Symbiosis

www.symbiosisonline.org
www.symbiosisonlinepublishing.com

Научна статия Журнал по микробиология и инфекциозни болести Отворен достъп

Антибактериалният ефект на хитозан при образуването на периодонтален биофилм от патогенни микроорганизми

Едуардо М. Коста[1], Сара Силва[1], Кристина Пина[2], Френи К. Тавария[1] и Мануела Пинтадо[1]*

[1]CBQF – Център за биотехнологии и фини химикали – асоциирана лаборатория, Факултет по биотехнологии, Португалски католически университет на Порто, ул. „Д-р Антонио Бернардино де Алмейда", Португалия
[2]Факултет по науки в областта на здравеопазването, университет „Фернандо Песоа", Португалия

Получена на: 26 февруари 2014 г.; Приета на: 10 март 2014 г.; Публикуване на : 12 март 2014 г.

***Автор-кореспондент:** Мануела Пинтадо, CBQF- Център за биотехнологии и фини химикали – асоциирана лаборатория, Факултет по биотехнологии, Португалски католически университет на Порто, ул. „Д-р Антонио Бернардино де Алмейда", Португалия, тел.: +351-22-55-80-097; факс: +351-225-090-351-420-0072; имейл: emcosta@porto.ucp.pt*

Резюме

В годините на практиката си авторите установяват, че веществото хитозан демонстрира значително антимикробно действие срещу планктонни бактерии, но почти нищо не се знае за начина, по който хитозанът въздейства върху неподвижни микробни колонии. Целта на настоящото изследване е да се оцени въздействието на веществото хитозан върху 5 патогена, образуващи периодонтален биофилм: Porphyromonasgingivalis,Prevotellaintermedia, Prevotellabuccae, Tanerellaforsythensis и Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Получените резултати сочат, че хитозан както с висока молекулярна маса, така и с ниска молекулярна маса е способен да предотврати образуването на биофилми и свързаните с тях явления. С концентрация на хитозан дори под минималната инхибираща такава (МИК – минимална инхибираща концентрация) се постигна 90% инхибиране на процеса по образуване на биофилм от един вид патоген и 80% инхибиране на процеса по образуване на биофилм от два вида патогени. Освен това анализът на въздействието на хитозана върху кворумната сигнализация показа, че 24 часа след прилагане на хитозан инхибирането достига стойности от 70%. Получените резултати откриват нови възможности в борбата с образуването на биофилми в устната кухина и в предотвратяване развитието на нежелани колонии от бактерии след стоматологично лечение.

Ключови думи: Биофилм; Хитозан; Два вида патогени; Концентрация под МИК; Кворумна сигнализация

Въведение

Зъбната плака е динамичен биофилм, развиващ се в непрекъснато еволюираща среда, в която микроорганизмите трябва да съумеят да се прикрепят към обливани с течност повърхности, за да оцелеят и образуват колония [1,2]. Микоорганизмите в устната кухина се позиционират селективно и около зъбите, протезите и венечните лигавици се образува биофилм. Ако не се предприемат мерки за отстраняването му, той ще доведе до развитие на кариеси и пародонтални заболявания [3]. В зъбната плака вирят повече от 800 вида микроорганизми и докато някои от тях са способни директно да се прикрепят към тъканите в устната кухина - Streptococcus oralis, Streptococcus sanguinis и Streptococcus mitis, други като Aggregatibacter actinomycetemcomitans и Prevotellaintermedia се нуждаят от „помощ от приятел", за да го направят [2, 4].

Биофилмите обикновено се считат за етиологичен агент, свързан със зъбния кариес и пародонтита, като последното предполага унищожаване на поддържащия апарат на зъба, кървене и накрая загуба на зъба [2, 5, 6]. Въпреки разнообразието от микроорганизми, които образуват колонии в устната кухина, повечето бактерии, свързани с пародонталните заболявания, са грам-положителни анаеробни бактерии като Aggregatibacter actinomycetemcomitans и няколко вида Bacteroidetes, напр. Porphyromonasgingivalis [7]. Общоприето е зъбната плака да се отстранява с двустепенен процес, който включва механично третиране и прилагане на антибактериален препарат [2, 6, 8]. Въпреки това приложението на антибактериални препарати в устната кухина е в значителна степен възпрепятствано от наличието на биофилм. Намалената уязвимост на биофилмите към антибактериални препарати в комбинация с общото повишаване резистентността на бактериите към медикаменти мотивира продължаващото в момента търсене на нови антибактериални препарати, които да намерят приложение в стоматологичната практика [8-10]. В това отношение хитозанът може да се окаже ефикасна и същевременно естествена антибактериална алтернатива, която освен това контролира образуването на биофилми.

