

بررسی غیرفعالسازی فتوداینامیکی باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 با استفاده از لیزر نئودیموم یاگ پیوسته کمتوان و نانوذرات طلا

خلاصه

حسن کریمی نژاد^۱
نازنین صفر نژاد^۱
حسین امانی^۲

مقدمه: امروزه، باتوجه به مقاوم شدن باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از روش‌های جایگزین همچون غیرفعالسازی نور گرمایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از سویی دیگر به دلیل شدت بالای نور، اثرات گرمایی به بافت‌های سالم مجاور نیز نمود می‌نماید و این موضوع به عنوان یکی از محدودیت‌های روش غیرفعالسازی نور گرمایی به شمار می‌آید. در این مقاله تأثیر پرتوهای هارمونیک دوم یک لیزر پیوسته Nd:YAG در شدت پایین 40 mW/cm^2 به همراه نانوذرات طلا بر نابودی میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این پژوهش نقش غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا با ابعاد 90 nm و پرتوهای همدوس هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG در شدت 40 mW/cm^2 بر بقاء باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 مورد بررسی قرار گرفت. در پایان، تأثیر همزمان به کارگیری از این باریکه لیزر در بازه‌های زمانی متفاوت در حضور نانوذرات طلا در غلظت غیرسمی بر بقاء باکتری تحقیق شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق بیانگر آن است که این نانوذرات در کلیه غلظت‌های بالاتر از $0.5 \mu\text{g/ml}$ اثرات سمی بر جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 نشان می‌دهند. همچنین نتایج پرتودهی بر این باکتری بیانگر آن است که بیشترین تأثیر نور در بازه زمانی 60 s دقیقه همراه با یک کاهش جمعیت به میزان $0.15 \log$ رخ داده است. نتایج غیرفعالسازی باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 از طریق به کارگیری همزمان لیزر Nd:YAG و نانوذرات طلای 90 nm نانومتر در غلظت $0.5 \mu\text{g/ml}$ نشانگر نابودی باکتری به میزان $2.43 \log_{10}$ در پرتودهی به مدت 60 s دقیقه می‌باشد. در ادامه، سازوکارهای دخیل در حصول این نتایج مورد تحلیل قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مقاله نشانگر آن است که بهره‌گیری همزمان از چشمه نور لیزر Nd:YAG در شدت پایین و در طول موج 532 nm نانومتر و نانوذرات طلا بدون اعمال اثرات گرمایی محسوس بر کل ساختار بیولوژیک، منجر به نابودی چشمگیر میکروارگانیسم هدف خواهد شد. این راهکار نویدبخش دستیابی به یک شیوه نوری جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها با حداقل آسیب به بافت سالم مجاور خواهد بود. نتایج این مقاله می‌تواند مقدمه‌ای برای پژوهش‌های آتی در جهت نابودی باکتری‌های مقاوم به دارو پاتوژن باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات طلا، غیرفعالسازی فتوداینامیکی، باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276، لیزر پیوسته Nd:YAG، اکسیژن یکتایی

۱. دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیک، بابل، ایران
۲. دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، بابل، ایران

نویسنده مسئول: حسن کریمی نژاد، تلفن: ۰۹۱۱۹۴۸۰۴۳۲
پست الکترونیک: kariminezhad@nit.ac.ir

