

بررسی اثر لیزر کم توان دیود با طول موج های ۶۸۵ و ۸۳۰ نانومتر بر روی رشد قارچ تریکوفیتون روبروم در شرایط آزمایشگاهی

خلاصه

دکتر سید مجتبی سیدموسوی^۱

دکتر سید جمال هاشمی^۲

دکتر ساسان رضایی^۲

دکتر محسن فاتح^۳

دکتر لیلا عطایی فشمی^۴

مقدمه: تریکوفیتون روبروم یکی از عوامل عمده و شایع درماتوفیتوزیس در دنیا و ایران می باشد که توانایی تهاجم به بافت های کراتین دار مو، پوست و ناخن انسان و حیوانات را دارد. با توجه به ناکارآمدی، عودکننده و گران قیمت بودن درمان دارویی عفونت های درماتوفیتی، محققان همیشه به دنبال راهکارهایی هستند که بتوان از آن روش ها در کنار درمان های دارویی متداول برای درمان و کنترل عفونت های درماتوفیتی استفاده کرد. لذا، در این مطالعه اثر لیزر کم توان دیود بر روی قارچ تریکوفیتون روبروم در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه که در شرایط آزمایشگاهی انجام شد، ابتدا قارچ تریکوفیتون روبروم، بر روی پتری دیش های حاوی محیط کشت سابورو دکستروز آگار، کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید کشت داده شد. سپس ۴ گروه از نمونه های قارچی مورد نظر که در هر گروه ۱۲ پتری دیش قرار داشت توسط لیزر کم توان دیود با طول موج ۶۸۵ نانومتر و توان ۲۵ میلی وات به ترتیب با انرژی های ۵، ۳، ۱۰ و ۲۰ J/cm^2 مورد تابش قرار گرفتند. پنج گروه هم با طول موج ۸۳۰ نانومتر و توان ۲۰۰ میلی وات به ترتیب با انرژی های ۵، ۳، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ J/cm^2 مورد تابش قرار گرفتند و یک سری دوازده تایی نمونه بدون تابش هم به عنوان شاهد (کنترل) مدنظر قرار گرفت و در پایان، ممانعت یا مهار رشد سوبیه قارچی، تغییرات مرفولوژیک ماکروسکوپی و میکروسکوپی، حساسیت دارویی و تغییرات ژنومی نمونه های مورد آزمایش در مقایسه با نمونه های شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج به دست آمده در کلیه مراحل آزمایش نشان دهنده رشد کلنی های قارچ های تریکوفیتون روبروم در تمام گروه ها بود و در هیچ یک از گروه های مورد مقایسه شامل لیزر ۶۸۵ نانومتر، ۸۳۰ نانومتر و شاهد اختلاف معنی داری به دست نیامد. اما، نکته قابل توجه این است که کیفیت این رشد در بین گروه های لیزر تابانده و شاهد تغییر نموده است که بیشترین تغییرات در دزهای مساوی و بالاتر از $10 J/cm^2$ طول موج های ۶۸۵ نانومتر و $830 J/cm^2$ نانومتر دیده شده است که در این میان دز $20 J/cm^2$ طول موج ۶۸۵ نانومتر و دز $30 J/cm^2$ طول موج ۸۳۰ نانومتر در اکثر گروه ها بیشترین اثرها را نسبت به گروه شاهد داشته اند.

نتیجه گیری: از یافته های مطالعه حاضر نتیجه گیری می شود که اشعه لیزر با طول موج های به کار گرفته شده در این تحقیق، رشد قارچ تریکوفیتون روبروم را مهار نمی کند، ولی با یک رفتار وابسته به دز در ایجاد تغییرات روی قارچ تریکوفیتون روبروم در شرایط آزمایشگاهی تأثیر می گذارد که به نظر می رسد این تغییرات در سطح پروتئین ها و احتمالاً پس از بیان ژن می باشند.

واژه های کلیدی: رشد، تریکوفیتون روبروم، لیزر درمانی کم توان، شرایط آزمایشگاهی.