Хитозанът е естествен полизахарид, който се извлича от хитин и има както доказан антибактериален ефект (срещу гъбички, планктони и бактерии) [11, 12], така и биоадхезивни свойства, което го прави интересна перспектива за биоактивен компонент, който да бъде влаган в продуктите за орална грижа [13]. Повечето публикувани изследвания по отношение въздействието на хитозана съобщават за бактерицидните му свойства срещу планктонни микроорганизми, но се знае твърде малко за въздействието му върху прикрепянето на бактериите и формирането на биофилм [10, 14-16]. Като се има предвид, че въздействието на хитозана върху биофилмите от патогенни микроорганизми в устната кухина все още е обект на изучаване, основната цел на настоящото изследване беше да се оцени потенциалът на веществото като възможен агент срещу биофилмите, способен да попречи на пародонталните патогени да образуват такъв.

Материали и методи

Микроорганизми

Пет от седемте микроорганизма, използвани в настоящото изследване, произхождат от колекцията култури на Университета на Гьотеборг (CCUG) (Швеция) - Prevotellabuccae (CCUG 15401) – изолиран от пародонтит; Tannarellaforsythensis (CCUG 51269) – изолиран от човешки дълбоки пародонтални джобове; Aggregatibacter actinomycetemcomitans (CCUG 13227) – произходът не е посочен; Chromobacteriumviolaceum (CCUG 37577) - произходът не е посочен; Streptococcus mutans (CCUG 45091) - произходът не е посочен. Porphyromonasgingivalis беше получен от институт „Пастьор" (Франция) (9704 CIP 103683T), както и клинично изолирана проба от Prevotellaintermedia. Всички микроорганизми бяха култивирани в хранителната среда (бульон) Wilkins-Chalgrens Broth (WCB) (Oxoid, Англия) с изключение на C. Violaceumthat, който се култивира в хранителната среда (бульон) Bertani Broth (LB) (Invitrogen, Великобритания), а всички препарати за инокулкация се приготвиха през нощта.

Copyright:
© 2014 Pintado et al.

Източници и подготовка на разтвори с хитозан

От Sigma-Aldrich (Сейнт Луис, САЩ) предоставиха хитозан с висока и с ниска молекулярна маса (респективно ВММ и НММ). Хитозанът с висока молекулярна маса демонстрира степен на деацетилиране (СД) > 75%, молекулярната маса (ММ) беше 624 kDa. Хитозанът с ниска молекулярна маса демонстрира СД в диапазона между 75% и 85%, молекулярната маса (ММ) беше 107 kDa.

Разтворът на хитозан се приготви в 1% (v/v) разтвор на 99% оцетна киселина на кристали (Panreac, Барселона, Испания). Хитозан в желаната концентрация се добави в 1% оцетна киселина. След това разтворът се бъркa една нощ при 50°C, за да се ускори пълното разтваряне на хитозана. Киселинността (pH) се регулира с NaOH (Merck, Дармщат, Германия) до окончателна стойност от 5,6 – 5,8, а разтворът се съхраняваше при температура от 4°C.

Тест в епруветка

Скринингът за въздействието на хитозана върху образуването на биофилм е адаптиран по Кристенсен (Christensen) и др. [17]. В прозрачни епруветки с вместимост 25 мл се извърши инокулация при 1% (v/v) в хранителна среда WCB с добавени 5% (m/v) захароза. Хитозанът се добави в концентрации под МИК (½ и ¼ от МИК), подбрани спрямо МИК резултатите, постигнати от Коста (Costa) и др. [9] (таблица 1). Всяка от епруветките се запечата за инкубация в хоризонтална позиция при 37°C за 72 часа в анаеробен буркан (AnaeroPack, Mitsubishi gas chemical company, Япония). Епруветки само с инокулация и епруветки само с хранителна среда се използваха съответно като положителни и отрицателни контролни проби.

След инкубацията съдържанието на епруветките внимателно се извади и отстрани. След което във всяка епруветка се добави 2 мл разтвор на хексаметил параросанилин хлорид (Merck, Дармщат, Германия), който се остави за 5 мин, докато епруветките бяха в миксер (Movil-Rod, J. P., Selecta, Барселона, Изпания) с цел хомогенно оцветяване. След това оцветяващият разтвор се отстрани, епруветките се обърнаха и се оставиха да изсъхнат за една нощ на стайна температура.

Образуването на биофилм се прецени качествено чрез наблюдение за наличие на видим филм, покриващ стените на епруветките, като скалата за оценяване беше: липсва (0); малко количество (+); умерено количество (++); голямо количество (+++). Всички проби се подготвиха в три екземпляра.

