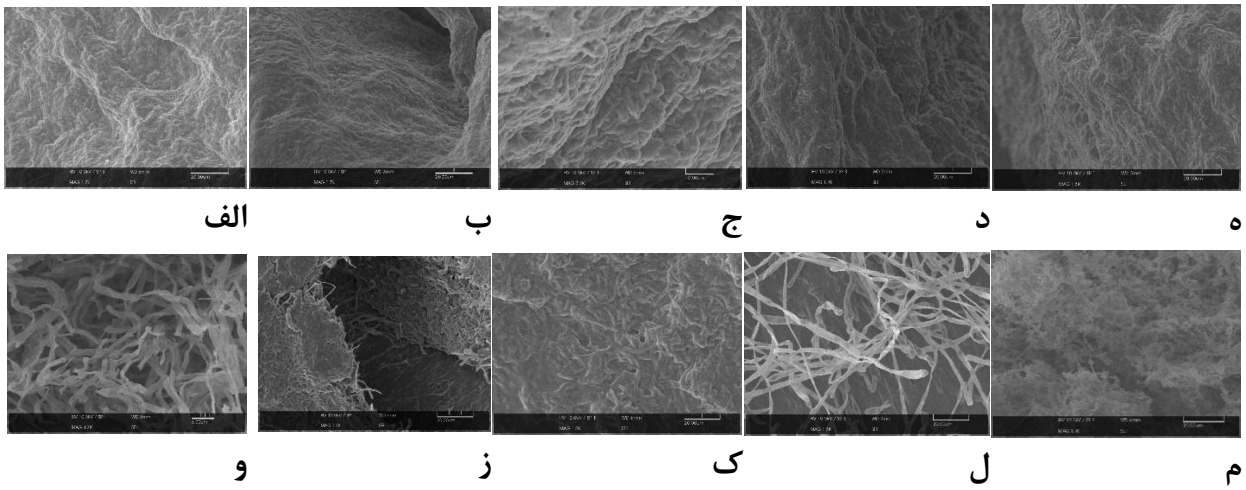
نمودار ۱. ارزیابی تاثیر همزمان فتودینامیک و رامنولیپید در غلظت‌های مختلف بر بیوفیلم *گونه های درماتوفیت*

جدول ۱. مقادیر OD در ارزیابی تاثیر همزمان فتودینامیک و رامنولیپید در غلظت‌های مختلف بر بیوفیلم *گونه های درماتوفیت*

Rhamnolipid concentration (µg/ml)	0	8	16	32
T. mentagrophytes	0.424±0.021	0.38±0.156	0.324±0.042	0.305±0.302
T. rubrum	0.432±0.18	0.429±0.173	0.378±0.104	0.356±0.124
T. Verrucosum	0.41±0.211	0.403±0.201	0.396±0.166	0.375±0.205
M. gypseum	0.363±0.057	0.358±0.182	0.336±0.204	0.315±0.077
M. Canis	0.385±0.085	0.364±0.006	0.356±0.164	0.331±0.015

