لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۵، دورهٔ ۱۳، شمارهٔ ۱، صفحات: ۲۲-۱۶ .

مقاله پژوهشی

# بررسی غیرفعالسازی فتوداینامیکی باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 با استفاده از لیزر نئودیوم یاگ پیوسته کمتوان و نانوذرات طلا

**حسن کریمی‌نژاد** [۱]
**نازنین صفرنژاد** [۱]
**حسین امانی** [۲]

**خلاصه**

**مقدمه:** امروزه، باتوجه به مقاوم‌شدن باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از روش‌های جایگزین همچون غیرفعالسازی نورگرمایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ازسویی‌دیگر به‌دلیل شدت بالای نور، اثرات گرمایی به بافت‌های سالم مجاور نیز نموذ می‌نماید و این موضوع به‌عنوان یکی از محدودیت‌های روش غیرفعالسازی نورگرمایی به‌شمار می‌آید. در این مقاله تأثیر پرتوهای هارمونیک دوم یک لیزر پیوسته Nd:YAG در شدت پایین $40\ mW/cm^2$ به‌همراه نانوذرات طلا بر نابودی میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** در این پژوهش نقش غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا با ابعاد ۹۰ نانومتر و پرتوهای همدوس هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG در شدت $40\ mW/cm^2$ بر بقاء باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 مورد بررسی قرار گرفت. در پایان، تأثیر همزمان به‌کارگیری از این باریکهٔ 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 کلیهٔ غلظت‌های بالاتر از $0.5\ \mu g/ml$ اثرات سمی بر جمعیت باکتری اشریشیا کلی PTCC1276 نشان می‌دهند. همچنین نتایج پرتودهی بر این باکتری بیانگر آن است که بیشترین تأثیر نور در بازهٔ زمانی ۶۰ دقیقه همراه با یک کاهش جمعیت به میزان 0.15log رخ داده است. نتایج غیرفعالسازی باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 از طریق به‌کارگیری همزمان لیزر Nd:YAG و نانوذرات طلای ۹۰ نانومتر در غلظت $0.5\ \mu g/ml$ نشانگر نابودی باکتری به میزان $2.43\log_{10}$ در پرتودهی به‌مدت ۶۰ دقیقه می‌باشد. درادامه، سازوکارهای دخیل در حصول این نتایج مورد تحلیل قرار گرفت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مقاله نشانگر آن است که بهره‌گیری همزمان از چشمهٔ نور لیزر Nd:YAG در شدت پایین و در طول موج ۵۳۲ 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 شیوهٔ 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 اشریشیا کلی PTCC 1276، لیزر پیوسته Nd:YAG، اکسیژن یکتایی

۱. دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکدهٔ علوم پایه، گروه فیزیک. بابل، ایران

۲. دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکدهٔ مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی. بابل، ایران

نویسندهٔ مسئول: حسن کریمی‌نژاد، 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 نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند[۲و۳]. متأسفانه ایران یکی از کشورهایی است که با مصرف بیش از اندازهٔ 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[۶-۴]. با ظهور و افزایش باکتری‌های مقاوم به دارو هرساله عفونت‌های ناشی از آن باعث افزایش مرگ‌ومیر در کشورهای درحال توسعه می‌شود[۷]. بنابراین نیاز فوری به توسعهٔ روش‌های جدید برای رسیدگی به این مشکل وجود دارد. یکی از روش‌های امیدوارکننده برای ازبین‌بردن باکتری‌ها به‌کارگیری از غیرفعالسازی نورگرمایی[1] با استفاده از نانوساختارها می‌باشد[۸]. در غیرفعالسازی نورگرمایی با استفاده از گرمای حاصل از جذب پرتوهای نور توسط نانوساختارها نابودی میکروارگانیسم رخ خواهد داد[۹]. درمیان انواع مختلف نانوساختارها نانوذرات طلا نتایج امیدوارکننده‌تری به‌منظور غیرفعالسازی نورگرمایی برروی 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 نورگرمایی استفاده شده‌اند [۱۱]. ازجمله خواص منحصربه‌فرد نانوذرات طلا، رزونانس پلاسمون سطحی آن‌ها در ناحیهٔ ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر است. علاوه‌براین، برخی از نانوساختارهای طلا همچون نانومیله‌ها و نانوقفس‌ها به‌دلیل دارا بودن رزونانس پلاسمون سطحی در ناحیهٔ فروسرخ نزدیک عمق نفوذ بیشتری در بافت بدن دارند. سایمون دیکر و همکاران[2] با استفاده از نانوذرات طلا همراه با تابش اشعهٔ X نتایج مثبتی در نابودی باکتری اشریشیاکلی به‌دست آوردند [۱۲]. گرچه ژارو و همکاران[3] با استفاده از لیزر پالسی YAG:Nd استراتژی جدیدی در درمان عفونت‌های ناشی از انواع باکتری‌ها ارائه دادند اما، با وجود نتایج مفید به‌دست‌آمده 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.

