مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۵، بهار و تابستان ۱۳۹۰، صفحات۴۲ - ۳۴

اثر لیزر کم توان بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور و عدم حضور کافئیک اسید

مرضیه حبیبی[۱]، نعمت الله غیبی [۶و۲]، جمیله نوروزی[۳]، تقی ناصرپور[۶و۴]، حسن جهانی هاشمی[۵]، نادر دیوان خسروشاهی[۶]، صفرعلی علیزاده[۶]

۱)گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران
۲)مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه و گروه بیوفیزیک ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳)گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۴)گروه میکرب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۵)گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۶) مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
نویسنده رابط : نعمت الله غیبی گروه بیوفیزیک ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
E-mail: gheibi_n@yahoo.com

چکیده:

زمینه واهداف: *استافیلوکوکوس اورئوس* از عوامل مهم ایجاد عفونت در تمام جوامع بهداشتی درمانی است. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها در چند دهه اخیر منجر به پیدایش سویه‌های مقاوم این باکتری شده‌است. هدف از این مطالعه، تعیین اثرات لیزر بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* در عفونت‌های سوختگی انسان و مقایسه اثرات مهار کننده آن بر روی این باکتری در حضور و عدم حضور کافئیک اسید بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از نمونه زخم سوختگی ناشی از مواد آتش زا در مرکز درمانی شهید مطهری تهران ۱۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شد. سویه ها با روش‌های تشخیص مورفولوژی میکروسکوپی، بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. حداقل غلظت مهارکننده (MIC) کافئیک اسید بر روی سویه‌های مذکور به روش رقت سازی (Macrodilution) تعیین شد. هر کدام از سویه‌ها به طور جداگانه تحت تاثیر کافئیک اسید و لیزر هلیوم نئون با طول موج ۶۳۰ نانومتر و توان ۲میلی وات به مدت ۱، ۲، ۳ دقیقه قرار گرفتند. در گروه دیگر نیز سویه‌ها به‌طور توأم با کافئیک اسید و لیزر تیمار شدند. سپس سویه‌ها بر روی محیط های کشت Blood Agar کشت داده شد و در گرمخانه ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرارداده شدند. تعداد کلنی ها با دستگاه شمارش کلنی (colony counter) شمرده شدند. در هر کدام از شرایط ذکر شده آزمایشات سه بار تکرار شدند. برای کنترل کیفی از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) استفاده شد. داده ها به کمک نرم افزار SPSS وآزمون‌های T.test ، Friedman.Test و غیر پارامتریک تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: حداقل غلظت مهار کننده برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۷ میلی مولار به‌دست آمد. لذا جهت بررسی اثر کافئیک اسید بر رشد باکتری از غلظت‌های ۶/۵و۶/۷۵ میلی مولار (sub MIC) استفاده شد. شمارش کلنی ها کاهش معنی دار درصد کلنی در هر دو غلظت نسبت به هم و نسبت به گروه شاهد را نشان داد ($P<۰/۰۰۰۱$). کاهش درصد تعداد کلنی‌ها در یک الگوی وابسته به زمان نیز در گروه‌های در معرض لیزر مشاهده شد و سطح معنی داری آنها نسبت به گروه شاهد$P<۰/۰۰۰۱$ بود. استفاده توام از لیزر و کافئیک اسید تعداد کلنی ها را نسبت به گروه شاهد ($P<۰/۰۰۰۱$) و نسبت به کافئیک اسید به تنهایی($P<۰/۰۰۰۱$) و یا لیزر به تنهایی ($P<۰/۰۰۰۱$) کاهش معنی دار داشت.

نتیجه گیری: کاهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* با کافئیک اسید یا لیزر مشاهده گردید. استفاده توام از لیزر کم توان هلیوم نئون به همراه کافئیک اسید اثر هم‌افزایی و مؤثرتر در کاهش تعداد باکتری در محیط آزمایشگاه نشان داد.