مقدمه

آنتی‌بیوتیک به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین کشف‌های تاریخ پزشکی باعث نجات جان میلیون‌ها انسان شده است. این روزها آنتی‌بیوتیک به‌دلیل مصرف بی‌رویه و تجویزهای نادرست در بسیاری از موارد بی‌تأثیر است [۱]. باکتری‌ها به‌علت تغییرات کروموزومی و جهش ژنتیکی ناشی از پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند [۳ و ۲]. متأسفانه ایران یکی از کشورهایی است که با مصرف بیش از اندازه این داروها روبه‌رو است و مصرف آنتی‌بیوتیک در این کشور تقریباً برابر با کل مصرف آن در اروپاست. طبق گزارش‌های علمی، مصرف آنتی‌بیوتیک در ایران ۱۶ برابر استاندارد جهانی است [۴-۶]. با ظهور و افزایش باکتری‌های مقاوم به دارو هر ساله عفونت‌های ناشی از آن باعث افزایش مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه می‌شود [۷]. بنابراین نیاز فوری به توسعه روش‌های جدید برای رسیدگی به این مشکل وجود دارد. یکی از روش‌های امیدوارکننده برای از بین بردن باکتری‌ها به‌کارگیری از غیرفعالسازی نور گرمایی^۱ با استفاده از نانو ساختارها می‌باشد [۸]. در غیرفعالسازی نور گرمایی با استفاده از گرمای حاصل از جذب پرتوهای نور توسط نانو ساختارها نابودی میکروارگانیسم رخ خواهد داد [۹]. در میان انواع مختلف نانو ساختارها نانوذرات طلا نتایج امیدوارکننده‌تری به‌منظور غیرفعالسازی نور گرمایی بر روی باکتری‌های پاتوژن نشان داده‌اند [۱۰]. نانوذرات طلا به‌دلیل داشتن حداقل سمیت در برنامه‌های کاربردی بیولوژیکی مانند دارورسانی و به‌علت جذب بالا و رزونانس پلاسمون سطحی برای درمان‌های نور گرمایی استفاده شده‌اند [۱۱]. از جمله خواص منحصربه‌فرد نانوذرات طلا، رزونانس پلاسمون سطحی آن‌ها در ناحیه ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر است. علاوه بر این، برخی از نانو ساختارهای طلا همچون نانومیله‌ها و نانوقفس‌ها به‌دلیل دارا بودن رزونانس پلاسمون سطحی در ناحیه فروسرخ نزدیک عمق نفوذ بیشتری در بافت بدن دارند. سایمون دیکر و همکاران^۲ با استفاده از نانوذرات طلا همراه با تابش اشعه X نتایج مثبتی در نابودی باکتری اشیریشیاکلی به‌دست آوردند [۱۲]. گرچه ژارو و همکاران^۳ با استفاده از لیزر پالسی YAG:Nd استراتژی جدیدی در درمان عفونت‌های ناشی از انواع باکتری‌ها ارائه دادند اما، با وجود نتایج مفید به‌دست آمده تحقیق آن‌ها با برخی معایب ناشی از توان بالای پرتوی لیزر همراه بود [۸]. به‌کارگیری از پرتوهای پرتوان به‌طور بالقوه آسیب سلولی موضعی بیشتری به بافت‌های سالم وارد می‌کند. لذا، این تحقیق تلاش می‌کند از پرتوهای یک لیزر کم‌توان به‌منظور غیرفعالسازی باکتری‌های مقاوم به دارو بهره گیرد. نتایج این مقاله می‌تواند مقدمه‌ای برای پژوهش‌های آتی در جهت نابودی سایر باکتری‌های پاتوژن مقاوم به دارو باشد.

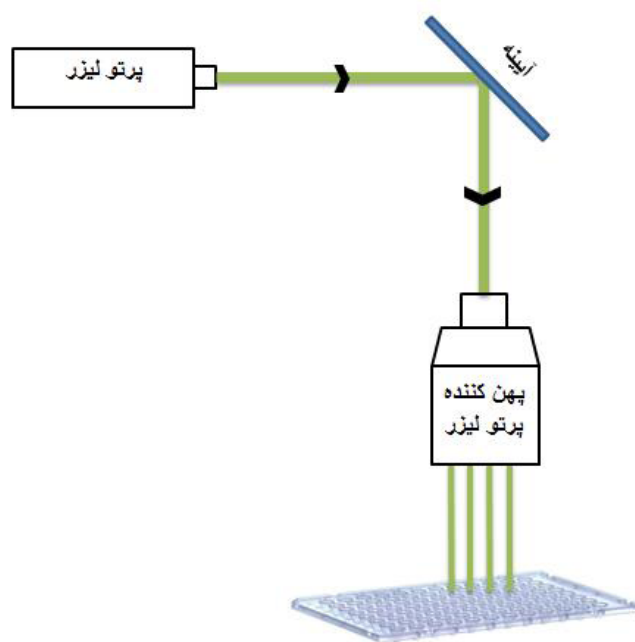
روش بررسی

نانوذرات طلا و منبع نور

نانوذرات طلا از شرکت پیام‌آوران نانوفناوری فردانگر تهیه شدند. غلظت‌های مختلف از نانوذرة طلا با رقیق کردن غلظت اولیه (1000ppm) از نانوذرة طلا به‌وسیله آب دیونیزه به‌دست می‌آید. طیف جذب نانوذرة طلا از طریق دستگاه اسپکتوفتومتر فرابنفش- مرئی (Spekol 2000, Analyticjena CO) به‌دست آمد. علاوه بر این از میکروسکوپ نیروی اتمی (Nanosurf AFM) برای تعیین شکل و توزیع اندازه نانوذرات استفاده شد. همچنین از هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG که تابشی در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد، به‌عنوان منبع تابش‌دهی استفاده گردید. به‌منظور تولید توزیع یکنواخت شدت 40 mW/cm^2 روی چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه از یک پهن‌کننده باریکه استفاده گردید. در شکل ۱ طرح شماتیک چیدمان مورد استفاده نشان داده شده است.