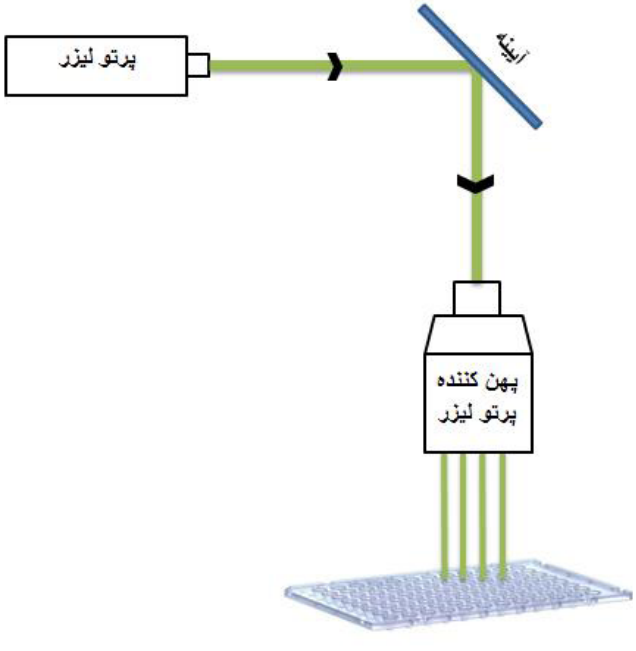
## روش بررسی

### نانوذرات طلا و منبع نور

نانوذرات طلا از شرکت پیام‌آوران نانوفنآوری فردانگر تهیه شدند. غلظت‌های مختلف از نانوذرهٔ طلا با رقیق‌کردن غلظت اولیه (1000ppm) از نانوذرهٔ طلا به‌وسیلهٔ آب دیونیزه به‌دست می‌آید. طیف جذب نانوذرهٔ طلا ازطریق دستگاه اسپکتوفتومتر فرابنفش- مرئی (Spekol 2000, Analyticjena CO) به‌دست آمد. علاوه‌براین از میکروسکوپ نیروی اتمی (Nanosurf AFM) برای تعیین شکل و توزیع اندازهٔ 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 پهن‌کنندهٔ باریکه استفاده گردید. در شکل۱ طرح شماتیک چیدمان مورد استفاده نشان داده شده است.

### کشت باکتری

باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر محیط مایع نوترینت براث کشت و به‌مدت ۱۸ساعت در شیکر انکوباتور (FF-81، شرکت پارس آزما) در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و با دور ۲۰۰ rpm نگه داشته شد. پس‌ازآن باکتری کشت‌داده‌شده را با دور ۳۵۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه




**شکل۱: طرح شماتیک سیستم مورد استفاده به‌منظور غیرفعالسازی باکتری اشریشیا کلی PTCC ۱۲۷۶**

1. Photo thermal Inactivation (PTI)
2. Simon-Dicker.et al
3. Zharou.et al

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

### گروه کنترل اصلی

باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 با حجم مساوی از محلول سرم فیزیولوژی مخلوط شد. سپس به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک نگه داشته شد. پس‌ازآن، محلول حاصل را رقیق‌سازی سریالی کردیم و در محیط جامد آگار کشت و دردمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. درپایان، جمعیت باکتری‌های گروه کنترل شمارش گردید.