Тест с плоча за микротитруване

Количественото определяне на образуването на биофилми в пробите с и без подхранване се проведе по протокола на Степанович (Stepanovic) и др. [18]. Накратко в плоскодънна плоча с 96 гнезда се поставиха 200 µl от подложените на изпитване разтвори на хитозан с концентрация под МИК. Биофилми се образуваха без и с подхранване. При първия вариант плочата се постави за инкубация за 48 часа в правоъгълен буркан при 37°C. При втория вариант хранителната среда се подменяше на всеки 24 часа. Пробите бяха оставени за 96 часа и за 198 часа при 37°C. Всички проби се изпълниха в три екземпляра с хранителна среда WCB с 5% захароза.

С цел визуализиране на биофилмите съдържанието на гнездата се отстрани, след което те се измиха 3 пъти със стерилна дейонизирана вода, която да премахне неприлепналите клетки. Останалите прилепнали бактерии се фиксираха с 200 µl етанол (Panreac, Барселона, Испания) за 15 мин.

Таблица 1: Хитозан в концентрация под МИК, тестван за всяка бактерия в мг/мл. Стойностите се базират на тези, описани по-рано от Коста (Costa) и др.

	ВММ (мг/мл)		НММ (мг/мл)	
	1/2	1/4	1/2	1/4
P. gingivalis	0.5	0.25	0.5	0.25
T. forsythensis	0.5	0.25	1.5	0.75
P. buccae	1.5	0.75	0.5	0.25
A. actinomycetemcomitans	2.5	1.25	1.5	0.75
P. intermedia	0.5	0.25	1.5	0.75

Етанолът се отстрани, а гнездата се изсушиха. След това в гнездата се постави 200 µl разтвор на хексаметил параросанилин хлорид, след 5 мин прекомерното оцветяване се отстрани чрез изплакване под течаща вода и отново последва изсушаване. Образуването на биофилм се определи количествено чрез измерване на оптичната плътност при 630 нм с помощта на фотометър за микроплочи (FLUOstar, OPTIMA, BGMLabtech).

Всички експерименти се провеждаха в три екземпляра за всяка бактерия. Стойностите на оптична плътност за гнездата само с хранителна среда WCB се използваха за отрицателни контролни проби. За всяка бактерия се използваха положителни контролни проби със стерилна дейонизирана вода.

Резултатите от този тест са представени като процентно изражение на степента на инхибиране образуването на биофилм с помощта на следната формула:

% степен на инхибиране образуването на биофилм
$= 100 - (ОП_{проба}/О_{Пконтролна\ проба}) \times 100$
*ОП = оптична плътност

Биофилми с две бактерии

Количественото определяне степента на въздействие на хитозана върху биофилмите, образувани от две бактерии (S. mutans и P. intermedia; S. Mutans и P. gingivalis), се определи по метода, описан от Коста (Costa) и др. [10].

Проба за тестване инхибирането на кворумна сигнализация (КС) в пробите за инхибиране

Скринингът на инхибиторното действие на хитозана с ВММ и НММ върху кворумната сигнализация се извърши на база способността на веществото да инхибира продуцирането на лилавия пигмент виолацеин от C.violaceum. Пробата се подготви чрез адаптиране на протокола, описан от Питлованчив (Pitlovanciv) и др. [19]. Накратко, всички 96 гнезда на микроплочата се напълниха с 200 мл от изпитвания разтвор на хитозан в концентрация под МИК. Същевременно се подготви положителна контролна проба, в която хитозанът се замени с вода. След това плочата се остави за 24 часа за инкубация при 37°C във фотометър за микроплочи (FLUOstar, OPTIMA, BGMLabtech), като се измери оптична плътност от 577 нм за продуциране на виолацеин и от 660 нм за бактериален растеж. Всички проби се подготвиха в три

Статистически подход

Статистическите разлики в методите се преценихa по модела за статистически анализ на PASW Statistics, версия 18.0.0 (Ню Йорк, САЩ). Доколко нормално е разпределението на резултатите се прецени с критерия на Шапиро-Уилк. Разликите се анализираха с еднопосочен дисперсионен анализ (ANOVA), заедно с анализа на Скефе (за нормално разпределение) или с непараметричния критерий на Ман-Уитни за останалите. За значителни се считаха разлики на ниво 0,05.

Copyright:
© 2014 Pintado et al.

Резултати и обсъждане

Тест в епруветки

Експериментите, проведени в нашето изследване, ни позволиха да измерим въздействието на веществото хитозан върху прикрепянето и образуването на биофилми от включените в изпитването бактерии. Скринингът на инхибиторния ефект на хитозана се осъществи с епруветъчен метод, а резултатите са представени в таблица 2.