کلمات کلیدی: لیزر کم توان، کافئیک اسید، *استافیلوکوکوس اورئوس*، حد اقل غلظت مهار کننده

مقدمه:

استافیلوکک غالبا در سطح پوست کلونیزه می‌شود. حدود ۲۵٪ تا ۳۰٪ از افراد در بینی خود حامل این باکتری هستند. شیوع این جنس عفونت‌ها بیش از ۸۰ ٪ است. در آن گونه‌های متعددی وجود دارد. یکی از گونه‌های مهم آن *استافیلوکوکوس اورئوس* است که به وفور از عفونت‌های مختلف انسانی جدا می شود. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها در درمان باعث به‌وجود آمدن سویه‌های مقاوم شده‌است. استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین (methicillin resistant Staphylococcus aureus : MRSA) از مهم‌ترین این موارد است. MRSA نسبت به کلیه آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام مقاوم است. درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها امروز یکی از مشکلات اساسی مراکز درمانی می باشد (۳-۲-۱). به همین دلیل نیاز است تا روش‌های جدیدی جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها به‌کار گرفته شود. یکی از این روش‌ها، استفاده از اشعه لیزر کم توان است. در برخی مطالعات استفاده از لیزر با توان پایین در ترکیب با یک حساس کننده به عنوان عامل مرگ میکرب‌ها در شرایط آزمایشگاه بررسی شده است(٤). شناخت اثر باکتری کشی لیزرها می تواند در درمان افراد با جراحت‌های عفونی مناسب باشد. این کاربرد می تواند با سایر استفاده‌های درمانی لیزر در آسیب‌های منجر به جراحت همراه شود(۳، ۵). لیزرهایی با قدرت خروجی کمتر از ۵ میلی وات به همراه عوامل رنگی برای القاء مرگ میکربی به‌کار گرفته شده‌اند(٤). چنین بیان می شود که این عملکرد ضد میکربی با تشکیل اکسیژن رادیکالی و سایر رادیکال‌های آزاد حاصل از حساس کننده به نور القاء می شود(٦). کافئیک اسید نوعی ترکیب طبیعی است. این ماده جامد زرد رنگ دارای هر دو گروه عملکردی آکریلیک و فنلیک می باشد. استرهای فنتیل کافئیک اسید، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و بازدارندگی هیالورونیدازی نشان می دهند. این ترکیبات همانند کلروژنیک اسید و کافئیک اسید فعالیت ضد باکتری، ضد جهش زایی و ضد ویروسی دارند(۷). کافئیک اسید یکی از فراوان ترین متابولیت های هیدروکسی سینامات و فنیل پروپانوئید در بافت های گیاهی است که بطور متداول بصورت مشتقات آمیدی، استری، استر قندی و گلوکوزیدی یافت می شود (۸). اثرات ضد میکروبی این مشتقات تاکنون مطالعات متعددی را بخود اختصاص داده است (۱۳-۹). کافئیک اسید بعنوان یک ترکیب مناسب افزودنی به مواد غذایی جهت مهار رشد کلستریدیوم بوتولینیوم و کاهش فرآیندهای حرارتی مواد غذایی حساس به گرما معرفی شده است (۹). فنیل استرهای کافئیک اسید بعنوان ترکیبات با اثر ضد میکروبی بالا در برابر باکتری های *استافیلوکک ارئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *سودوموناس آئروژنوزا* در مقایسه با ۵-کلروژنیک اسید و کافئیک اسید معرفی شده اند (۱۲).

در این مطالعه اثر کافئیک اسید به تنهایی و به همراه لیزر کم توان هلیم نئون با توان ۲ میلی وات در شرایط آزمایشگاه بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از زخم سوختگی با روش شمارش کلنی بررسی می گردد.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه تجربی سویه استافیلوکک جدا شده از ۱۰ نمونه زخم سوختگی ناشی از مواد آتش زا از مرکز درمانی شهید مطهری تهران بررسی شد. نمونه‌ها به کمک سواب استریل (قبل از تجویز آنتی بیوتیک) جمع‌آوری شد. سواب بلافاصله داخل محیط تیوگلیکولات براث انداخته شد و تا ٢٤ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس از لوله تیوگلیکولات یک لوپ استاندارد برداشته‌شد و در آگار خوندار کشت شد. در شرایط استریل در زیر هود مخصوص میکروب