### گروه کنترل دارو

نانوذرهٔ طلا را به غلظت‌های 0.5µg/ml, 1 ,5, 10 و 50 رساندیم و با حجم برابر از باکتری مرجع اضافه شد. محلول‌های حاصل را در شیکر انکوباتور تاریک در۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت و در دور ۲۰۰ rpm نگهداری نمودیم. پس‌ازآن، تعداد کلونی‌ها از طریق رقیق‌سازی سریالی محاسبه گردید.

### گروه کنترل نور

به‌منظور مطالعهٔ اثر نور لیزر بر میزان بقای باکتری، باکتری مرجع را با حجم برابر از محلول سرم فیزیولوژی مخلوط می‌شود و سپس آن را به چاهک‌هایی از پلیت ۹۶ خانه استریل تزریق نمودیم. پس‌ازآن نمونه‌ها در بازه‌های زمانی مختلف ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه تحت‌تابش پرتوهای لیزر Nd:YAG با شدت $40\ mW/cm^2$ قرار گرفت. پس از رقیق‌سازی سریالی و پس از ۲۴ ساعت نگهداری نمونه‌های کشت‌داده‌شده بر محیط آگار تعداد کلونی‌های باکتری شمارش شد.

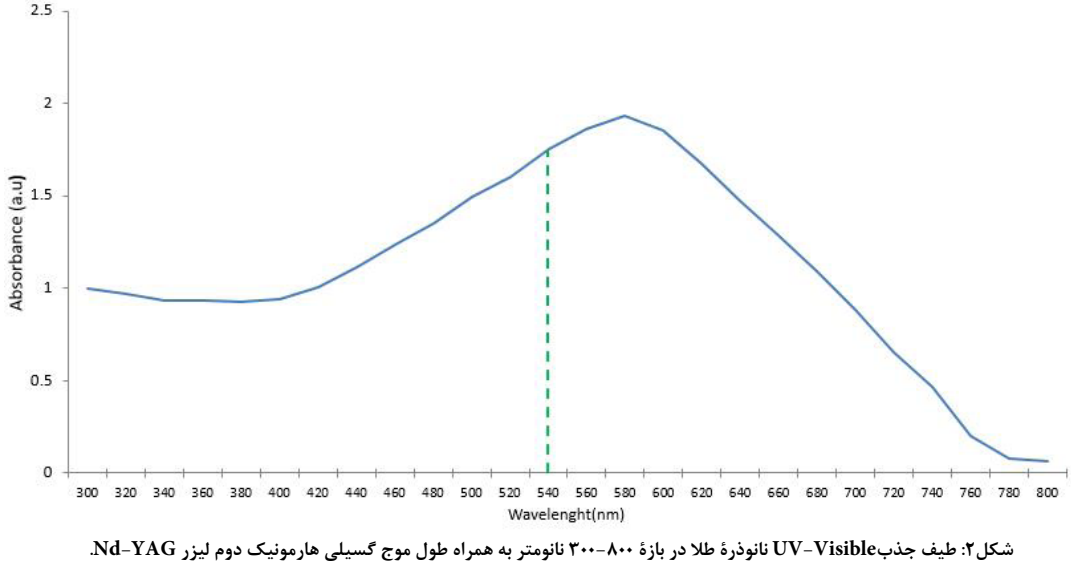
### گروه درمان فتوداینامیکی

محلول حاوی سوسپانسیون باکتری و غلظت غیرسمی نانوذرهٔ طلا تحت‌تابش پرتوی لیزر قرار گرفت. برای این منظور، باکتری کشت‌داده‌شده را با حجم برابر از غلظت غیرسمی نانوذرهٔ طلا مخلوط نمودیم. پس‌ازآن، محلول به‌دست‌آمده به‌مدت یک ساعت در انکوباتور تاریک نگهداری شد و سپس در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه استریل تزریق گردید. نمونه‌ها در مدت زمان‌های مختلف ۱۵، ۳۰و ۶۰ دقیقه تحت‌تابش پرتوی لیزر Nd:YAG با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر و شدت $40\ mW/cm^2$ قرار گرفت. سپس رقیق‌سازی سریالی صورت پذیرفت و شمارش کلونی‌ها پس از ۲۴ ساعت انجام شد.