При този метод, описан за първи път от Кристенsen (Christensen) и др. [17], получените резултати са качествени и по-субективни, тъй като се преценяват с визуална инспекция. Въпреки това този метод предлага ценни възможности за скрининг на способността на хитозана да инхибира образуването на биофилми от различните видове изпитвани бактерии. Липсата на филм (0) се сравни с отрицателните контролни проби (хранителна среда без инокулация на бактерии), а голямото количество биофилм (+++) се сравни с положителните контролни проби (бактерии без хитозан). Нивата на малко и умерено количество биофилм се възприеха за междинни.

Резултатите показаха, че въздействието на хитозана не следва ясно изразен модел, а резултатите варираха от пълно отсъствие на биофилм до образуване на умерено количество биофилм в зависимост от вида микроорганизъм и ММ. Хотозанът показа слабо инхибиторно въздействие върху образуването на биофилм от P. Intermedia, но се оказа способен изцяло да инхибира формирането на биофилм от P. gingivalis, като не се установи никаква разлика при различната ММ и вариращите концентрации. Този скрининг не позволи формиране на заключение по отношение на останалите бактерии.

Проби в плоча за микротитруване

Тъй като това е метод за количествено изпитване и следователно е по-точен от теста в епруветка, получените чрез него резултати ще хвърлят повече светлина върху въздействието на хитозана върху формирането на биофилми.

Както става ясно от фигура 1, процентът на успеваемост на хитозана при ихнибиране образуването на биофилми е по-голям от 50% за всички изследвани бактерии, като изключение прави единствено разтворът от 0,25 мг/мл хитозан с ВММ, приложен върху T. Forsythensis. Серка (Cerca) и др. [20] съобщават, че се откриват значителни разлики между пробите без подхранване и с подхранване, като щамовете, образуващи по-малко биофилм, са култивирани без подхранване. В нашия случай и двата вида проби имаха конкретна цел: пробите без подхранване се използваха за оценка способността на хитозана да инхибира/спре първоначалното прикрепяне на бактериите, докато пробите с подхранване се използваха за оценка способността на хитозана да инхибира образуването на биофилм при оптимални условия за развитието на такъв и, както се вижда от фигура 1, хитозанът се справя изключително добре.

Таблица 2: Хитозан в концентрация под МИК, тестван за всяка бактерия (мг/мл) и за инхибиращо действие върху формирането на биофилм (епруветка). 0 - липсва; + малко количество; ++ - умерено количество; +++ - голямо количество; C+ - положителна контролна проба.

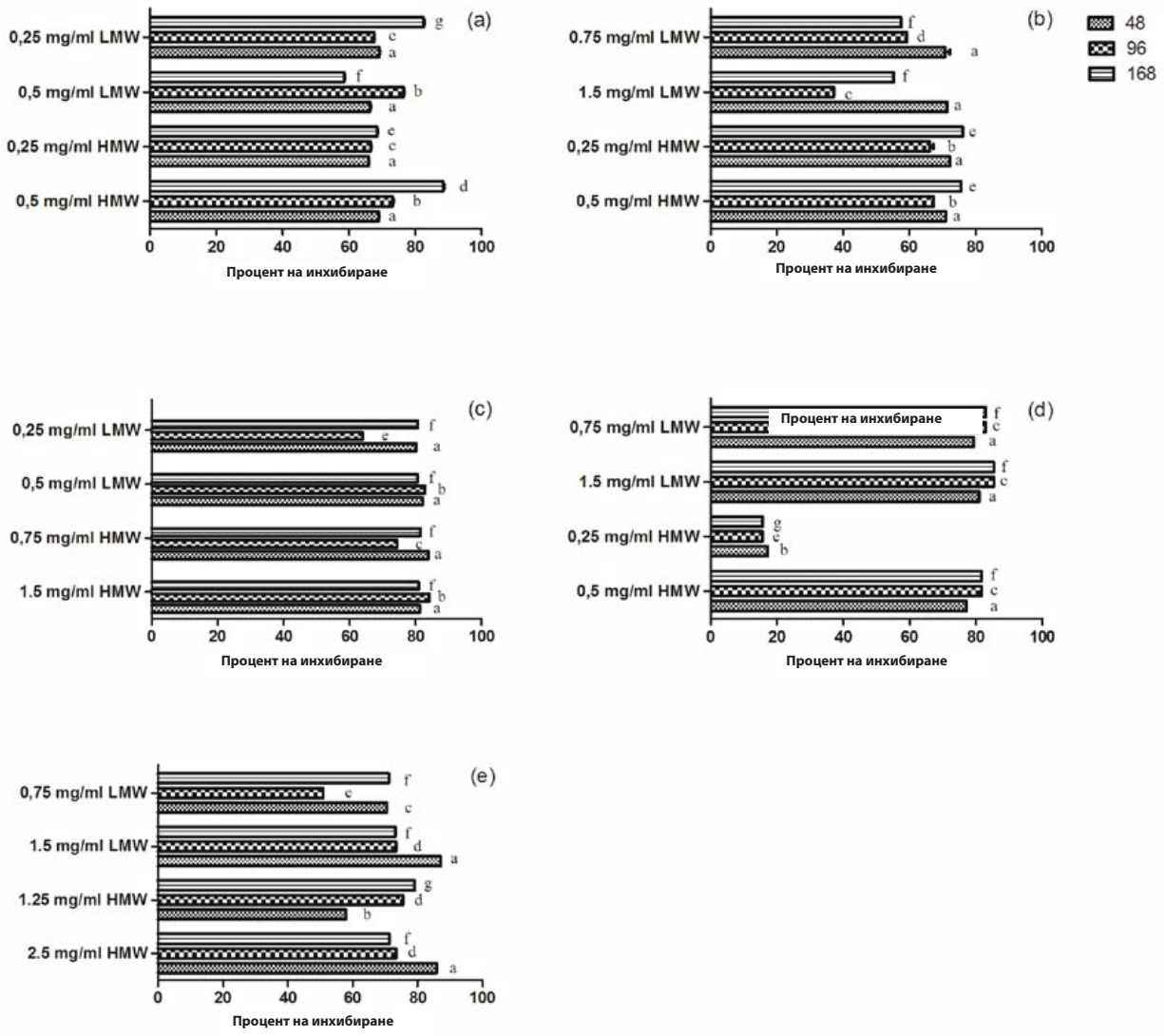
		ВММ		НММ	
	C+	1/2	1/4	1/2	1/4
P. gingivalis	+++	0	0	0	0
T. forsythensis	+++	++	++	0	++
Pr. Buccae	+++	0	+	0	++
A. actinomycetemcomitans	+++	0	0	++	++
Pr. intermedia	+++	++	++	++	++