شناسی از کلنی‌ها اسمیر تهیه شد و با روش گرم رنگ‌آمیزی شد. سویه‌های جدا شده با روش های روتین آزمایشگاهی مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت تعیین مقاومت به متی‌سیلین از روش Oxacillin screening plat تهیه شده از شرکت مست، مطابق با دستور العمل مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده شد. در هر بار آزمایش، سویه استاندارد ATCC 25923 *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز جهت مقایسه با نمونه های جمع آوری شده مورد استفاده قرار گرفت. Minimum inhibitor cocenteration (MIC) کافئیک اسید به روش Broth Macro dilution Method هم برای سویه استاندارد ATCC 25923 همزن مغناطیسی ٤ میلی متری و هم برای نمونه‌های جمع آوری شده از زخم سوختگی تعیین گردید. جهت تعیین اثر مهار کنندگی کافئیک اسید به تنهایی و بصورت توام با لیزر برای هر کدام از موارد شاهدی در نظر گرفته شد.

گروه شاهد

پس از آزمایشات پایلوت متوالی بهترین غلظتی که بتوان کلنی های قابل شمارش و قابل مقایسه از نمونه های سویه استاندارد را داشت زمانی بود که سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از باکتری به میزان 10^5 بار رقیق می شد. لذا با برداشت ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت سوسپانسیون باکتری و با رساندن حجم کل مخلوط به یک میلی لیتر در این گروه از سوسپانسیون میکربی یک لوپ استاندارد ($1/5\times10^6$) برداشته شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. ظروف پتری به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد تعداد کلنی‌ها با استفاده از دستگاه شمارنده کلنی شمرده شد.

تیمار با کافئیک اسید

ابتدا غلظت ۱۰ میلی مولار از کافئیک اسید (Merck) تهیه شده و با فیلتر مخصوص ۲ نانو متر استریل شد. حداقل غلظت مهار کننده کافئیک اسید برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش رقت سازی (Macrodilution) ۷ میلی مولار به دست آمد. لذا جهت بررسی اثر کافئیک اسید و بررسی تعداد کلنی ها و مقایسه کلنی های تشکیل شده در شرایط تحت آزمایش از غلظت‌های زیر MIC یعنی ٦/٥و٦/٧٥ میلی مولار استفاده شد. این محلول طوری به محیط مولر هینتون آگار اضافه شد که غلظت نهایی آن در محیط ٦/٥ و ٦/٧٥ میلی مولار بود. پس از آزمایشات پایلوت متوالی بهترین غلظتی که بتوان کلنی های قابل شمارش و قابل مقایسه از نمونه های سویه استاندارد را داشت زمانی بود که سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از باکتری به میزان 10^5 بار رقیق می شد. لذا با برداشت ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت سوسپانسیون باکتری و با رساندن حجم کل مخلوط با اضافه کردن محیط مولر هینتون آگار به یک میلی لیتر در گروه شاهد پس از لذا با برداشت ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت سوسپانسیون باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استوک کافئیک اسید، غلظت کل مخلوط با اضافه کردن محیط مولر هینتون آگار به یک میلی لیتر می رسید. مخلوط مورد نظر با همزن مغناطیسی ٤ میلی متری کاملاً یکنواخت می شد و سپس از سوسپانسیون میکربی یک لوپ استاندارد ($1/5\times10^6$) برداشته شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید. ظروف پتری به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد تعداد کلنی‌ها با استفاده از دستگاه شمارنده کلنی شمرده شد و با تعداد شمارش شده در پلیت شاهد مقایسه گردید.

در معرض قرارگیری لیزر

ابتدا سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از باکتری به میزان 10^5 بار رقیق می شد. با برداشت ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت سوسپانسیون باکتری حجم کل مخلوط در چاهک‌های ۹۶ تایی پلیت الیزا با اضافه کردن محیط مولر هینتون آگار به یک میلی لیتر می رسید. ضمن قرار دادن داخل یک همزن مغناطیسی ٤ میلی متری در هر کدام از چاهک‌ها بر روی دستگاه همزن مغناطیسی در زمان‌های ۲،۱ و۳ دقیقه تحت تاثیر اشعه لیزر هلیوم نئون گازی ٦۳۰ نانومتر، با توان ۲ میلی وات و با فاصله ۱ سانتی‌متر از پلیت قرار گرفتند. از هر کدام از چاهک‌ها بعد از مدت زمان سپری شده یک لوپ استاندارد برداشته شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از نگهداری در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ٢٤ ساعت، کلنی‌ها با استفاده از دستگاه شمارنده کلنی شمرده شدند و با تعداد شمارش شده در پلیت شاهد مقایسه گردید.