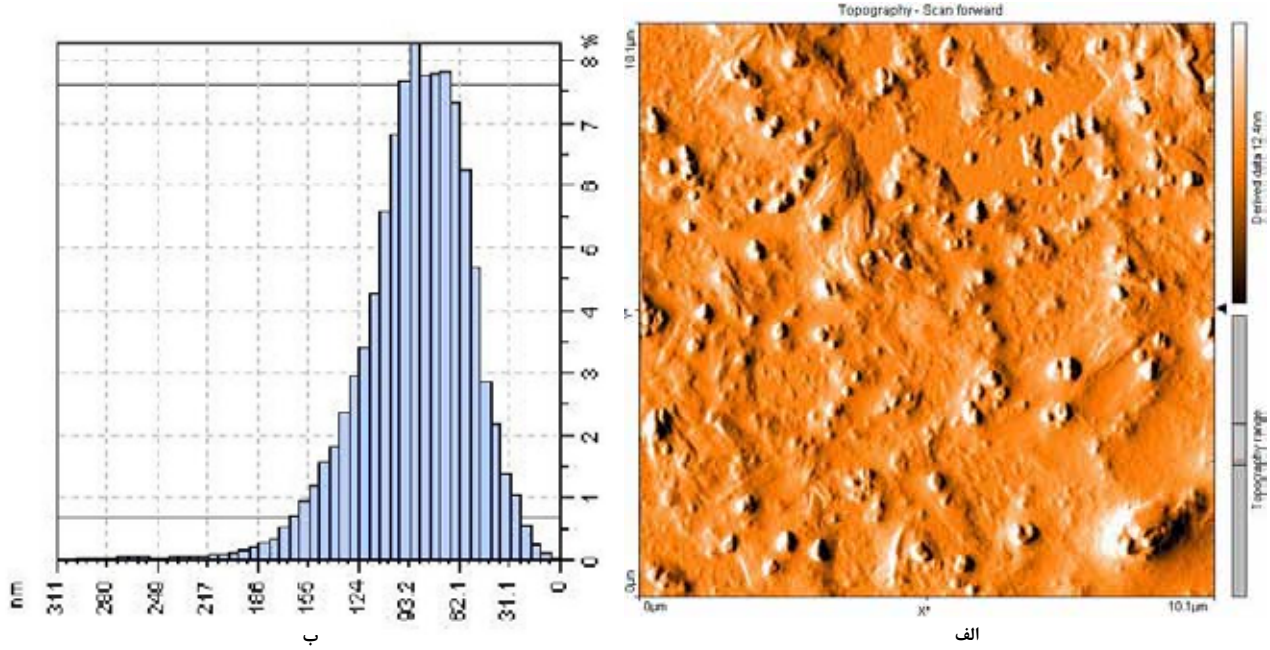
## یافته‌ها و بحث

### طیف جذب UV-Visible نانوذرهٔ طلا

شکل ۲ طیف جذب UV-Visible نانوذرات طلای مورد استفاده در این پژوهش در محدودهٔ ۸۰۰ -۳۰۰ نانومتر را نشان می‌دهد. همان‌طورکه از این شکل مشاهده می‌شود، این ساختار دارای یک باند جذب قوی در ناحیهٔ ۷۷۰-۴۱۰ نانومتر و قلهٔ جذبی در طول موج ۵۸۵ نانومتر می‌باشد که این باند جذب قوی به‌دلیل رخداد پدیدهٔ رزونانس پلاسمون سطحی




**شکل۲: طیف جذبUV-Visible نانوذرهٔ طلا در بازهٔ ۸۰۰-۳۰۰ نانومتر به همراه طول موج گسیلی هارمونیک دوم لیزر Nd-YAG.**




ب الف

**شکل ۳: الف) تصویر AFM از نانوذرات طلا ب) نمودار توزیع اندازهٔ نانوذرات طلا**

نانوذرهٔ طلا می‌باشد. همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، خط گسیلی لیزر Nd:YAG در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارای پتانسیل بالا در برانگیختگی نانوذرهٔ طلا می‌باشد. پیش‌بینی می‌شود که انتقال انرژی فوتون به نانوذرات طلا موجب افزایش دمای آن و القای اثرات دمایی به ساختار بیولوژیک گردد. همچنین شکل۳- الف تصویر میکروسکوپ انرژی اتمی(AFM) از نانوذرات طلا و شکل ۳- ب نمودار توزیع اندازهٔ نانوذرهٔ طلا را نشان می‌دهد. همان‌طورکه در این شکل مشاهده می‌شود، ذرات تشکیل‌دهنده در گستردهٔ ابعاد در حدود ۲۰۰-۵ نانومتر توزیع شده‌اند. دراین‌بین، 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 برروی باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276