^۱ دکترای تخصصی قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران. و استادیار گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

^۲ دانشیار گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ گروه پزشکی لیزر پزشکی مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

^۴ استادیار پوست و مو، گروه پژوهشی لیزر پزشکی مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: دکتر لیلا عطایی فشمی
مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران. تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۹۰۸۵۵
پست الکترونیک: ataie_fash@yahoo.com

مقدمه

تریکوفیتون روبروم یکی از سه گونه غالب عامل درماتوفیتوزیس در دنیا و ایران می باشد که توانایی تهاجم به بافت های کراتین دار مو، پوست و ناخن انسان و حیوانات را دارد و اشکال مختلف ضایعه درماتوفیتوزیس (کچلی ناخن، کچلی پا و ...) را ایجاد می کند [۱-۵].

درمان دارویی عفونت های درماتوفیتی مخصوصاً کچلی ناخن ناکارآمد، غالباً منجر به شکست و عودکننده می باشد، از طرف دیگر داروهای ضدقارچ محدود، کم اثر و گران قیمت هستند [۱و۲]. بنابراین محققان همیشه به دنبال راهکارهایی هستند که بتوان از آن روش ها در کنار درمان های دارویی متداول برای

بیولوژیک آن‌ها در زمینه درمان استفاده می‌شود، [۱۳] چگونه در دزهای مختلف در کنترل و از بین بردن این قارچ در شرایط آزمایشگاهی اثر دارند.

روش بررسی

طرز تهیه و شناسایی قارچ تریکوفیتون روبروم:

نمونه قارچی به کار رفته در این تحقیق از نمونه‌های بالینی بیماران مشکوک به عفونت قارچی جلدی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا شد. به این ترتیب که از کشت‌های مثبت از نظر قارچ تریکوفیتون روبروم تعدادی انتخاب گردید و پس از انجام تست‌های تکمیلی (بررسی میکروسکوپی به روش اسلاید کالچر، تست فیزیولوژیک اوره آگار، تست تغذیه‌ای تریکوفیتون آگار و تست سوراخ کردن مو) کلنی‌هایی که جهت تأیید بهترین مشخصه داشتند، به عنوان نمونه ما در (Stock) انتخاب نهایی شدند سپس برای کشت نمونه قارچی مورد نظر از محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلو هگزامید (SCC) استفاده شد، به این صورت که ابتدا زیر هود به کمک پی‌پت از ارلن حاوی محیط استریل برداشت نموده و درون هریک از پلیت‌های پلاستیکی استریل که دارای قطری برابر ۹ سانتی‌متر بود به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر اضافه نموده و چند ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری کردیم تا محیط‌ها خنک‌شده و ببندند. پس از خنک‌شدن، در شرایط کاملاً استریل از نمونه قارچی تأیید شده توسط پانچری استریل به قطر ۶ میلی‌متر کلنی را برداشت کرده و پلاک‌های دایره‌ای از کلنی را توسط آنس استریل در کنار شعله و زیر هود میکروبیولوژی بر روی پلیت‌های جدید منتقل کردیم، پس از انتقال پانچری‌های استریل بر روی پلیت‌های حاوی محیط، نمونه‌های قارچی مورد مطالعه به ترتیب اشعه‌دهی گردیدند.

گروه‌بندی نمونه‌ها

گروه‌های مورد مطالعه شامل ۱۰ گروه بودند: گروه ۱ (شاهد)، گروه ۲ تا ۵ (لیزر ۶۸۵ نانومتر به ترتیب در چگالی انرژی‌های ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع) و گروه ۶ تا ۱۰ (لیزر ۸۳۰ نانومتر به ترتیب در چگالی انرژی‌های ۳، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ ژول بر سانتی‌متر مربع) که در هر گروه ۱۲ پتری دیش برای هر یک از اندازه‌گیری‌ها تهیه شد.

درمان و کنترل عفونت‌های قارچی استفاده کرد.

چنانکه نیکو لوپولوس و همکارانش در سال ۱۹۹۹ از روش لیزردرمانی با لیزر هلیوم-نون و لیزر گالیوم-آلومینیوم آرسناید در درمان ناخن‌های مبتلا به انیکومایکوزیز متعاقب دبریدمنت (برداشت جراحی) ناخن‌های آلوده ۷۳ بیمار استفاده و فاکتورهای مشخصی از جمله عود بیماری، میزان التیام و زمان بهبود را بررسی نمودند، در پایان، نتیجه‌گیری کردند که لیزردرمانی کم‌توان سبب بهبود سریع‌تر این عفونت می‌شود و برگشت‌پذیری کمتری دارد [۶].