Анализът на резултатите показва, че при P. Gingivalis (фигура 1(а)) няма разлика в различните ММ и вариращите концентрации в 48-часовата проба (без подхранване), като при всички тествани концентрации се наблюдаваше процент на инхибиране между 65% и 70%. При пробите с подхранване (96-часови и 168-часови) се забеляза ясна разлика при различните ММ и вариращите концентрации, като ясни разлики между различните концентрации с една и съща ММ се забелязаха при 96-часовите проби. По-конкретно, високите концентрации за всяка ММ демонстрираха по-високи проценти на инхибиране. При 96-часовите проби от всички условия на изпитване само разтворът на хитозан от 0,5 мг/мл с НММ демонстрира процент на инхибиране, надхвърлящ 75%. При останалите условия стойностите на инхибиране варираха между 65% и 77%. При разглеждане на резултатите, получени след 168 часа, може да се види, че както ММ, така и концентрацията на хитозан оказват влияние върху получените стойности. От двете тествани ММ хитозанът с ВММ демонстрира най-висок процент на инхибиране (88%) при най-високата използвана концентрация 0,5 мг/мл. От друга страна при хотозана с НММ се забеляза тъкмо обратното поведение – най-ниската тествана концентрация – 0,25 мг/мл демонстрира най-висок процент на инхибиране (82%). От трета страна при P. intermedia (фигура 1(б)) се наблюдаваха проценти на инхибиране над 75% след 168 часа и само при хитозан с ВММ. Като изключим пробите без захранване (48-часови), при всички се наблюдаваха ясни разлики в ММ: хитозанът с ВММ като цяло показа по-високи проценти на инхибиране, а стойностите при разтворите с НММ достигаха едва 37% (96-часови; 0,5 мг/мл).

При Prevotellabuccae (фигура 1(в)) не се забелязаха разлики при различните ММ, а процентите при всички проби надхвърляха 75%, като изключение прави единствено 96-часовата проба със захранване, при която се отбеляза значителен спад в процента на инхибиране при концентрации от 0,75 мг/мл и 0,25 мг/мл съответно с ВММ и НММ. При Tannerelaforsythensis (фигура 1(г)) се забеляза поведение, сходно с това при P. buccae, като всички проби показаха стойности на инхибиране над 75%, а единственото изключение беше разтворът с концентрация 0,25 мг/мл и ВММ, който показа стойности на инхибиране под 20%. При останалите концентрации нямаше значителни разлики във всички тествани проби. При Aggregatibacter actinomycetemcomitans (фигура 1(д)) се наблюдаваха ясни разлики в поведението на различните концентрации с една и съща ММ – при по-високите концентрации процентът на инхибиране беше по-висок при всички проби. Получените след 48 часа резултати показаха, че концентрацията от 2,5 мг/мл с ВММ и концентрацията от 1,5 мг/мл с НММ демонстрират значими в статистическо отношение по-високи ($p < 0,05$) стойности на инхибиране, отколкото останалите тествани условия, като процентът на инхибиране образуването на биофилм надхвърляше 75%. От друга страна при 96-часовата и 168-часовата проба за всички тествани условия се наблюдаваха стойности на инхибиране от приблизително 70%. Единствените изключения се наблюдаваха при разтвора с концентрация на хитозан от 0,75 мг/мл в НММ, който при 96-часовата проба показа значително по-ниска ($p < 0,05$) стойност на инхибиране, и при разтвора с концентрация на хитозан от 1,25 мг/мл с ВММ, който при 168-часовата проба показа значително по-високи стойности ($p < 0,05$) на инхибиране.