کشت باکتری

باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. باکتری در ۲۰ میلی لیتر محیط مایع نوترینت براث کشت و به مدت ۱۸ ساعت در شیکر انکوباتور (FF-81، شرکت پارس آزما) در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دور ۲۰۰ rpm نگه داشته شد. پس از آن باکتری کشت داده‌شده را با دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه



شکل ۱: طرح شماتیک سیستم مورد استفاده به‌منظور غیرفعالسازی باکتری اشیریشیا کلی PTCC ۱۲۷۶

حجم برابر از محلول سرم فیزیولوژی مخلوط می‌شود و سپس آن را به چاهک‌هایی از پلیت ۹۶ خانه استریل تزریق نمودیم. پس از آن نمونه‌ها در بازه‌های زمانی مختلف ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه تحت تابش پرتوهای لیزر Nd:YAG با شدت 40 mW/cm^2 قرار گرفت. پس از رقیق‌سازی سریالی و پس از ۲۴ ساعت نگهداری نمونه‌های کشت داده‌شده بر محیط آگار تعداد کلونی‌های باکتری شمارش شد.

گروه درمان فتوداینامیکی

محلول حاوی سوسپانسیون باکتری و غلظت غیررسمی نانوذره طلا تحت تابش پرتوی لیزر قرار گرفت. برای این منظور، باکتری کشت داده‌شده را با حجم برابر از غلظت غیررسمی نانوذره طلا مخلوط نمودیم. پس از آن، محلول به دست آمده به مدت یک ساعت در انکوباتور تاریک نگهداری شد و سپس در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه استریل تزریق گردید. نمونه‌ها در مدت زمان‌های مختلف ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه تحت تابش پرتوی لیزر Nd:YAG با طول موج ۵۳۲ نانومتر و شدت 40 mW/cm^2 قرار گرفت. سپس رقیق‌سازی سریالی صورت پذیرفت و شمارش کلونی‌ها پس از ۲۴ ساعت انجام شد.

یافته‌ها و بحث

طیف جذب UV-Visible نانوذره طلا

شکل ۲ طیف جذب UV-Visible نانوذرات طلای مورد استفاده در این پژوهش در محدوده ۸۰۰-۳۰۰ نانومتر را نشان می‌دهد. همان‌طور که از این شکل مشاهده می‌شود، این ساختار دارای یک باند جذب قوی در ناحیه ۷۷۰-۴۱۰ نانومتر و قله جذبی در طول موج ۵۸۵ نانومتر می‌باشد که این باند جذب قوی به دلیل رخداد پدیده رزونانس پلاسمون سطحی

سانتریفوژ نمودیم و سوپرناتانت را توسط پیپت برداشتیم و باکتری‌های باقی‌مانده را در محلول سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون درآوردیم و با دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمودیم. سوپرناتانت توسط پیپت برداشته شد و ذرات باقی‌مانده در محلول سرم فیزیولوژیکی مخلوط گردید. سوسپانسیون حاصل را برای رسیدن به رقت نیم مک‌فارلند در سرم فیزیولوژی رقیق می‌کنیم و به عنوان سوسپانسیون مرجع تلقی می‌کنیم. برای بررسی اثرات نور و/یا نانوذره طلا چهار گروه را معرفی می‌کنیم. کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید و نتایج از منظر آماری مورد تحلیل قرار گرفت.

گروه کنترل اصلی

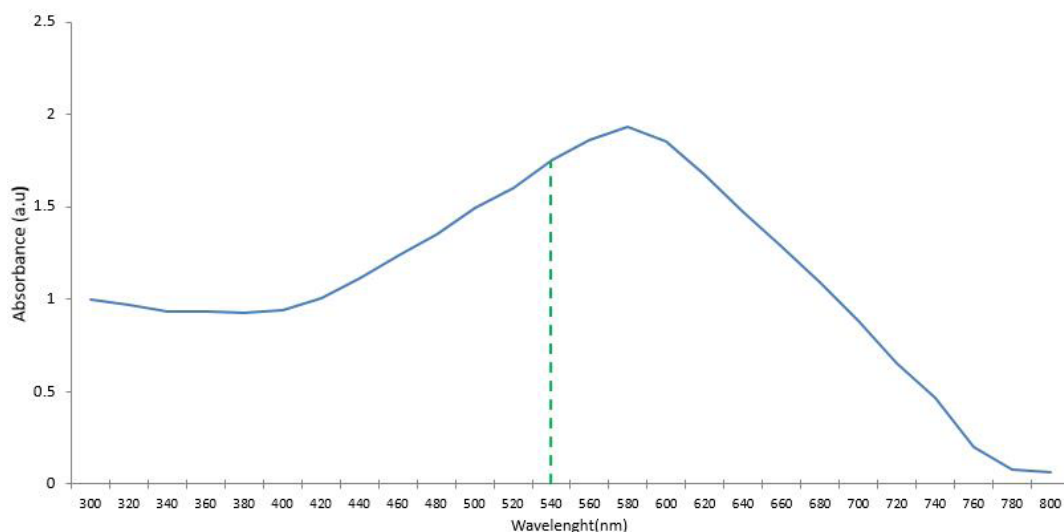
باکتری اشیریشیاکلی PTCC 1276 با حجم مساوی از محلول سرم فیزیولوژی مخلوط شد. سپس به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک نگه داشته شد. پس از آن، محلول حاصل را رقیق‌سازی سریالی کردیم و در محیط جامد آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در پایان، جمعیت باکتری‌های گروه کنترل شمارش گردید.