علاوه بر آن از برخی مطالعات نتیجه‌گیری شده است که استفاده از لیزرهای کم‌توان (Low Level Laser Therapy, LLLT) در کنترل عفونت ناشی از قارچ‌ها از جمله استوماتیت ناشی از دندان‌های مصنوعی (Denture Stomatitis) می‌تواند مؤثر واقع شود [۷ و ۸].

همچنین از LLLT در درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه در تسریع بهبود زخم‌های مزمن و بیماری‌های عضلانی-استخوانی استفاده شده است که امروزه جایگاه مطمئنی را در بین اجزای طب فیزیکی برای خود باز نموده است [۹-۱۳].

LLLT قادر است بدون اثرهای حرارتی (حداکثر افزایش ۰/۵ درجه سانتی‌گراد حرارت) در سطح سلول و بافت، اثرهای فتوشیمیایی ایجاد نماید. لیزرهای کم‌توان قادر هستند بر روی فعالیت برخی سلول‌ها از جمله ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها اثرهای مهاری یا تحریکی ایجاد نمایند [۱۲] همچنین برخی از مطالعات نشان داده‌اند که LLLT بر روی میکروارگانیسم‌ها مثل باکتری‌ها در شرایط بالینی و آزمایشگاهی می‌تواند اثرهای مهاری داشته باشد و در درمان برخی از شرایط بالینی ناشی از آن‌ها سودمند واقع گردد [۱۳].

در بررسی دیگری که توسط نویسندگان این مقاله بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس انجام گرفت، نشان داده شد که که اشعه لیزر با طول موج‌های درمانی به‌طور مستقل سبب ایجاد تغییراتی بر روی رشد این قارچ می‌شود [۱۴]. لذا، با توجه به نتایج به‌دست آمده از تحقیق فوق‌الذکر، در این مطالعه نیز اثر تابش پرتو لیزر کم‌توان دیوید در دو طیف طول موج ۶۸۵ نانومتر (طیف نور سرخ با عمق نفوذ کمتر) و ۸۳۰ نانومتر (طیف نور فرو سرخ با عمق نفوذ بیشتر)، بر روی قارچ تریکوفیتون روبروم عامل اصلی درماتوفیتوزیس به‌خصوص در ناخن‌ها [۱ و ۲] بررسی گردید تا مشخص شود که این دو طول موج که امروزه از اثرهای

روش‌های اندازه‌گیری

به‌طور کلی اندازه‌گیری پیامد ناشی از تابش لیزر و شاهد بر روی تریکوفیتون روبروم، شامل بررسی رشد یا ممانعت از رشد، تغییرات ماکروسکوپی، تغییرات میکروسکوپی، حساسیت دارویی و بررسی آپوپتوزیس بود.

بررسی تغییرات ماکروسکوپی

جهت بررسی تغییرات ماکروسکوپی پس از تابش اشعه به گروه‌های مورد مطالعه، پلیت‌ها به مدت ۲۱ روز در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند و در نهایت (۱) مثبت یا منفی بودن (رشد ۲) اندازه قطر کلنی رشد یافته با استفاده از خط‌کش و بر حسب میلی‌متر (۳) تغییرات نمای ظاهری کلنی‌های رشد یافته (۴) تولید رنگدانه در کلیه پتری دیش‌ها بررسی و ثبت گردید.

بررسی تغییرات میکروسکوپی

پس از تابش اشعه به گروه‌های مورد مطالعه، پلیت‌ها به مدت ۲۱ روز در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند و از نظر ایجاد ماکروکنیدی و میکروکنیدی طبیعی و غیرطبیعی، همچنین ایجاد هایف‌های طبیعی و غیرطبیعی، پیدایش فرم‌های Coil و Siral مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین تعداد ماکروکنیدی‌های آن‌ها در هر لام شمرده شد تا به‌عنوان شاخص مد نظر قرار گیرد.