На по-ранен етап Карлсън (Carlson) и др. [21] съобщава, че хитозанът може да инхибира прикрепянето на бактерии към обработени с хитозан повърхности до 99%, което е в подкрепа на нашите резултати по отношение способността на веществото да ихнибира прикрепянето и формирането на биофилм от патогенни бактерии в устната кухина.

Copyright:
© 2014 Pintado et al.



Фигура 1: Инхибиращо въздействие на хитозана върху формирането на биофилм при 48-часова проба (без подхранване), при 96-часова и 168-часова проби (с подхранване) в плоча за микротитруване. а) P. gingivalis; б) Pr. intermedia; в) Pr. buccae; г) T. forsythensis; д) A. actinomycetemcomitans; Всички проби са подготвени в три екземпляра.

Биофилми от два вида бактерии

Тъй като коагрегацията на бактерии е ключова стъпка в образуването на биофилм, се използва ин витро модел със S. mutans – микроорганизъм, за който се знае, че играе фундаментална роля в процеса по прикрепяне на вторични колонизиращи бактерии [22, 23], за да се провери по-добре въздействието на хитозана при взаимодействието на P. intermedis и P. gingivalis с този микроорганизъм. Както се вижда от фигура 2, има ясни разлики в поведението между двата вида ММ в зависимост от това коя двойка струпващи се микроорганизми се тества. Докато при взаимодействието на P. intermedia и S. mutans с хитозан с ВММ се наблюдаваха най-високи стойности на инхибиране за двете концентрации под МИК, при двойката P. gingivalis/S. mutans не се забелязват ясни разлики в различните ММ. Ако се погледне по-отблизо, е възможно да се види, че при първата двойка са налице статистически значими ($p < 0,05$) разлики между различните ММ (като хитозанът с ВММ показва стойности с 30% по-високи от този с НММ), а колкото по-висока е концентрацията на хитозан, толкова по-висок е процентът на инхибиране образуването на биофилм. Стойностите на инхибиране на хитозана с ВММ бяха около 70% - 80% за двете тествани концентрации, докато стойностите на хитозана с НММ бяха около 30% - 45%. От друга страна при взаимодействието на P. gingivalis и S. mutans с хитозан, въпреки липсата на статистически значими ($p > 0,05$) разлики в действието на различните ММ, се забеляза статистически значима разлика ($p < 0.05$) при хитозан с ВММ и с концентрация 0,25 мг/мл, при който стойностите на инхибиране бяха по-ниски от тези на останалите концентрации. В тази проба всички стойности на инхибиране бяха над 50% за всички концентрации на хитозан, като 55% беше най-ниската наблюдавана стойност (0,25 мг/мл при ВММ), а 69,9% беше най-високата (0,5 мг/мл при ВММ).

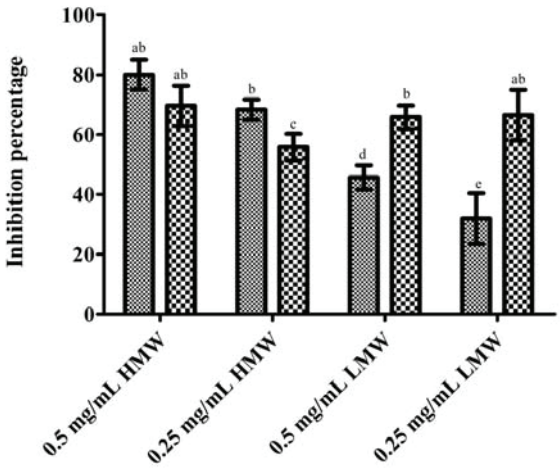
Интересно е да се отбележи, че макар да се очакваше хитозанът с ЛММ да демонстрира най-голяма активност срещу процеси на коагрегация (описано е по-добро въздействие на хитозан с ЛММ срещу грам-отрицателни бактерии) [11], установихме смесено поведение, като хитозанът с ВММ беше по-ефективен при наличие на P. intermedia, докато при тестване на P. gingivalis не се забелязаха разлики. Резултатите са в съзвучие с тези от предходни изследвания [10], които сочат, че при хитозан с ВММ концентрацията е ключов фактор за действието му при формирането на полимикробен биофилм, както и че хитозанът с ВММ е по-добра алтернатива срещу коагрегация, тъй като действа еднакво добре срещу биофилми, съставени само от грам-положителни бактерии, и филми от смесени грам-отрицателни бактерии.