گروه کنترل دارو

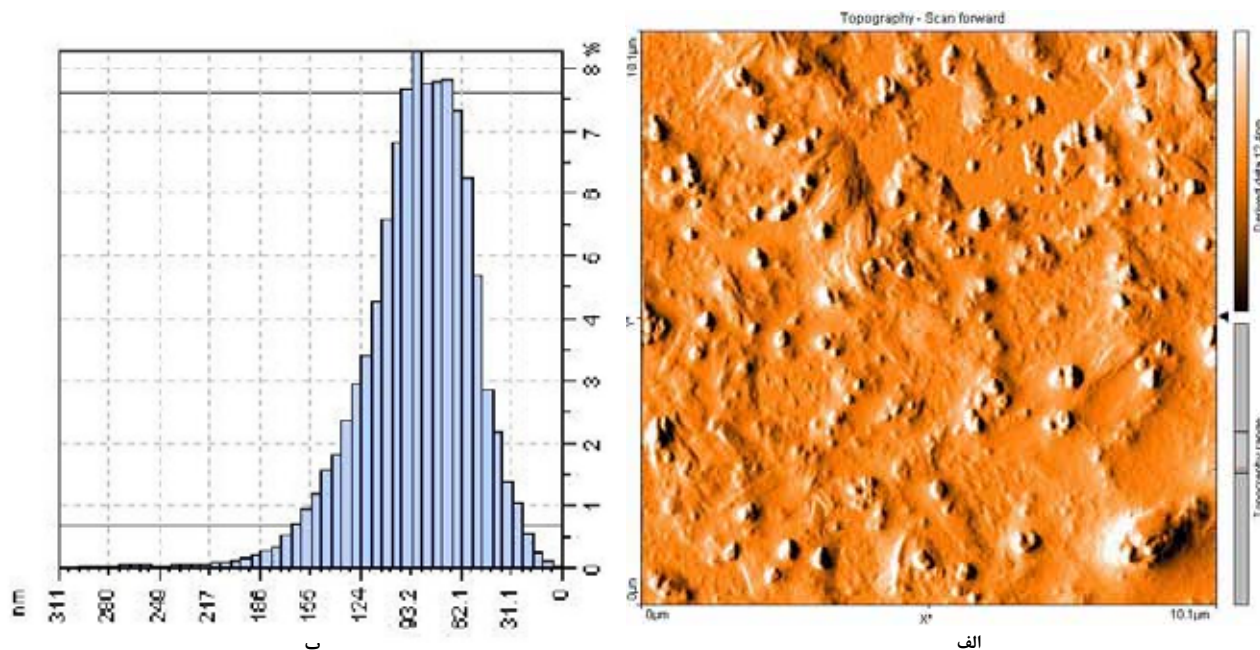
نانوذره طلا را به غلظت‌های 0.5, 1, 5, 10 و 50 رساندیم و با حجم برابر از باکتری مرجع اضافه شد. محلول‌های حاصل را در شیکر انکوباتور تاریک در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت و در دور ۲۰۰ rpm نگهداری نمودیم. پس از آن، تعداد کلونی‌ها از طریق رقیق‌سازی سریالی محاسبه گردید.

گروه کنترل نور

به منظور مطالعه اثر نور لیزر بر میزان بقای باکتری، باکتری مرجع را با



شکل ۲: طیف جذب UV-Visible نانوذره طلا در بازه ۸۰۰-۳۰۰ نانومتر به همراه طول موج گسیلی هارمونیک دوم لیزر Nd-YAG.



شکل ۳: الف) تصویر AFM از نانوذرات طلا (ب) نمودار توزیع اندازه نانوذرات طلا

و تخریب سیتوپلاسم می‌گردد، توجیه می‌شود [۱۸]. باوجود غیرتجمعی بودن نانوذرات سنتز شده اثر مهارشدگی مؤثری بر باکتری مشاهده نشد که نشانگر آن است که نانوذرات طلا خواص آنتی‌باکتریال ضعیفی بر این باکتری دارند. به‌منظور استفاده از نانوذرات طلا در فرآیند درمان از غلظت $0.5\mu\text{g/ml}$ نانوذره طلا اثر کمترین سمیت بر جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 دارد بهره بردیم.