نتایج بررسی میکروسکوپی تشکیل بیوفیلم

تصاویر مربوط به بیوفیلم کنترل تمامی درماتوفیت‌های مورد آزمون که در شرایط بدون استرس و بدون تأثیر بیوسورفکتانت رامنولیپید و فرآیند فتودینامیک قرار گرفته بودند، نمایانگر هیف‌های ضخیم، صاف و بدون آسیب از توده‌های به هم پیوسته و متراکم میسلیومی در بیوفیلم‌های قارچی بود (شکل ۳). در بیوفیلم *تریکوفیتون متاگروفایتس* تحت تیمار، ایجاد شکاف و حفره در بیوفیلم، شکستگی، پیچ خوردگی و چین و چروک‌های شدید در میسلیوم‌ها در تصاویر **SEM** به وضوح مشهود بود (شکل ۳–و). در بیوفیلم *تریکوفیتون روبروم* نیز حفره‌سازی، کاهش تراکم و از هم گسیختگی بیوفیلم، به همراه ایجاد شکستگی در میسلیوم قارچی مشاهده می‌شود (شکل ۳–ز). برای گونه *تریکوفیتون وروکوزوم*، علیرغم تأثیرپذیری بیشتر این درماتوفیت نسبت به بیوسورفکتانت رامنولیپید و فرآیند فتودینامیک، تغییرات واضحی بین بیوفیلم‌های کنترل و تیمار قابل مشاهده نبود. اما با دقت در تصاویر به‌دست‌آمده، نوعی کاهش در هم‌پیوندی میسلیوم‌ها، تکه‌تکه شدن آن‌ها و ایجاد حفره در بیوفیلم قابل تشخیص است (شکل ۳–ک). در مورد میکروسپوروم‌ها که جزو مقاوم‌ترین درماتوفیت‌ها به حساب می‌آیند، تغییرات در بیوفیلم‌های قارچی پس از اعمال تنش قابل ملاحظه بود. برای *میکروسپوروم کنیس*، فشردگی یا انقباض، شکستگی، له شدگی و چین و چروک‌های شدید در میسلیوم‌ها مشاهده شد (شکل ۳–ل). برای *میکروسپوروم جیپسئوم* نیز این تأثیرات محسوس بود؛ به‌طوری‌که حفره‌سازی، کاهش ضخامت در بیوفیلم و ایجاد سطوح زبر، خشن و کرکی‌مانند بر روی میسلیوم‌های قارچی، در کنار فشردگی و خم‌شدگی برخی میسلیوم‌های انتهایی، گواه بر تأثیر تنش اعمال‌شده بر روی آن بود (شکل ۳–م).



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی نمونه کنترل (الف) و تیمار شده (و) *تریکوفیتون متاگروفایتس*، کنترل (ب) و تیمار شده (ز) *تریکوفیتون روبروم*، کنترل (ج) و تیمار شده (ک) *تریکوفیتون وروکوزوم*، کنترل (د) و تیمار شده (ل) *میکروسپوروم*

بحث

در این تحقیق، اثر همزمان مهار فتودینامیکی و رامنولیپیدی بر تشکیل بیوفیلم در درماتوفیت‌ها بررسی شد. درماتوفیت‌ها به عنوان عاملان اصلی عفونت‌های قارچی در انسان و حیوانات شناخته می‌شوند و تشکیل بیوفیلم در این میکروارگانیسم‌ها، یکی از چالش‌های مهم در درمان عفونت‌های قارچی است. بیوفیلم‌ها به میکروارگانیسم‌ها این امکان را می‌دهند که در محیط‌های نامساعد زندگی کنند و به درمان‌های آنتی‌میکروبی مقاوم شوند (۱۵).

روش فتودینامیک به عنوان یک رویکرد نوین در درمان عفونت‌ها، با استفاده از مواد حساس به نور و نور مرئی، موجب تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه تخریب بیوفیلم‌های قارچی می‌شود (۱٦). این روش به دلیل غیر اختصاصی بودن رادیکال‌های آزاد، می‌تواند در برابر میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو مؤثر واقع شود و تا کنون در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷).

از سوی دیگر، رامنولیپید، به عنوان یک بیوسورفکتانت با خصوصیات ضدمیکروبی، می‌تواند به تضعیف ساختار بیوفیلم‌ها کمک کند. مطالعات نشان داده‌اند که رامنولیپید می‌تواند با کاهش چسبندگی و مانع شدن از تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی، به بهبود کارایی درمان کمک کند (۱۸).

نتایج ما نشان داد که ترکیب این دو روش، تأثیر قابل توجهی در مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در درماتوفیت‌ها دارد. کاهش قابل توجهی در جذب نوری و میزان تشکیل بیوفیلم در ترکیب رامنولیپید و درمان فتودینامیک مشاهده شد که می‌تواند به دلیل اثر سینرژیک این دو رویکرد باشد (۱۹). همچنین، تأثیر همزمان این دو روش بر روی گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها، نشان دهنده‌ی این است که بعضی از گونه‌ها نسبت به این ترکیب درمانی حساس‌تر هستند، به طوری که در گونه‌هایی مانند *تریکوفیتون منتاگروفایتس* و *تریکوفیتون روبروم*، کاهش معناداری در تشکیل بیوفیلم مشاهده گردید (۲۰).