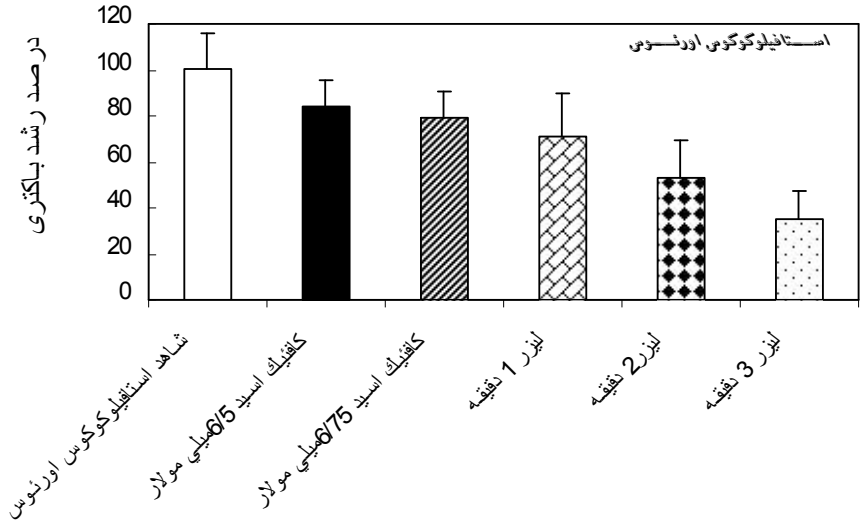
در معرض قرارگیری لیزر و تیمار با کافئیک اسید

ابتدا سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از باکتری به میزان 10^5 بار رقیق می شد. لذا با برداشت ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت سوسپانسیون باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استوک کافئیک اسید (نمونه های با غلظت نهایی٦/۵ و ٦/۷۵ میلی مولار) ، حجم کل مخلوط در چاهک‌های ۹٦ تایی پلیت الیزا با اضافه کردن محیط مولر هینتون آگار به یک میلی لیتر می رسید. ضمن قرار دادن داخل یک همزن مغناطیسی ٤ میلی متری در هر کدام از چاهک‌ها، نمونه های باکتری تیمار داده شده با کافئیک اسید بر روی دستگاه همزن مغناطیسی در زمان‌های ۱،۲ و۳ دقیقه تحت تاثیر اشعه لیزر هلیوم نئون گازی ٦۳۰ نانومتر، با توان ۲ میلی وات و با فاصله ۱ سانتی‌متر از پلیت قرار گرفتند. سپس با استفاده از یک لوپ استاندارد($1/5\times10^6$) از سوسپانسیون داخل چاهک‌ها برداشته شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از گذشت٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی-گراد، تعداد کلنی‌ها با استفاده از دستگاه کلنی کانتر شمرده شد و با تعداد شمارش شده در پلیت شاهد مقایسه گردید.

داده ها با نرم افزار SPSS پردازش و با آزمون‌های Friedman.Test، T Test و غیر پارامتریک تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها:

حداقل غلظت مهار کننده کافئیک اسید ۷ میلی مولار به دست آمد. بهترین غلظتی که بتوان کلنی های قابل شمارش و قابل مقایسه از نمونه های سویه استاندارد و تحت تیمار را داشت، غلظت هایی از حداقل غلظت مهار کننده یعنی ٦/۵ و ٦/۷۵میلی مولار استفاده شد. نتایج حاصل از درصد کلنی‌های رشد کرده در محیط های کشت دارای کافئیک اسید و گروه شاهد بدون تیمار با کافئیک اسید، در نمودار ۱ مشاهده می شود. تعداد کلنی‌ها در گروه شاهد به‌طور میانگین $376/17\pm61/57$ بود که معادل رشد ۱۰۰ ٪ در نظر گرفته شد. این تعداد در محیط‌های حاوی کافئیک اسید ٦/۵ میلی مولار $316/5\pm43/5$ (۱۱±٨٤/١٤ ٪) و ٦/۷۵ میلی مولار $207/5\pm45/2$ (۱۱/٤۲±۷۹/۱ ٪) بود.