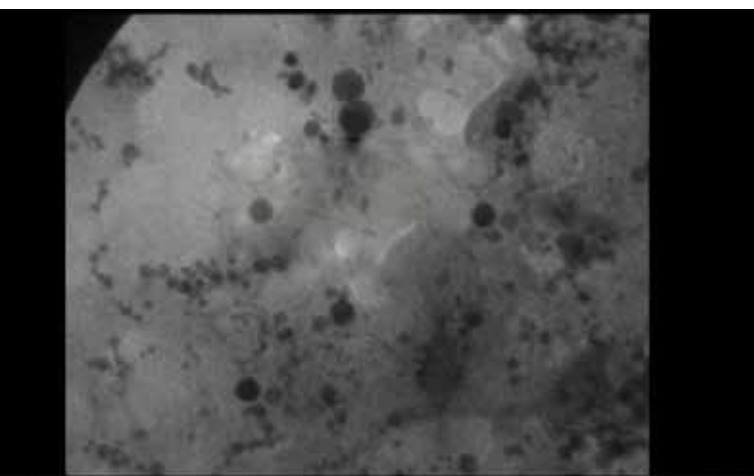
بررسی اثر تابش پرتوهای توان پایین لیزر Nd:YAG بر جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276

جدول ۲ تاثیر تابش پرتوهای لیزر نئودیمیوم یاگ با طول موج ۵۳۲

نانوذره طلا می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، خط گسیلی لیزر Nd:YAG در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارای پتانسیل بالا در برانگیختگی نانوذره طلا می‌باشد. پیش‌بینی می‌شود که انتقال انرژی فوتون به نانوذرات طلا موجب افزایش دمای آن و القای اثرات دمایی به ساختار بیولوژیک گردد. همچنین شکل ۳-الف تصویر میکروسکوپ انرژی اتمی (AFM) از نانوذرات طلا و شکل ۳-ب نمودار توزیع اندازه نانوذره طلا را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، ذرات تشکیل‌دهنده در گسترده ابعاد در حدود ۵-۲۰۰ نانومتر توزیع شده‌اند. در این بین، بیشترین توزیع متعلق به نانوذرات با ابعاد ۹۰ نانومتر می‌باشد. در تأیید نتایج AFM شکل ۴، تصویر TEM نانوذرات طلای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

بررسی اثر سمیت نانوذرات طلا بر روی باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276

جدول ۱ اثر خواص آنتی‌باکتریال نانوذرات طلا در غلظت‌های ۵، ۱۰، $0.5\mu\text{g/ml}$ و $50\mu\text{g/ml}$ بر روی باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذرات طلا جمعیت باکتری کاهش یافته است. به‌طوری‌که در غلظت $0.5\mu\text{g/ml}$ کمترین اثر مهار شدگی به مقدار $0.09\log$ و در غلظت $50\mu\text{g/ml}$ بیشترین اثر مهارشدگی به مقدار $0.36\log$ مشاهده شد. بنابراین گرچه استفاده از این نانوذرات طلا همراه با القای اثر سمیت بر باکتری مورد نظر می‌باشد، ولی این اثر در غیرفعالسازی این باکتری چشمگیر نبوده است. این نتیجه براساس غیرتجمعی بودن نانوذرات طلا به کاررفته است که موجب نفوذ بالای آن در دیواره سلولی که خارجی‌ترین قسمت باکتری



شکل ۴: تصویر TEM از نانوذرات طلای به کار گرفته شده

در طول موج ۵۳۲ نانومتر بر جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 در حضور نانوذره طلا با غلظت 0.5 μg/ml در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰ دقیقه را نشان می‌دهد. مطابق نتایج آزمایش‌های ما جمعیت باکتری طی ۱۵ دقیقه تابش‌دهی در حضور نانوذره طلا با 2.052 log کاهش در تعداد باکتری مواجه شد. این کاهش لگاریتمی جمعیت باکتری به واسطه تابش‌دهی توسط لیزر و در حضور نانوذره طلا با بیشینه توزیع ذرات با ابعاد ۹۰ نانومتر برای مدت‌زمان‌های تابش‌دهی ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب به مقدار 2.24 log و 2.43 log افزایش یافت. با مراجعه به این جدول نتایج حاصل از به‌کارگیری همزمان از دو پارامتر تابش پرتوهای لیزر و نانوذرات طلا منجر به نابودی بیش از ۹۹/۹ درصد جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 طی ۶۰ دقیقه تابش‌دهی شده است.

مطابق شکل ۶ نمودار ستونی به‌منظور ارائه مقایسه‌ای از نقش نانوذرات طلا در حضور و یا عدم حضور پرتوهای همدوس لیزر Nd:YAG موج پیوسته نشان داده شده است. تأثیر چشمگیر به‌کارگیری همزمان نانوذرات طلا و پرتوهای همدوس هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG بر جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 را می‌توان برپایه اثرات ناشی از جذب پرتوهای لیزر توسط نانوذرات طلا و ماکرومولکول‌ها و پروتئین‌های آن میکروارگانیسم توجیه نمود. برطبق مشاهدات ما افزایش دمای حاصل در گروه درمان فتودینامیکی طی ۶۰ دقیقه تابش‌دهی در حدود ۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. باتوجه به دمای اولیه محلول که حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده است، این میزان به‌طور مستقیم نمی‌تواند منجر به نابودی میکروارگانیسم هدف گردد. دلیل این ادعا آن است که ایجاد شرایط هایپرترمیا در نابودی میکروارگانیسم نیازمند رسیدن به دمای حدود ۴۲-۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. لذا، گرچه اثرات ماکروسکوپی گرمایی القاء شده توسط ترکیب باریکه لیزر سبز و نانوذرات طلا جاذب