رامنولیپیدها یکی از شناخته شده‌ترین بیوسورفکتانت‌ها هستند که توسط *سودوموناس آئروژینوزا* و چندین سویه‌ی باکتریایی دیگر تولید می‌شوند (۹). رامنولیپیدهای مشتق از *سودوموناس آئروژینوزا* به دلیل فعالیت سطحی و توانایی نفوذ در غشا، دارای فعالیت ضد باکتریایی می‌باشند. همچنین رامنولیپیدها با کاهش هیدروفوبیسیتی سطح بستر، میانکنش‌های هیدروفوب سطح با دیواره‌ی سلولی میکروارگانیسم را کاهش می‌دهند و در نتیجه تشکیل بیوفیلم را مهار و میزان اتصال آن را کاهش می‌دهند (۱۰). ممانعت از تشکیل بیوفیلم باکتریایی بر سطح توسط رامنولیپیدها، احتمالاً به علت تغییر در هیدروفوبیسیتی سطح و تداخل در ویژگی‌های اتصالی ممیکروارگانیسم‌ها است. تیمار بیوفیلم با رامنولیپیدها موجب حذف پلی-ساکاریدهای خارج سلولی و در نتیجه کاهش میانکنش هیدروفوبیک با بستر، تداخل با میکروکلنی‌ها و همچنین تخریب بیوفیلمِ تشکیل شده، می‌شود (۱۱). در همین راستا Sen و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثربخشی بیوسورفکتانت رامنولیپیدی برای مهار *تریکوفیتون روبروم* در شرایط آزمایشگاهی و در مدل موش درماتوفیتوزیس را مورد بررسی قرار دادند. به طور کلی نتایج حاکی از اثربخشی رامنولیپید در کنترل درماتوفیتوز ناشی از *تریکوفیتون روبروم* بود (۲۱). همچنین در مطالعه Sen و همکاران در سال ۲۰۲۰، اثرات یک رامنولیپید (RL-SS14) تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* SS14 بر سلول های پلانکتونیک *تریکوفیتون روبروم* و *تریکوفیتون منتاگروفیتس*، تشکیل بیوفیلم آنها و اختلال در بیوفیلم های بالغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده پتانسیل RL-SS14 به عنوان یک عامل ضد بیوفیلم علیه درماتوفیت ها بود (۲۲).

در رابطه با درمان فتودینامیکی، Smijs و Schuitmaker در سال ۲۰۰۳، تاثیر درمان فتودینامیک بر درماتوفیت *تریکوفیتون روبروم* را گزارش کرده و این روش را یک کاندید امیدوار کننده برای درمان اشکال مختلف کچلی معرفی نمودند (۲۳). Smijs و همکاران در سال ۲۰۰٤، درمان فوتودینامیک درماتوفیت *تریکوفیتون روبروم* و میکروکنیدیای آن با حساس‌گر نوری پورفیرین را مورد ارزیابی قرار دادند. این محققان در مطالعه پیشین نشان دادند که Sylsens B و منومتیل‌استر دوتروپورفیرین در هنگام استفاده از نور سفید پهن باند، حساس‌گرهای نوری عالی علیه *تریکوفیتون روبروم* بودند. این مطالعه فعالیت فتودینامیک این حساس‌گرهای نوری را با نور قرمز نسبت به کشت سوسپانسیون *تریکوفیتون روبروم* و