بررسی حساسیت دارویی

برای انجام حساسیت دارویی از داروی کتوکونازول استفاده کردیم بدین ترتیب که ابتدا حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) قارچ تریکوفیتون-روبروم را در حضور داروی کتوکونازول به دست آوردیم؛ رقت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داروی کتوکونازول مانع رشد قارچ تریکوفیتون روبروم می‌شود. لذا، از رقت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جهت بررسی استفاده شد. چگونگی تهیه رقت دارویی مورد نظر به این صورت بود که برای تهیه محلول کتوکونازول با رقت مورد نظر، در ابتدا ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم از پودر کتوکونازول تهیه شده از هلال احمر ایران را به ترتیب در ۱۰ میلی‌لیتر متانول یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال حل کرده سپس محلول مورد نظر را به ۹۹۰ سی‌سی محیط کشت SC (سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل) برات می‌افزاییم تا رقت مورد نظر بر حسب میکروگرم در لیتر به دست آید سپس کلنی‌های پانچری شده به قطر ۶ میلی‌متر را که اشعه دیده‌اند، در کنار شعله توسط آنس

استریل به داخل هر کدام از پلیت‌های حاوی محیط SC برات انتقال داده و بر روی هر پلیت شماره گروه مورد نظر یادداشت گردید و در طی ۳ هفته در انکوباتور ۳۰-۲۵ سانتی‌گراد نگهداری و رشد کلنی‌ها بررسی گردید.

بررسی آپوپتوزیس

بعد از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، تغییرات ایجاد شده در باندهای DNA از نظر اندازه و تعداد باندها، همچنین پیدایش فرم‌های نردبانی در مولکول DNA مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که پس از تابش لیزر به گروه‌های مطالعه، کشت انبوه از هر یک از گروه‌ها صورت گرفت و DNA قارچ تریکوفیتون روبروم استخراج گردید و بر روی ژل آگارز در دستگاه الکتروفورز منتقل شد. سپس ژل به دستگاه ترانس‌لومیناتور (Transluminator) و ژل داکيومنتیشن (Gel Documentation) منتقل و هرگونه تغییر در باندهای DNA نمونه شاهد و لیزر مقایسه گردید.

روش تابش لیزر

در این مطالعه از دستگاه لیزر کم توان 3000 BTL (ساخت کشور چک) استفاده شد. پرتو لیزر کم‌توان مورد استفاده شامل دو پروب ۶۸۵ نانومتر (پرتو پیوسته با توان خروجی متوسط ۵۰ mW) و پروب ۸۳۰ نانومتر (پرتو پیوسته با توان خروجی متوسط ۴۰۰ mW) بود. با توجه به اینکه یک بار تابش از روی درب شفاف پلیت‌ها صورت می‌گرفت (به منظور کاهش آلودگی محیط کشت)، توان تابانده به کلنی‌ها توسط دستگاه توان‌سنج (ساخت شرکت Gentel Canada مدل UP19k-150 W) محاسبه شد. همچنین توسط دستگاه IR Counter Screen مسیر تابش پرتو، شعاع و راستای تابش آن مشخص گردید. در نهایت چگالی توان تابانده به کلنی‌ها در مورد پرتو لیزر ۶۸۵ نانومتر برابر با 25 mW/cm^2 به دست آمد. بنابراین برای رسیدن به دز ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع به ترتیب پتری دیش‌ها به مدت ۱۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ثانیه تحت تابش قرار گرفتند. چگالی توان تابانده شده به کلنی‌ها در مورد پرتو لیزر ۸۳۰ نانومتر برابر با 200 mW/cm^2 به دست آمد. بنابراین برای رسیدن به دز ۳، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ ژول بر سانتی‌متر مربع به ترتیب پتری دیش‌ها به مدت ۱۹، ۳۱، ۶۳، ۱۸۸ و ۳۱۳ ثانیه تحت تابش قرار گرفتند. در همه حالات پس از تابش پرتو لیزر، پلیت‌ها در تاریکی و دمای آزمایشگاه نگهداری شدند تا به کمک واکنش فتوراکتیواسیون (Photoreactivation)، آسیب‌های