جدول ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا بر جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC ۱۲۷۶

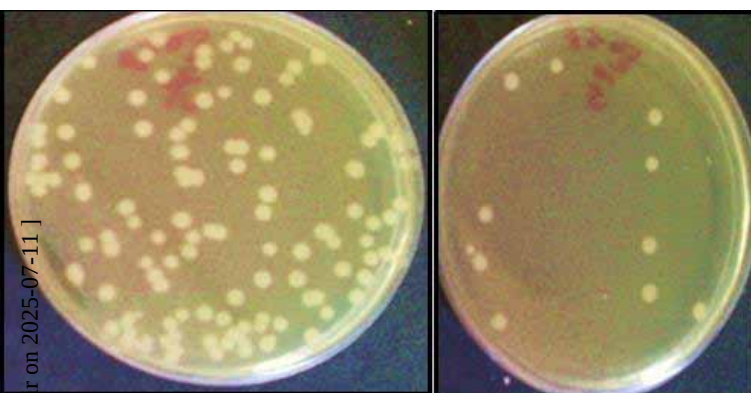
غلظت نانوذره طلا (μg/ml)	میانگین تعداد باکتری‌ها CFU / ml × 10 ⁶	انحراف استاندارد
نمونه اصلی باکتری	۹/۳۳	۰/۳
۰/۵	۹/۱۱	۰/۳
۱	۸/۶۵	۰/۳
۵	۷/۹۵	۰/۳
۱۰	۷/۱۶۱	۰/۳۳
۵۰	۶/۸۸	۰/۳

نانومتر در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بر جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 را نشان می‌دهد. مطابق این جدول طی مدت زمان ۱۵ دقیقه جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 به مقدار 0/04 log کاهش یافت و این کاهش با افزایش زمان تا ۶۰ دقیقه روند افزایشی نشان می‌دهد. به‌طوری‌که در زمان ۶۰ دقیقه جمعیت به میزان 0/15 log کاهش یافت. کاهش ۳۰ درصد جمعیت باکتری تأثیر چندانی بر غیرفعالسازی باکتری به‌شمار نمی‌رود. بنابراین طبق نتایج آزمایش‌های ما در غیاب نانوذرات طلا، تابش پرتو تأثیر چندانی در نابودی باکتری نشان نمی‌دهد. در توجیه نابودی بخشی از جمعیت باکتری اشیریشیا کلی PTCC 1276 تحت تابش پرتوهای همدوس لیزر Nd:YAG در طول موج ۵۳۲ نانومتر و در شدت 40 mW/cm² می‌توان به استدلال اشاره شده توسط هانگ و همکاران^۴ استناد نمود [۶]. آن‌ها نشان دادند که تابش پرتوهای لیزر در طول موج کمتر از ۶۰۰ نانومتر توسط ماکرومولکول‌ها و پروتئین‌ها جذب می‌گردد و طی واکنش‌های فتوشیمیایی موجب تغییر در موازنه آنزیمی باکتری می‌گردد. این عدم تعادل شیمیایی نهایتاً منجر به مرگ باکتری خواهد شد.

شکل ۵ مقایسه‌ای از جمعیت کلونی‌های رشد داده‌شده با رقت یکسان بین گروه کنترل اصلی و گروه درمان فتودینامیکی را نشان می‌دهد. به‌وضوح تأثیر چشمگیر به‌کارگیری پرتوهای لیزر پیوسته در طول موج ۵۳۲ نانومتر به‌همراه نانوذرات طلا در کاهش جمعیت این باکتری مشاهده می‌شود. جدول ۳ نتایج تأثیر پرتوهای همدوس لیزر Nd:YAG

جدول ۲: تأثیر پرتوهای همدوس لیزر Nd:YAG بر باکتری اشیریشیا کلی PTCC ۱۲۷۶ در زمان‌های مختلف

مدت زمان پرتودهی (min)	میانگین تعداد باکتری‌ها CFU / ml × 10 ⁷	log ₁₀ (No/N)	انحراف استاندارد log ₁₀ (No/N)
نمونه اصلی باکتری	۳/۸۳	-	-
۱۵	۳/۴۳	۰/۰۴	۰/۰۳
۳۰	۲/۹۲۶	۰/۱۲	۰/۰۴
۶۰	۲/۶۸	۰/۱۵	۰/۰۳



(الف)

(ب)