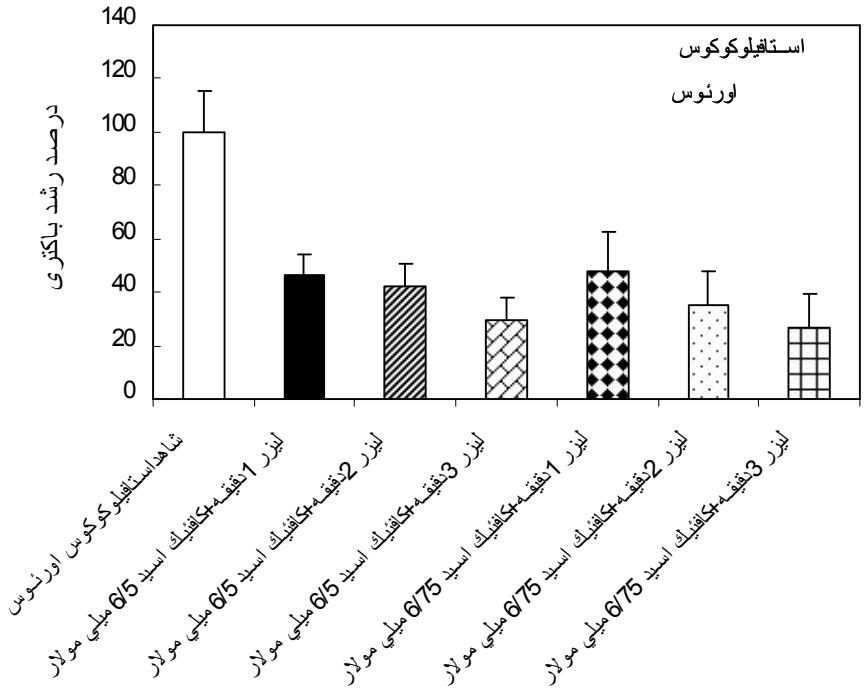


نمودار ۱: درصد رشد کلنی در معرض کافئیک اسید ٦/٥ و ٦/٧٥ میلی مولار و تابش لیزر قرمز با طول موج ٦٣٢ نانومتر و توان ۲ میلی وات در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه

میانگین درصد کلنی‌های تشکیل شده در محیط‌هایی که تحت اثر تابش لیزر بودند در نمودار ۱ ارائه شده-است. میانگین تعداد کلنی نمونه‌های تحت تابش لیزر به مدت ۱ دقیقه ۱۸± ۷۱/٤۲٪، به مدت ۲ دقیقه ۱٦/۳٦± ٥۲/۹٪ و به مدت ۳ دقیقه ۱۲/۸ ± ۳٤/۹٪ کاهش یافته بود. تفاوت تعداد کلنی های تشکیل شده در هر یک از زمان‌های مذکور نسبت به زمان ما قبل آن با P<۰/۰۰۰۱ معنی دار بود.

تاثیر توام لیزر و کافئیک اسید و مقایسه آن با محیط-های شاهد در نمودار ۲ ارائه شده است. در محیط‌هایی که تحت تابش لیزر به مدت ۱، ۲ و ۳ دقیقه و توام با غلظت ٦/٥ میلی مولار کافئیک اسید قرار گرفتند درصد کلنی‌های رشد یافته به ترتیب ۷/۱۷±٤٦/٦۹٪ و ۸/٤٤ ±٤۲/۳٪ و ۸/۲۲ ±۲۹/٦۲٪ بود. نمونه‌هایی که به مدت ۳ دقیقه تحت تاش لیزر بودند با دو گروه قبلی تفاوت معنی دار (P<۰/۰۰۰۱) داشت. هر سه گروه آزمایش با گروه شاهد نیز تفاوت معنی دار (P<۰/۰۰۰۱) داشتند.

درصد کلنی نمونه‌هایی که تحت اثر توأم تابش لیزر به مدت ۱، ۲ و ۳ دقیقه و غلظت کافئیک اسید ٦/٧٥ میلی مولار قرار داشتند (نمودار ۲) نسبت به گروه شاهد به ترتیب ۱٤/۱٤/٤٤±٤۷/۸۳٪ و ۱۲/٦۲±۳٥/٤٥ ٪ و ۲٦/٤٥±۱۳/۱ ٪ کاهش معنی دار داشت (P<۰/۰۰۰۱).