Въпреки липсата на изследвания за ефекта на хитозана върху коагрегацията, нашите резултати сочат, че той въздейства върху струпващите се бактерии и предотвратява образуването на полимикробен биофилм.

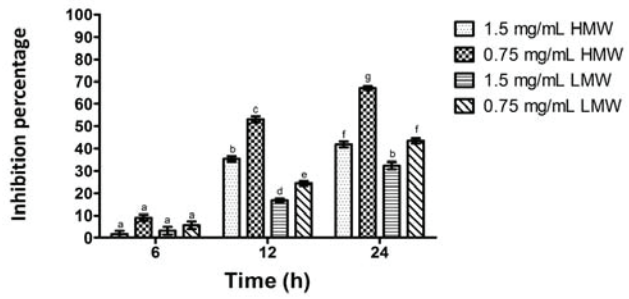
Copyright:
© 2014 Pintado et al.

Инхибиране на кворумна сигнализация

Способността на хитозана да инхибира кворумната сигнализация, в конкретния случай чрез инхибиране на N-ацил-хомосерил лактоните – най-често срещаният агент за автоиндукция на кворумна сигнализация при грам-отрицателни бактерии, се оцени с помощта на биосензора C. violaceum. В сравнение в контролните проби, тестваните ММ на хитозана демонстрираха значителен ($p < 0.005$) спад в продуцирането на виолацеин от C. violaceum и при двете концентрации под МИК (не са представени данни от проби с МИК) (фигура 3). Способността на хитозана да инхибира кворумната сигнализация изглежда зависи от концентрацията, тъй като най-ниските концентрации и за двата вида ММ показаха статистически значими ($p < 0,05$) по-високи стойности на инхибиране, но зависи и от ММ, тъй като хитозанът с ВММ показа значително по-високи стойности на инхибиране. Важно е да се отбележи, че действието на хитозана нарастваше с времето след добавянето му в пробите, като след 24-часова експозиция стойностите на инхибиране на кворумната сигнализация достигнаха 67% за ВММ и 43% за НММ. Като се имат предвид познатите свойства на хитозана, за получените резултати има няколко възможни обяснения. Както съобщават няколко автора [9, 12, 24], действието на хитозана с ВММ е насочено към бактериалната мембрана и е възможно това смущение да има общо с метаболизма за продуциране на C. Violaceumviolacein. Когато разглеждат хитозан с НММ, същите автори отбелязват, че той е способен да навлезе в клетките на бактериите, където си взаимодейства с клетъчния механизъм. Ето защо е възможно хитозанът с НММ да се намесва в метаболитния синтез на виолацеин, вероятно чрез взаимодействие с метаболитния предшественик на виолацеина – продеоксивиолацеин, чийто синтез включва оксидативна стъпка с четири електрона [25].



Фигура 2: Действие на концентрации на хитозан под МИК върху формирането на биофилми от два вида бактерии. ▒ – S. mutans и P. intermedia; ▓ – S. mutans и P. gingivalis
Различните букви означават установените статистически разлики.



Фигура 3: Действие на концентрации на хитозан под МИК върху продуцирането на виолацеин от C. violaceum. Различните букви означават установените статистически разлики.

Заключения

Хитозанът демонстрира силно действие срещу пародонтални патогенни бактерии, инхибирайки образуването на биофилми, като действието се засича дори след 168 часа, и срещу биофилми от два вида бактерии, което сочи, че хитозанът може да повлияе на коагрегацията на бактерии. Освен това хитозанът успя да инхибира продуцирането на виолацеин от C. violaceum – познат механизъм за кворумна сигнализация – и по този начин показа потенциал да попречи на образуването на биофилм, като инхибира кворумната сигнализация.

Макар да са обещаващи, тези резултати се нуждаят от допълнителни изследвания, за да се разбере по-добре действието на хитозана върху формирането на биофилми от патогенни бактерии в устната кухина. Влиянието на обстоятелства като потока на слюноотделяне и наличието на биотични или абиотични фактори върху действието на хитозана трябва тепърва да се провери, тъй като те може да попречат на действието му върху биофилмите. При все това, получените в това изследване резултати подчертават потенциала на хитозана като естествена алтернатива за контрол образуването на дентален биофилм и лечение на заболявания на устната кухина, както и като потенциално активно вещество, което в бъдеще да се влага в препарати за поддръжка на устната кухина.