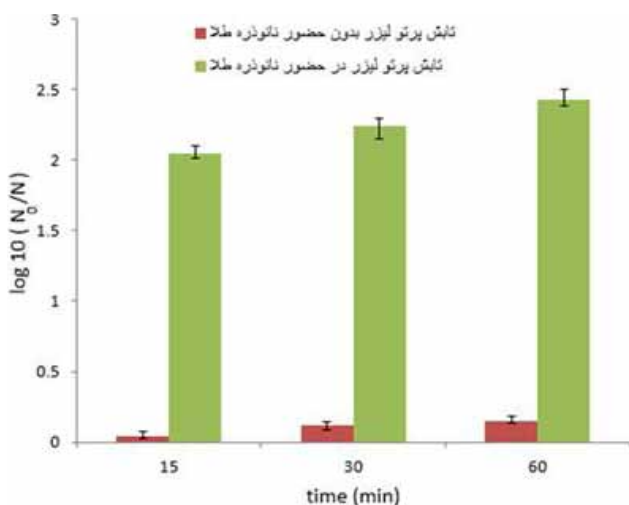
شکل ۵: (الف) نمونه باکتری گروه کنترل اصلی (ب) نمونه باکتری بر اثر تابش پرتوی لیزر در حضور نانوذره طلا.

ماکروسکوپیک اندک حاصل از ترکیب مناسب باریکه لیزر و نانوذرات طلا نتایج این مقاله را می توان زمینه ای برای روش های هوشمند درمان های عاری از آنتی بیوتیک با حداقل آسیب به بافت های سالم مجاور دانست.

باید توجه نمود که بدن به خودی خود نمی تواند رادیکال آزاد تولید نماید. تولید این رادیکال ها فقط از طریق فرآیندهای فتوشیمیایی صورت می گیرد. همچنین فرآیندهای فتوشیمیایی نیز نیازمند حضور منبع نور می باشد. درواقع، ماکرومولکول ها تحت تابش نور خورشید و در حضور اکسیژن می توانند طی واکنش های فتوشیمیایی تولید رادیکال آزاد نمایند. اما این رادیکال های تولید شده در بدن توسط مواد آنتی اکسیدانی مانند ملاتین، کاروتن ها و... حذف می شوند [۱۶ و ۱۷]. به هر حال با توجه به آن که آزمایش های صورت پذیرفته در شرایط برون تنی می باشد، انجام آزمایش های مشابه در شرایط درون تنی نیز حائز اهمیت خواهد بود.

نتیجه گیری

در این مقاله توانمندی لیزر Nd:YAG توان پایین در نابودی باکتری اشیریشیاکلی PTCC 1276 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشانگر آن است که پرتوهای هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG در توان 40 mW/cm^2 نمی تواند به تنهایی اثرهای چشمگیری بر جمعیت این باکتری ایجاد نماید. اما، حضور نانوذرات طلا در غلظت غیرسمی $0.5 \mu\text{g/ml}$ این تأثیرگذاری را چشمگیر نموده است. این همکاری مؤثر توانسته است بدون ایجاد اثرهای ماکروسکوپیک دمایی بر کل محلول به طور هدفمند میکروارگانیسم را نابود سازد. این نتایج در شرایطی حاصل گردید که تحقیقات پیشین از منابع نور پرتوان بهره می بردند و این امر موجب آسیب به بافت سالم مجاور می گردید. لذا، این مقاله توانسته است به عنوان اولین تحقیق، نتایج امیدبخشی در غیرفعالسازی فتوداینامیکی میکروارگانیسم در شدت های پایین نور لیزر به دست دهد.



شکل ۶: مقایسه نتایج حاصل در کاهش لگاریتمی جمعیت باکتری اشیریشیاکلی PTCC ۱۲۷۶ به واسطه تابش پرتوهای لیزر بدون حضور نانوذره طلا و در حضور نانوذره طلا

جدول ۳: تأثیر غیرفعالسازی فتوداینامیکی بر باکتری اشیریشیا کلی PTCC ۱۲۷۶ در حضور نانوذره طلا

زمان تابش دهی (min)	میانگین تعداد باکتری ها (CFU/ml)	log10(N0/N) الحواف استاندارد log10(N/N0)
۰	$3/83 \times 10^7$	-
۱۵	$3/40 \times 10^5$	۲/۰۵
۳۰	$2/175 \times 10^5$	۲/۲۴
۶۰	$1/4125 \times 10^5$	۲/۴۳

نور ناچیز است اما، اثرات مستقیم این ترکیب بر کاهش جمعیت طی ۶۰ دقیقه تابش دهی بسیار مشهود می باشد. به عقیده ما سازوکار دخیل در نابودی این میکروارگانیسم، افزایش فرآیندهای فتوشیمیایی به واسطه حضور نانوذرات طلا در مجاورت باکتری می باشد. نانوذرات طلا با جذب پرتوی لیزر برانگیخته می شوند. این نانوذرات برانگیخته می توانند از طریق برخورد، موجب افزایش نرخ جمعیت مواد حساس به نور برانگیخته و میزان اکسیژن یکتایی شوند. یکی از رخدادهای محتمل آن است که نانوذره برانگیخته با برخورد مستقیم با ماده حساس به نور آن را برانگیخته نماید. این برانگیختگی می تواند به ترازهای یکتایی با طول عمر کوتاه و یا به ترازهای سه تایی با طول عمر بلند باشد. در هر دو صورت این جفت شدگی منجر به تحریک ماده حساس به نور به حالت سه تایی خواهد شد که پتانسیل تبدیل اکسیژن مولکولی به اکسیژن یکتایی را دارا می باشد. همچنین تبدیل مستقیم اکسیژن سه تایی به اکسیژن یکتایی نیز می تواند با برخورد مستقیم نانوذرات طلای برانگیخته با مولکول های اکسیژن صورت پذیرد [۱۳].