میکروکنیدی‌های جدا شده از آن نشان می‌دهد. عمق نفوذ بیشتر نور قرمز برای PDT عفونت ناخن مهم است. یک نتیجه امیدوارکننده از این مطالعه، نشان دادن تخریب کامل هیف‌های قارچی در زمان پس از PDT و غیرفعال شدن هاگ‌های قارچ، با نور قرمز بود (۲٤). Rodrigues و همکاران در سال ۲۰۱۲، حساسیت درماتوفیت‌های *تریکوفیتون روبروم* و *تریکوفیتون منتاگروفیتس* به شیمی درمانی ضد میکروبی فتودینامیک با حساس‌گرهای نوری جدید فنوتیازینیوم و نور قرمز را مورد ارزیابی قرار دادند. این سیستم موجب مهار چهار برابری *تریکوفیتون روبروم* و مهار کامل *تریکوفیتون منتاگروفیتس* شد (۲۵). Kim و همکاران در سال ۲۰۱٤، غیرفعال سازی فتودینامیک کلرین e6[1] با نور هالوژن در برابر درماتوفیت‌ها را مورد بررسی قرار دادند. این محققان برای اولین بار گزارش کردند که PDI مبتنی بر کلرین e6 فعالیت ضد قارچی قابل توجهی در برابر *تریکوفیتون منتاگروفیتس* نشان می‌دهد (۲٦). Chen و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثرات فتودینامیک در برابر بیوفیلم‌های درماتوفیت‌های دخیل در اونیکومیکوز را در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه، متیلن بلو به‌عنوان حساس‌گر نوری و LED به‌عنوان منبع نور در برابر شش سویه *تریکوفیتون روبروم*، ده سویه *تریکوفیتون منتاگروفیتس* و سه سویه *میکروسپوروم جیپسئوم* جدا شده از نمونه‌های بالینی، استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده مهار فتودینامیک بسیار کارآمد و کاهش CFU بیوفیلم‌های تشکیل‌شده توسط درماتوفیت‌های مورد بررسی بود (۱٤).

نتیجه‌گیری

با توجه به جستجو در پایگاه های داده، بررسی اثر درمان فتودینامیکی و مهار رامنولیپیدی بر بیوفیلم درماتوفیت ها به صورت همزمان تا کنون انجام نشده است و در تحقیق حاضر برای اولین بار به آن پرداخته شد. نتایج حاصل نشان داد که رامنولیپید به تنهایی و همراه با درمان فتودینامیکی می‌تواند روش امیدوار کننده‌ای برای مهار تشکیل بیوفیلم توسط تریکوفیتون‌ها باشد. گونه‌های میکروسپوروم مقاومت بیشتری در برابر روش‌های مورد استفاده نشان دادند. از روش های درمان فتودینامیکی و مهار رامنولیپیدی برای مهار رشد انواعی از قارچ ها و مهار تشکیل بیوفیلم در آن ها استفاده شده است اما این مطالعات اندک بوده و برای ارزیابی اثرگذاری این دو روش آزمایشات بیشتری نیاز است که امید است در آینده به آن‌ها پرداخته شود.

این نتایج می‌تواند پایه‌گذار مطالعات بیشتری در زمینه درمان عفونت‌های قارچی باشد و همچنین اهمیت بررسی ترکیب روش‌های مختلف درمانی را در مدیریت عفونت‌های میکروبی تأکید می‌کند. به‌ویژه در عصر حاضر که مقاومت میکروبی به داروهای متداول به یک چالش بزرگ تبدیل شده است، استفاده از روش‌های جدید و ترکیبی می‌تواند به توسعه راهکارهای مؤثرتر در درمان عفونت‌ها کمک کند.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق با کد اخلاق IR.IAU.AMOL.REC.1402.137 از دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی تأیید شده است.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