جدول۱ اثر خواص آنتی‌باکتریال نانوذرات طلا در غلظت‌های 10, 5, 0.5µg/ml, 1و 50 بروی باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 را نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذرات طلا جمعیت باکتری کاهش یافته است. به‌طوری‌که در غلظت 0.5µg/ml کمترین اثر مهار شدگی به مقدار 0/09log و در غلظت 50µg/ml بیشترین اثر مهارشدگی به مقدار 0/36log 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 به‌کاررفته است که موجب نفوذ بالای آن در دیوارهٔ سلولی که خارجی‌ترین قسمت باکتری 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 0.5µg/ml نانوذرهٔ طلا اثر کمترین سمیت بر جمعیت باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 دارد بهره بردیم.

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

جدول۲ تاثیر تابش پرتوهای لیزر نئودمیوم یاگ با طول موج ۵۳۲

**شکل۴: تصویر TEM از نانوذرات طلای به کار گرفته شده**

**جـدول۱: تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا بر جمعیت باکتری اشریشـیا کلی PTCC ۱۲۷۶**

| غلظت نانوذرهٔ طلا (µg/ml) | میانگین تعداد باکتری‌ها CFU / ml × $10^6$ | انحراف استاندارد |
|---|---|---|
| نمونهٔاصلی باکتری | ۹/۳۳ | ۰/۳ |
| ۰/۵ | ۹/۱۱ | ۰/۲ |
| ۱ | ۸/۶۵ | ۰/۲ |
| ۵ | ۷/۹۵ | ۰/۳ |
| ۱۰ | ۷/۱۶۱ | ۰/۲۲ |
| ۵۰ | ۶/۸۸ | ۰/۲ |

نانومتر در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه بر جمعیت باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 را نشـان می‌دهد. مطابق این جدول طی‌مدت زمان ۱۵ دقیقه جمعیت باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 به‌مقدار 0/04log کاهش یافت و این کاهش با افزایش زمان تا ۶۰ دقیقه روند افزایشی نشان می‌دهد. به‌طوری‌که در زمان ۶۰ دقیقه جمعیت به میزان 0/15log کاهش یافـت. کاهش ۳۰ درصد جمعیت باکتری تأثیر چندانی بر غیرفعالسـازی باکتری به‌شـمار نمـی‌رود. بنابراین طبق نتایـج آزمایش‌های ما در غیاب نانوذرات طلا، تابش پرتو تأثیر چندانی در نابودی باکتری نشان نمی‌دهد. در توجیه نابودی بخشی از جمعیت باکتری اشریشیا کلی PTCC 1276 تحت تابش پرتوهای همدوس لیزر Nd:YAG در طول موج ۵۳۲ نانومتر و در شـدت 40 $mW/cm^2$ می‌توان به استدلال اشاره‌شده توسط هانگ و همکاران[۴] استناد نمود[۶]. آن‌ها نشان دادند که تابش پرتوهای لیزر در طول‌موج کمتر از ۶۰۰ نانومتر توسـط ماکرومولکول‌ها و پروتئین‌ها جذب می‌گردد و طی واکنش‌های فتوشـیمیایی موجب تغییر در موازنهٔ آنزیمی باکتری می‌گردد. این عدم تعادل شـیمیایی نهایتاً منجر به مرگ باکتری خواهد شد.