در آزمایش های ما هیچ گونه ماده حساس به نور به محلول تزریق نگردیده است. ما فکر می کنیم ماکرومولکول ها و پروتئین های درون میکروارگانیسم می توانند از طریق جذب نور برانگیخته شده و در فروافت به حالت پایه با برخورد به مولکول های اکسیژن محلول در محیط تولید اکسیژن یکتایی بسیار سمی نمایند. گرچه این عامل نقش مستقیم در توجیه اثرات سمی نور سبز به کارگرفته بر باکتری دارد، در نتایج گروه درمان فتوداینامیکی نیز دخیل خواهد بود. ما اعتقاد داریم نانوذرات طلا با جذب پرتوهای هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG برانگیخته می شوند و بخشی از انرژی حاصل را از طریق برخورد با ماکرومولکول ها، پروتئین ها و اکسیژن مولکولی محلول در محیط از دست می دهند. لذا، زمینه جهت تولید اکسیژن یکتایی و سایر عوامل واکنشگر اکسیژنی فراهم خواهد شد. این رخداد تأثیر بسیار زیادی در نابودی میکروارگانیسم به واسطه اکسیداسیون بازگشتناپذیر ارگان های باکتری ایفا خواهد نمود. این تحقیق تنها به ارائه نتایج اولیه در این زمینه پرداخته است و می تواند پایه ای برای تحقیقات بعدی به شمار آید. همچنین با توجه به افزایش دمای

References:

1. Fischbach A, Walsh T. Antibiotics For Emerging Pathogens. NIH Public Access 2009; 325: 1089-93.
2. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. NATURE MEDICINE SUPPLEMENT 2004; 10: 122-9.
3. Kolar M, Urbanek K, Latal T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. ELSEVIER 2011; 9: 357-63.
4. Nathan C. Antibiotics at the crossroads. Nature 2004; 431: 899-902.
5. Iseman MD. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis .N. Engl. J. Med 1993; 329: 784-91.
6. Huang W, Tsai P, Chen Y. Functional gold nanoparticles as agents for selective-killing of pathogenic bacteria. futuremedicine 2007; 6: 777-87.
7. ChandraRay P, Khan S, KumarSingh A, Senapati D. Nanomaterials for targeted detection and photothermal killing of bacteria. The Royal Society of Chemistry 2012; 41: 3193-209.
8. Zharov P, Mercer E, Galitovskaya N, Smeltzery S. Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles. Biophysical Journal 2006; 90: 619-27.
9. Abalaka ME, Daniyan SY, Adeyemo SO, Damisa D. The Antibacterial Efficacy of Gold Nanoparticles Derived from Gomphrenacelosioides and Prunusamygdalus (Almond) Leaves on Selected Bacterial Pathogens. International Scholarly and Scientific Research & Innovation 2014; 8: 340-3.
10. Addae E, Dong X, MCoy E, Yang Ch, Chen W, Yang L. Investigation of antimicrobial activity of photothermal therapeutic gold/copper sulfide core/shell nanoparticles to bacterial spores and cells. Journal of Biological Engineering 2014; 8: 1-11.
11. Chatterjee S, Bandy A, Sarkar K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. Journal of Nanobiotechnology 2011; 9: 1-7.
12. Simon-Deckers A, Brun E, Gouget B, Carriere M. Impact of gold nanoparticles combined to X-Ray irradiation on bacteria. Gold Bulletin 2006; 41: 619-27.
13. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R. Visible Light-Induced Killing of Bacteria as a Function of Wavelength: Implication for Wound Healing. Lasers in Surgery and Medicine 2010; 42: 467-72.
14. Zhang Y, Aslan K, Previte J. R, Geddes. D. Metal-enhanced Singlet Oxygen Generation: A Consequence of Plasmon Enhanced Triplet Yields. J Fluoresc 2007; 17: 345-9.
15. Niemz M. Laser-Tissue Interactions. Springer 2007; 3: 45-151.
16. Brenner M, Vincent JH. The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochemistry and photobiology 2008; 84(3): 539-49.
17. Mathews R, Micheline M. Beta-carotene as a photoprotective agent in erythropoietic protoporphyria. New England Journal of Medicine 1970; 282(22): 1231-4.