Благодарности

Авторът изказва искрени благодарности на Агенцията по иновации (Agencia de Inovacio, ADI, Португалия) и Quadro de Referencia Estrategico Nacional (QREN, Португалия), защото чрез проекта „QUITORAL - Desenvolvimento de novasformulacoes de quitosanos com aplicacaoemmedicina oral" (QREN-ADI 3474) от националните фондове от FCT - Fundacao para a Ciencia e a Tecnologia и чрез проекта PEst-OE/EQB/LA0016/2011 се осигури финансиране за реализацията на настоящата работа.

Copyright:
© 2014 Pintado et al.

Използвана литература

1. An YH, Friedman RJ (2010) Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications. Humana Press, Totowa, United States.
2. Shams TK, Maqusood A, Abdulaziz AK, Javed M (2013) Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. Materials Letters 97: 67-70.
3. Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage TO, Baum A, Chromik JN, et al. (2012) Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. Dent Mater 28(9): 974-984.
4. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, et al. (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontol 2000 42: 47-79.
5. Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ (2008) Prescott, Harley, and Klein's microbiology. McGraw-Hill Higher Education, United Kingdom.
6. Schwach AK, Vivien CN, Gurny R (2000) Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. Eur J Pharm Biopharm 50(1): 83-99.
7. Mims CA (2004) Medical microbiology. (3rd edn), Mosby, United States.
8. Busscher HJ, Engels E, Dijkstra RJ, van der Mei HC (2008) Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. Eur J Oral Sci 116(5): 493-495.
9. Costa EM, Silva S, Pina C, Tavaria FK, Pintado MM (2012) Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. Anaerobe 18(3): 305-309.
10. Costa EM, Silva S, Tavaria FK, Pintado MM (2013) Study of the effects of chitosan upon Streptococcus mutans adherence and biofilm formation. Anaerobe 20: 27-31.
11. Fernandes JC, Eaton P, Gomes AM, Pintado ME, Xavier Malcata F (2009) Study of the antibacterial effects of chitosans on Bacillus cereus (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. Ultramicroscopy 109(8): 854-860.
12. Raafat D, HG Sahl (2009) Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. Microb Biotechnol 2(2): 186-201.
13. Kockisch S, Rees GD, Tsibouklis J, Smart JD (2005) Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. Eur J Pharm Biopharm 59(1): 207-216.
14. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, et al. (2001) In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against Actinobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans. Int J Antimicrob Agents 18(6): 553-557.
15. Bae K, Jun EJ, Lee SM, Paik DI, Kim JB (2006) Effect of water-soluble reduced chitosan on Streptococcus mutans, plaque regrowth and biofilm vitality. Clin Oral Investig 10(2): 102-107.
16. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Ishizaki H, Yanagiguchi K (2007) Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. J Dent 35(11): 871-874.
17. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH (1982) Adherence of Slime-Producing Strains of Staphylococcus epidermidis to Smooth Surfaces. Infect Immun 37(1): 318-326.
18. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic VM (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 40(2): 175-179.
19. Pitlovanciv AK, Caris ME, Porto LM, Pedrosa RC, Antonio RV (2006) Condicoes de cultivo e producao de pigmentos por Chromobacterium violaceum. Biotemas 19(1): 13-18.
20. Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J (2004) Influence of batch or fed-batch growth on Staphylococcus epidermidis biofilm formation. Lett Appl Microbiol 39(5): 420-424.
21. Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS (2008) Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. J Biomater Sci Polym Ed 19(8): 1035-1046.
22. Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate RA, Jiang LM, van der Sluis LW, et al. (2009) Influence of Streptococcus mutans on Enterococcus faecalis Biofilm Formation. J Endod 35(9): 1249-1252.
23. Jiang LM, Hoogenkamp MA, van der Sluis LW, Wesselink PR, Crielaard W, et al. (2011) Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. J Endod 37(1): 31-35.
24. Fernandes JC, Tavaria FK, Soares JC, Ramos OS, Joao MM, et al. (2008) Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon Staphylococcus aureus and Escherichia coli, in food model systems. Food Microbiol 25(7): 922-928.
25. Balibar CJ, Walsh CT (2006) In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA–E from Chromobacterium violaceum. Biochemistry 45(51): 15444-15457.

Оригиналната статия на английски език можете да получите от екипа на „Лаб Технолоджи" ООД, както в офиса на хартиен носител, така и по електронна поща.

При цитиране, посочвайте: Costa EM, Silva S, Pina C, Tavaria FK, Pintado M (2014) Antimicrobial Effect of Chitosan against Periodontal Pathogens Biofilms. SOJ Microbiol Infect Dis 2(1): 1-6. DOI: http://dx.doi.org/10.15226/sojmid.2014.00114