نمودار ۲: درصد رشد کلنی در معرض توأم کافئیک اسید ٦/٥ و ٦/٧٥ میلی مولار و تابش لیزر قرمز با طول موج ٦٣٢ نانومتر و توان ۲ میلی وات در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه

بحث :

مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد لیزر هلیوم نئون گازی ٦٣٠ نانومتری، ۲ میلی وات می تواند به‌طور معنی دار بر کاهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر باشد. به‌علاوه، کافئیک اسید حداقل غلظت مهاری ۷ میلی مولار را نشان داد و در غلظت های کمتر از آن یعنی ٦/٥و٦/٧٥ میلی مولار نیز کاهش وابسته به غلظت و معنی دار نشان داد. کاربرد توام کافئیک اسید و لیزر نیز کاهش معنی دار کلنی ها را در مقایسه با تیمار هر کدام به تنهایی نشان داد. Wilson و Pratten نیز از یک لیزر یدگالیوم- آلومینیوم-آرسنایدعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند. نتیجه آن کاهش در تعداد کلنی بود(۳). لیزرهای کم توان در مطالعات دیگری هم بررسی شده‌اند. مطالعه Simoes and nabuco نشان داد که این لیزرها بر بهبود زخم‌های ناشی از سوختگی و تاثیر روند ترمیم آنها اثر مثبت دارند (١٤). لیزرهای کم توان GA.AS بر نمونه‌هایی مانند استرپتوکوک و لاکتوباسیل اثر مهاری دارد. این لیزر به شکل موثری در محیط آزمایشگاه تعداد باکتری های را کاهش می دهد(١٥). رد پای اثر باکتری کشی (باکتریسیدال) لیزرها در دندانپزشکی نیز مشاهده شده است. Kersler and etal در سال ۲۰۰۲ ضمن مطالعه اثرات ضد باکتریایی Nd:Yag روی سطح ایمپلنت‌های دندان

جهت جلوگیری از تجمع پلاک میکربی دور ایمپلنت ها از لیزر استفاده کردند. (۱۶) همچنین در سال ۲۰۰۳ به بررسی اثرات ضد باکتریایی لیزر ۸۰۹ نانومتری گالیوم- آلومینیوم -آرسناید بر روی باکتری‌های جدا شده از کانال دندان پرداختند. استفاده توام از حساس کننده‌ها مثل آب اکسیژنه و هیپوکلریت سدیم همراه با لیزر را مناسب تر یافتند(۵،۱۷). مطالعه Hass بر روی میکروارگانیسم‌های جدا شده از دهان نشان دادکه لیزر دیود با طول موج ۹۰۵ نانومتر به مدت ۱ دقیقه اثرات کشندگی نشان می دهد. اثر این لیزر در استفاده از حساس کننده ها تقویت گردید(۱۸).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که لیزر هیلوم نئون با توان ۲ میلی وات می تواند بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های سوختگی موثر واقع شود. به‌طوری که با افزایش مدت زمان تابش لیزر بر باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی تعداد کلنی ها به میزان بیشتری کاهش می یابد. این نتایج همگی با یافته‌های مطالعات فوق نیز مطابقت دارند. Nussbaum and etal نیز به بررسی اثرات لیزر درمانی کم توان با طول موج های ۸۱۰،۶۳۰ و۶۶۰ نانومتر در انرژی‌های بین ۱-۵۰ ژول بر سانتی متر مربع روی *استافیلوکوکوس اورئوس* ، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* که از زخم‌های عفونی جدا شده بود، پرداختند. آنها نشان دادند که در طول موج ۶۳۰ نانومتری و انرژی ۲۰- ۱ ژول بر سانتی متر مربع کاهش رشد باکتری ها بیشتر می شود(۱۹). در رابطه با همین موضوع Folwaczny نیز ۶ گونه باکتری‌های *اشریشیاکلی* ،*استرپتوکوکوس فکالیس* ،*استافیلوکوکوس اورئوس* ،*لاکتو باسیلوس* ، *سالمونلا تیفی موریوم* و *دینوکوکوس* را تحت اثر دوزهای مختلف لیزر ۳۰۸ نانومتری قرار دادند. در رشد باکتری‌ها ۹۹.۹ درصد کاهش ها مشاهده شد(۲۰).