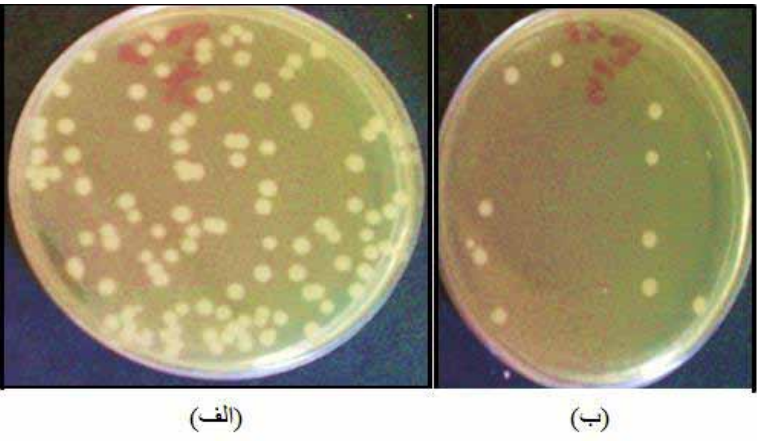
شکل۵ مقایسه‌ای از جعیت کلونی‌های رشدداده‌شده با رقت یکسان بین گروه کنترل اصلی و گروه درمان فتودینامیکی را نشان می‌دهد. به‌وضوح تأثیر چشـمگیر به‌کارگیری پرتوهـای لیزر پیوسـته در طول موج ۵۳۲ نانومتـر به‌همـراه نانوذرات طلا در کاهش جمعیت این باکتری مشـاهده می‌شـود. جـدول ۳ نتایـج تأثیر پرتوهـای همدوس لیـزر Nd:YAG

**جـدول۲: تأثیر پرتوهای همدوس لیزر Nd:YAG بر باکتری اشریشـیا کلی PTCC ۱۲۷۶ در زمان‌های مختلف**

| مدت‌زمان پرتودهی (min) | میانگین تعداد باکتری ها CFU / ml × $10^7$ | $\log_{10}(N_0/N)$ | انحراف استاندارد $\log_{10}(N_0/N)$ |
|---|---|---|---|
| نمونهٔ 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 |

در طول‌مـوج ۵۳۲ نانومتر بـر جمعیت باکتری اشریشـیا کلی PTCC 1276 در حضـور نانـوذرهٔ طـلا بـا غلظـت 0.5µg/ml در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقـه را نشـان می‌دهـد. مطابق نتایج آزمایش‌هـای مـا جمعیت باکتری طـی ۱۵ دقیقـه تابش‌دهی درحضور نانوذرهٔ طلا با 2.052log کاهش در تعداد باکتری مواجه شد. این کاهش لگاریتمی جمعیت باکتری به‌واسـطهٔ تابش‌دهی توسـط لیزر و در حضور نانوذرهٔ طلا با بیشـینهٔ توزیع ذرات با ابعاد ۹۰ نانومتر برای مدت‌زمان‌های تابش‌دهـی ۳۰ و ۶۰ دقیقـه به‌ترتیب به مقـدار 2.24log و 2.43log افزایش یافت. با مراجعه به این جدول نتایج حاصل‌از به‌کارگیری همزمان از دو پارامتـر تابش پرتوهای لیزر و نانوذرات طـلا منجر به نابودی بیش از ۹۹/۹ درصـد جمعیت باکتری اشریشـیا کلی PTCC 1276 طی ۶۰ دقیقه تابش‌دهی شده است.

مطابق شـکل۶ نمودار ستونی به‌منظور ارائهٔ مقایسه‌ای از نقش نانوذرات طـلا در حضور و یا عدم حضـور پرتوهای همدوس لیزر Nd:YAG موج پیوسته نشان داده شده‌است. تأثیر چشمگیر به‌کارگیری همزمان نانوذرات طـلا و پرتوهای همـدوس هارمونیک دوم لیـزر Nd:YAG بر جمعیت باکتـری اشریشـیاکلی PTCC1276 را می‌توان برپایهٔ اثرات ناشـی‌از جـذب پرتوهای لیزر توسـط نانوذرات طـلا و ماکرومولکول‌ها و پروتئین های آن میکروارگانیسـم توجیه نمود. برطبق مشاهدات ما افزایش دمای حاصل در گروه درمان فتودینامیکی طی ۶۰ دقیقه تابش‌دهی درحدود ۵ درجهٔ سـانتی‌گراد بوده است. باتوجه به دمای اولیهٔ محلول که حدود ۳۰ درجهٔ سـانتی‌گراد بوده‌است، این میزان به‌طور مستقیم نمی‌تواند منجربه نابودی میکروارگانیسـم هدف گـردد. دلیل این ادعا آن اسـت که ایجاد شـرایط هایپرترمیا در نابودی میکروارگانیسـم نیازمند رسیدن به دمای حدود ۵۰-۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد می‌باشد. لذا، گرچه اثرات ماکروسکوپیک گرمایی القاء شـده توسـط ترکیب باریکهٔ لیزر سبز و نانوذرات طلا جاذب