[1] Chlorin e6

منابع

1. Garnacho-Montero J, Barrero-García I, León-Moya C. Fungal infections in immunocompromised critically ill patients. Journal of Intensive Medicine. 2024.
2. Hayette M-P, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. Current Fungal Infection Reports. 2015;9:164-79.
3. Algburi A, Comito N, Kashtanov D, Dicks LM, Chikindas ML. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. Applied and environmental microbiology. 2017;83(3.(
4. Li X, Wu B, Chen H, Nan K, Jin Y, Sun L, Wang B. Recent developments in smart antibacterial surfaces to inhibit biofilm formation and bacterial infections. Journal of Materials Chemistry B. 2018;6(26):4274-92.
5. Lan M, Zhao S, Liu W, Lee CS, Zhang W, Wang P. Photosensitizers for photodynamic therapy. Advanced healthcare materials. 2019;8(13):1900132.
6. Almeida A. Photodynamic Therapy in the Inactivation of Microorganisms. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020.
7. Kamal MS, Hussein IA, Sultan AS. Review on surfactant flooding: phase behavior, retention, IFT, and field applications. Energy & Fuels. 2017;31(8):7701-20.
8. Singh P, Patil Y, Rale V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. Journal of applied microbiology. 2019;126(1):2-13.
9. Varjani SJ, Upasani VN. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. Bioresource technology. 2017;232:389-97.
10. Araújo J, Rocha J, Oliveira Filho M, Matias S, Júnior SO, Padilha C. Rhamnolipids Biosurfactants from Pseudomonas Aeruginosa−A Review. Biosciences Biotechnology Research Asia. 2018;15(4):767-81.
11. Kaskatepe B, Yildiz S. Rhamnolipid biosurfactants produced by Pseudomonas species. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2016;59.
12. Nitta CY, Daniel AGT, Taborda CP, Santana AE, Larsson CE. Isolation of dermatophytes from the hair coat of healthy Persian cats without skin lesions from commercial catteries located in São Paulo metropolitan area, Brazil. Acta Scientiae Veterinariae. 2016;44:1-7.
13. Chanu KV, Thakuria D, Pant V, Bisht S, Tandel RS. Development of multiplex PCR assay for species-specific detection and identification of Saprolegnia parasitica. Biotechnology Reports. 2022;35:e00758.
14. Chen B, Sun Y, Zhang J, Chen R, Zhong X, Wu X, et al. In vitro Evaluation of Photodynamic effects against biofilms of dermatophytes involved in onychomycosis. Frontiers in microbiology. 2019;10:1228.
15. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases. 2002;8(9):881.
16. Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. International journal of molecular sciences. 2015;16(9):20523-59.
17. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy−what we know and what we don't. Critical reviews in microbiology. 2018;44(5):571-89.
18. Suh S-J, Invally K, Ju L-K. Rhamnolipids: Pathways, productivities, and potential. Biobased surfactants. 2019:169-203.
19. Huis in 't Veld RV, Heuts J, Ma S, Cruz LJ, Ossendorp FA, Jager MJ. Current challenges and opportunities of photodynamic therapy against cancer. Pharmaceutics. 2023;15(2):330.
20. Murugaiyan J, Kumar P, Rao G, Iskandar K, Hawser S, Hays J, et al. Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: focus on antibiotics. Antibiotics 2022; 11: 200. Selected recent Ukrainian OA Papers. 2022:23.
21. Sen S, Borah SN, Kandimalla R, Bora A, Deka S. Efficacy of a rhamnolipid biosurfactant to inhibit Trichophyton rubrum in vitro and in a mice model of dermatophytosis. Experimental Dermatology. 2019;28(5):601-8.
22. Sen S, Borah SN, Bora A, Deka S. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophytic fungi Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes. Biotechnology reports. 2020;27:e00516.
23. Smijs TG, Schuitmaker HJ. Photodynamic Inactivation of the Dermatophyte Trichophyton rubrum. Photochemistry and photobiology. 2003;77(5):556-60.
24. Smijs TG, van der Haas RN, Lugtenburg J, Liu Y, de Jong RL, Schuitmaker HJ. Photodynamic Treatment of the Dermatophyte Trichophyton rubrum and its Microconidia with Porphyrin Photosensitizers. Photochemistry and photobiology. 2004;80(2):197-202.
25. Rodrigues GB, Ferreira LK, Wainwright M, Braga GU. Susceptibilities of the dermatophytes Trichophyton mentagrophytes and T. rubrum microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2012;116:89-94.
26. Kim J-H, Han C-S, Chun S-N, Lee M-Y. Photodynamic inactivation of chlorin e6 with halogen light against dermatophytes. Toxicology and Environmental Health Sciences. 2014;6(3):170-5.