از طرفی دیگر در برخی مطالعات اثرات لیزر را همراه با ماده‌های حساس کننده به نور بر روی باکتری‌ها نشان دادند. گزارش شده که حساس سازی با TBO (Toluidine blue O)و تابش لیزر کم توان بر چند گونه باکتری اثر باکتری کشی را به دنبال دارد(۳، ۵). Wilson and etal هم از ماده‌ای به نام آلومینیوم و فتالوسیانین دی سولفات به عنوان حساس کننده نوری استفاده کردند(۳). مواجه کردن یک سلول با نور لیزر سبب تسریع انتقال الکترون در بعضی مناطق زنجیره تنفسی می شود. در دوزهای بالاتر این انرژی برانگیخته به اکسیژن منتقل می‌شود و اکسیژن رادیکالی به وجود می‌آورد. در سلول‌های فاقد TBO ، فلاوین و سیتوکروم‌های زنجیره انتقال الکترون به عنوان حساس کننده به نور عمل می کنند. از طرفی عوامل رنگ کننده که می تواند اشعه را جذب کند به اجزای سلولی متصل می‌شود و بدین وسیله امکان جذب بیشتر لیزر را فراهم می کند. در این مطالعه احتمالاً کافئیک اسید نیز می‌تواند عملکردی مشابه یک حساس کننده داشته باشد، البته این عملکرد غیر از اثر باکتری کشی ذاتی آن است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، شاید بتوان این نظریه را مطرح کرد که وقتی باکتری در مجاورت این ماده قرار می گیرد به نور لیزر حساس تر می شود. در عین حال نباید ازاین نکته غافل شویم که در این بررسی کافئیک اسید به تنهایی اثر باکتری کشی داشت. در این رابطه Ozlem Yildrim نیز به بررسی اثرات پروپولیس که از مشتقات کافئیک اسیداست پرداختند. این ماده نیز مانند کافئیک اسید اثرات مهار کننده بر رشد باکتری داشت. مشتق دیگر کافئیک اسید یعنی کافئیک اسید فنتیل استر (CAPE) نیز می تواند اثر ضد التهابی داشته باشد (۲۱). استفاده از کافئیک اسید و لیزر کم توان He-Ne به‌طور همزمان اثرات کاهش رشد بکتری را تقویت نموده است. غلظت کافئیک اسید ۶/۵ و ۶/۷۵ میلی مولار و مدت زمان تابش لیزر هلیوم نئون کم توان با توان ۲ میلی وات و طول موج ۶۳۰ نانومتر به ترتیب ۱ ، ۲ و ۳ دقیقه در نظر گرفته شد. به ترتیب هرچه

زمان بالاتر می‌شد ، تعداد کلنی ها نیز کـاهش بیشـتری می یافت.

نتیجه گیری :

نتایج مطالعه حاضر حاکی است که لیزرHe-Ne بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مهار کننده دارد. هـر چـه زمان تابش لیزر افزایش یابد، درصـد رشـد بـاکتری‌هـا کمتر می شود. علاوه بر این، نشان داده شد که کـاربرد کافئیک اسید در محیط رشد باکتری های ذکر شـده بـه شکل موثر جمعیت باکتریایی را کاهش می دهد. آنچـه از اهمیت بیشتری بر خوردار است، وجود سینرژیسم بین لیزر و کافئیک اسید به‌طور همزمان در کـاهش توانـایی تکثیر باکتری است. این یافته می تواند به دلیل تشـدید فعالیت باکتری‌کشی کافئیک اسید به دنبال تـابش پرتـو لیزر و یا حساس شدن باکتری به پرتو لیزر در مجاورت کافئیک اسید باشد. لذا، با توجه به امکان کاربرد کافئیک اسید به صورت in vivo (خـوراکی، موضـعی) و نیـز موثر بودن لیزر بر افزایش سرعت ترمیم بافت‌های آسیب دیده در سوختگی و نیز اثر بـاکتری‌کشـی آن، تکمیـل مطالعه حاضر با مطالعات in vivo پیشنهاد می گردد.