احتمالی وارد شده ترمیم پیدا نکند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 11.5 تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و داده‌های کیفی به صورت فراوانی نمایش داده شده است. با استفاده از آزمون آماری توان دوم کای (Chi-square) و در صورت نیاز آزمون دقیق به روش مونت کارلو یکطرفه (Monte-1sided Carlo) و همچنین آزمون آماری به روش آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD تجزیه و تحلیل اطلاعات صورت گرفت. سطح معنی‌داری در این مطالعه در حد ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده در کلیه مراحل آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است به این ترتیب که:

کلنی‌های تمامی پلیت‌ها اعم از اشعه‌دیده و کنترل، رشد نمودند و در هیچ یک از گروه‌های تحت تابش لیزر ۶۸۵ نانومتر و ۸۳۰ نانومتر در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری به دست نیامد.

متوسط قطر کلنی در گروه کنترل ($4/8 \pm 0.1$ میلی‌متر) بود و کاهش قطر کلنی در مقایسه با گروه‌های با دز 10 J/cm^2 و 20 J/cm^2 با طول موج ۶۸۵ نانومتر و 10 J/cm^2 و 30 J/cm^2 با طول موج ۸۳۰ نانومتر دارای اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/001$). بیشترین مقدار اختلاف با دز 10 J/cm^2 طول موج ۶۸۵ نانومتر مشاهده شده است.

نمای ظاهری کلنی در گروه کنترل نرمال (کرکی - پرزی) بود، لکن در گروه‌های تابش با دز بالاتر از 3 J/cm^2 در هر دو طول موج مواردی از تغییرات (پودری شدن سطح کلنی‌ها) مشاهده شد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/001$) و بیشترین تفاوت بین گروه کنترل و دز 10 J/cm^2 در طول موج ۶۸۵ نانومتر و دزهای 30 J/cm^2 و 50 J/cm^2 طول موج ۸۳۰ نانومتر مشاهده گردید.

تغییر رنگ کلنی نسبت به گروه کنترل (قرمز پررنگ متمرکز) در گروه‌های با دز 10 J/cm^2 و 20 J/cm^2 طول موج ۶۸۵ نانومتر و 10 J/cm^2 ، 30 J/cm^2 و 50 J/cm^2 در طول موج ۸۳۰ نانومتر به صورت قرمز کم‌رنگ منتشر مشاهده شد که

بیشترین میزان با ۵۰٪ تغییر به گروه‌های 10 J/cm^2 و 10 J/cm^2 ۳۰ طول موج ۸۳۰ نانومتر مربوط است و آزمون دقیق مونت کارلو تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد.

در بررسی تغییرات میکروسکوپی علاوه بر مشاهده تغییراتی همچون پیدایش هایف‌های شفاف، هایف‌های کج و معوج و تغییر شکل داده، کاهش رشد اسلاید کالچرها، کاهش تعداد میکروکنیدی‌ها و پیدایش میسیلیوم‌های کوئل و اسپیرال ملاحظه شد. نتایج شمارش میکروکنیدی‌ها در جدول ۱ نشان می‌دهد که متوسط تعداد میکروکنیدی‌ها در گروه کنترل 3 ± 20 بوده است و تفاوت این گروه با گروه‌های 10 J/cm^2 و 20 J/cm^2 طول موج ۶۸۵ نانومتر و 5 J/cm^2 ، 10 J/cm^2 ، 30 J/cm^2 و 50 J/cm^2 در طول موج ۸۳۰ نانومتر معنی‌دار بوده است ($p < 0/001$) که بیشترین اختلاف در گروه‌های 10 J/cm^2 ۲۰ طول موج ۶۸۵ نانومتر و 10 J/cm^2 طول موج ۸۳۰ نانومتر ملاحظه شده است.