(الف) (ب)

**شـکل۵: الـف) نمونهٔ باکتری گـروه کنترل اصلی ب) نمونهٔ باکتـری بر اثر تابش پرتوی لیزر در حضور نانوذرهٔ طلا.**

4. Huang et al

جدول ۳: تأثیر غیرفعالسازی فتوداینامیکی بر باکتری اشریشیا کلی PTCC ۱۲۷۶ در حضور نانوذرهٔ طلا

| زمان تابش‌دهی (min) | میانگین تعداد باکتری‌ها (CFU/ml) | log10(N0/N) | انحراف استاندارد log10(N/N0) |
|---|---|---|---|
| ۰ | ۳/۸۳ ×۱۰۷ | - | - |
| ۱۵ | ۳/۴۰×۱۰۵ | ۲/۰۵ | ۰/۰۴ |
| ۳۰ | ۲/۱۷۵×۱۰۵ | ۲/۲۴ | ۰/۰۵ |
| ۶۰ | ۱/۴۱۲۵×۱۰۵ | ۲/۴۳ | ۰/۰۴ |

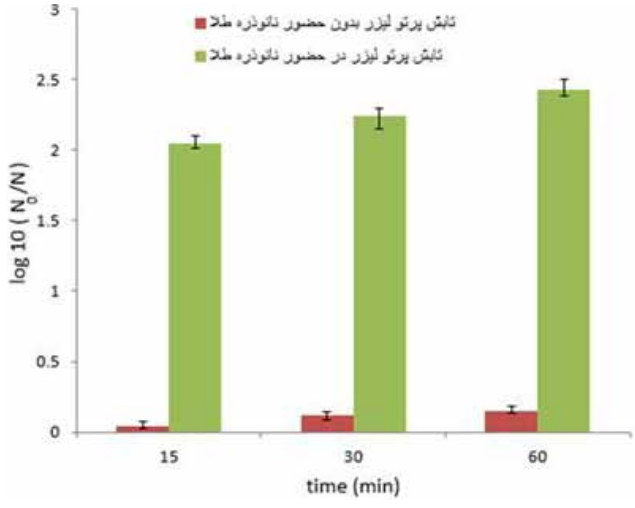
نور ناچیز است اما، اثرات مستقیم این ترکیب بر کاهش جمعیت طی ۶۰ دقیقه تابش‌دهی بسیار مشهود می‌باشد. به عقیدهٔ ما سازوکار دخیل در نابودی این میکروارگانیسم، افزایش فرآیندهای فتوشیمیایی به‌واسطهٔ حضور نانوذرات طلا در مجاورت باکتری می‌باشد. نانوذرات طلا با جذب پرتوی لیزر برانگیخته می‌شوند. این نانوذرات برانگیخته می‌توانند ازطریق برخورد، موجب افزایش نرخ جمعیت مواد حساس به نور برانگیخته و میزان اکسیژن یکتایی شوند. یکی از رخدادهای محتمل آن است که نانوذرهٔ برانگیخته با برخورد مستقیم با مادهٔ حساس به نور آن را برانگیخته نماید. این برانگیختگی می‌تواند به ترازهای یکتایی با طول عمر کوتاه و یا به ترازهای سه‌تایی با طول عمر بلند باشد. در هردو صورت این جفت شدگی منجر به تحریک مادهٔ حساس به نور به حالت سه‌تایی خواهد شد که پتانسیل تبدیل اکسیژن مولکولی به اکسیژن یکتایی را دارا می باشد. همچنین تبدیل مستقیم اکسیژن سه‌تایی به اکسیژن یکتایی نیز می‌تواند با برخورد مستقیم نانوذرات طلای برانگیخته با مولکول‌های اکسیژن صورت پذیرد[۱۳].