سپاسگذاری و تشکر:

از همکاران محترم مرکز تحقیقـات سـلولی-مولکـولی دانشگاه، گروه میکـروب شناسـی و حمایـت معاونـت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قـزوین تشـکر و قدردانی می گردد.

فهرست مراجع :

۱- موسویان م ، *مروری بر میکروب‌شناسی باکتریها و بیماریهای باکتریایی*- اول بهار ،۱۳۸۳، دانشگاه علوم پزشکی اهواز،۲۵۳ تا۲۶۱.

2- Boyd R, (1988). General Microbiology . 2nd ed. Wirtz, va : times Mirror / Mosby college publishing.

3- Wilson M, Pratten J .Sensitization of Staphylococcus aureus to killing by low power laser light. J Antimicrob Chemother .1994; **33**:619-624.

4- khosravi AD, Rostamian J, and Moradine gad P. (2008). In vestigation of bactericidal effect of low level laser of galium – aluminium - arsenide on cariogenic species of streptococci and lactobacillus. Medical Science **8**(6):579-582.

5- Dobson J, Wilson M. (1992),Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low – power laser. Arch Oral Biol.**37**:883-887.

6- Kura T. (1996).The science of low power laser therapy garden and breach science publisher.

7- Kishimoto, N., Kakino, Y., Iwai, K., Mochida, K. & fujita, T. (2005).In vitro antibacterial, antimutagenic and anti – influenza virus activity of caffeic acid and phenethyl ester. Biocontrol Sci **10:**155-161.

8- J.J. Macheix, A. Fleuriet, J. Billot (Eds.), Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 20–34.

9- Bowles, B.L., Miller, A.J. (1994). J Caffeic Acid Activity Against Clostridium botulinum Spores. Food Sci. **59:** 905–908.

10- Valenta, C., Schwarz, E., Bernkop-Schnu¨ rch, A. (1998). Lysozyme-caffeic acid conju- gates: possible novel preservatives for dermal formulations. Int. J. Pharm. **174**:125–132.

11- King, P.J., Ma, G., Miao, W., Jia, Q., McDougall, B.R., Reinecke, M.G., Cornell, C., Kuan, J., Kim, T.R., Robinson, W.E. (1999). Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. J. Med. Chem. **42**: 497–509.

12- Noriaki, K., Yukari, K., Kazuya, I., Kyo, M., Tokio, F. (2005) Invitro antibacterial, ant-influenza virus activity of

caffeic acid phenethyl esters. Biocontrol Sci. **10**: 155–161.

13- Almajano, M.P., Carbo´, R., Delgado, M.E., Gordon, M.H. (2007) Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *J. Food Sci. 72: 258–263.*

14- Simoes Riberio M, Texeria Basilva D, Nabuco De Ayaugo. (2004). Effects of low Intensity polarized visible laser radiation on skin burns : A light microscopy study. Journal of clinical Laser Medicine and Surgery. **22**:59-66.

15- Malik, Z., Hanania, J. & Nitzan, Y. (1990). Bactericidal effects pf photo activated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. Journal of Photochemistry and photobiology **5**: 281-93.

16-Kresler .M, (2002). Bactericidal effect of Er:YAG laser on dental implant surface an invitro study .Journal of priodentology. **73**(11):1292-1298.

17- Okamoto H, Iwase T, Morioka T. (1992).Dye – mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. Laser Surg Mwd. **12**:450-458.

18-Hass R, Dortbudak O, Mensdorff N, Mailath G, (1997).Elimination of bacteria on different implant surface through photosensitization and soft laser An in vitro study.Clinical oral implant research. **8**(4):249-254.

19- Nussbaum EL, Biemann. (1994).Comparison of ultrasound / ultraviolet – C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury phys ther.**74**:812-823.

20- Folwaczny M, Liesenhoff T, Lehn N, Horch H. (1998). Bactericidal action of 308 nm excimer-laser radiation: An in vitro investigation. Journal of Endodentitis .**24**(12):781-785.

21- Ozlem Yildrim, Ayca Yilma, Ozayoz, Halil Vataneserver, Leyla Gonal Aslan. (2007). Effect of caffeic acid phenethyl ester on treatment of experimentally induced methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis endophthalmitis in a rabbit model. Cell Biochem function **25**:693-700.