در آزمایش‌های ما هیچ‌گونه مادهٔ حساس به نور به محلول تزریق نگردیده است. ما فکر می‌کنیم ماکرومولکول‌ها و پروتئین‌های درون میکروارگانیسم می‌توانند از طریق جذب نور برانگیخته‌شده و در فروافت به‌حالت پایه با برخورد به مولکول‌های اکسیژن محلول در محیط تولید اکسیژن یکتایی بسیار سمی نمایند. گرچه این عامل نقش مستقیم در توجیه اثرات سمی نور سبز به‌کارگرفته 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 می‌شوند و بخشی از انرژی حاصل را ازطریق برخورد با ماکرومولکول‌ها، پروتئین‌ها و اکسیژن مولکولی محلول در محیط از دست می‌دهند. لذا، زمینه جهت تولید اکسیژن یکتایی و سایر عوامل واکنشگر اکسیژنی فراهم خواهد شد. این رخداد تأثیر بسیار زیادی در نابودی میکروارگانیسم به‌واسطهٔ اکسیداسیون بازگشت‌ناپذیر ارگان‌های باکتری ایفا خواهد نمود. این تحقیق تنها به ارائهٔ نتایج اولیه در این زمینه پرداخته است و می‌تواند پایه ای برای تحقیقات بعدی به‌شمارآید. همچنین با توجه به افزایش دمای ماکروسکوپیک اندک حاصل از ترکیب مناسب باریکهٔ لیزر و نانوذرات طلا نتایج این مقاله را می‌توان زمینه‌ای برای روش‌های هوشمند درمان‌های عاری‌از آنتی‌بیوتیک با حداقل آسیب به بافت‌های سالم مجاور دانست.

باید توجه نمود که بدن به‌خودی‌خود نمی‌تواند رادیکال آزاد تولید نماید. تولید این رادیکال‌ها فقط از طریق فرآیندهای فتوشیمیایی صورت می‌گیرد. همچنین فرآیندهای فتوشیمیایی نیز نیازمند حضور منبع نور می‌باشد. درواقع، ماکرومولکول‌ها تحت‌تابش نور خورشید و در حضور اکسیژن می‌توانند طی واکنش‌های فتوشیمیایی تولید رادیکال آزاد نمایند. اما این رادیکال‌های تولیدشده در بدن توسط مواد آنتی‌اکسیدانی مانند ملانین، کاروتن ها و... حذف می‌شوند[۱۶و۱۷]. به‌هرحال باتوجه به آن‌که آزمایش‌های صورت‌پذیرفته در شرایط برون‌تنی می‌باشد، انجام آزمایش‌های مشابه در شرایط درون‌تنی نیز حائز اهمیت خواهد بود.

## نتیجه‌گیری

در این مقاله توانمندی لیزر Nd:YAG توان پایین در نابودی باکتری اشریشیاکلی PTCC 1276 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشانگر آن است که پرتوهای هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG در توان $40\ mW/cm^2$ نمی‌توانند به‌تنهایی اثرهای چشمگیری بر جمعیت این باکتری ایجاد نماید. اما، حضور نانوذرات طلا در غلظت غیرسمی $0.5\mu g/ml$ این تأثیرگذاری را چشمگیر نموده است. این همکاری مؤثر توانسته‌است 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 می‌بردند و این امر موجب آسیب به بافت سالم مجاور می‌گردید. لذا، این مقاله توانسته است به‌عنوان اولین تحقیق، نتایج امیدبخشی در غیرفعالسازی فتوداینامیکی میکروارگانیسم در شدت‌های پایین نور لیزر به‌دست دهد.




شکل۶: مقایسهٔ نتایج حاصل در کاهش لگاریتمی جمعیت باکتری اشریشیاکلی PTCC ۱۲۷۶ به واسطهٔ تابش پرتوهای لیزر بدون حضور نانوذرهٔ طلا و در حضور نانوذرهٔ طلا

## 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 Nanobiotechnology2011; 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 Bulletinl 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.