همچنین در این بررسی مشخص گردید که در رقت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کتوکونازول (MIC)، کلنی‌های تمامی پلیت‌ها اعم از اشعه‌دیده و یا کنترل، رشد نکردند و اختلافی بین گروه‌ها وجود ندارد. رقت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر کتوکونازول که در ۲۵٪ نمونه‌های گروه کنترل ممانعت ایجاد کرده است، در گروه‌های مختلف مواردی از مهار رشد ایجاد نمود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است ($p < 0/001$). بیشترین میزان این تفاوت بین گروه کنترل و گروه‌های 20 J/cm^2 طول موج ۶۸۵ نانومتر 50 J/cm^2 در طول موج ۸۳۰ نانومتر مشاهده گردید. در رقت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کتوکونازول در گروه‌های مختلف مواردی از مهار رشد مشاهده می‌شود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است ($p < 0/001$) و بیشترین تفاوت بین گروه کنترل و گروه 30 J/cm^2 در طول موج ۸۳۰ نانومتر مشاهده گردید.

انجام الکتروفورز نشان می‌دهد که در کلنی‌های تمامی پلیت‌ها اعم از اشعه‌دیده و یا کنترل، تغییراتی در مولکول DNA مشاهده نشد و اختلافی بین گروه‌ها وجود ندارد و اشعه لیزر با طول موج‌ها و دزهای به کار گرفته شده بر روی مولکول DNA قارچ تریکوفیتون روبروم تأثیر نداشته و حالت نزدبانی (آپوپتوزیس) ایجاد نکرده است.

جدول ۱: نتایج بررسی اثر لیزر کم توان دیود با طول موج‌های ۶۸۵ و ۸۳۰ نانومتر بر روی ممانعت از رشد، تغییرات ماکروسکوپی، میکروسکوپی، حساسیت دارویی و آپوپتوزیس قارچ تریکوفیتون روبروم در شرایط آزمایشگاهی.

لیزر ۸۳۰nm (J/cm^2)					لیزر ۶۸۵ nm (J/cm^2)				شاهد	متغیرها
۵۰	۳۰	۱۰	۵	۳	۲۰	۱۰	۵	۳		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	عدم رشد (%)
تغییرات ماکروسکوپی										
۴/۸±۰/۱	۳/۹±۰/۳	۳/۹±۰/۳	۴/۸±۰/۱	۴/۸±۰/۲	۳/۹۴±۰/۴	۳/۹±۰/۲	۴/۷±۰/۱	۴/۷±۰/۱	۴/۸±۰/۱	قطر کلنی (mm)
۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۸ (%۶۶/۷)	۲ (%۱۶/۷)	-	۶ (%۵۰)	۸ (%۶۶/۷)	۳ (%۲۵)	-	-	بودی شدن سطح کلنی‌ها (تغییر نمای ظاهری کلنی) (%)
۵ (%۴۱/۷)	۶ (%۵۰)	۶ (%۵۰)	-	-	۴ (%۳۳/۳)	۵ (%۴۱/۷)	-	-	-	تغییر رنگ کلنی‌ها (%)
تغییرات میکروسکوپی										
۲۸±۲	۲۸±۲	۲۹±۳	۱۷±۱	۲۰±۳	۲۹±۳	۲۹±۳	۲۰±۳	۲۱±۲	۲۰±۳	شمارش ماکروکنیدی‌ها (تعداد در هر لام)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	عدم تولید هایف‌های شفاف، کج و معوج و تغییر شکل داده (%)
حساسیت دارویی										
۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	۱۲ (%۱۰۰)	عدم رشد در رقت MIC (g/L) (۲۰μ) (%)
۱۰ (%۸۳/۳)	۸ (%۶۶/۷)	۹ (%۷۵)	۷ (%۵۸/۳)	۳ (%۲۵)	۱۰ (%۸۳/۳)	۶ (%۵۰)	۳ (%۲۵)	۴ (%۳۳/۳)	۳ (%۲۵)	عدم رشد در رقت MIC (g/L) (۱۵μ) (%)
۷ (%۵۸/۳)	۸ (%۶۶/۷)	۱ (%۵۸/۳)	۷ (%۸/۳)	۴ (%۳۳/۳)	-	۶ (%۵۰)	۳ (%۲۵)	۱ (%۸/۳)	-	% عدم رشد در یک دوم رقت MIC (g/L) (۱۰μ) (%)
آپوپتوزیس										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	بیدایش فرم‌های نردبانی در مولکول DNA (%)

بحث و نتیجه‌گیری

مختلف بالینی افزایش یافته است، لذا مروری بر پژوهش‌هایی که در زمینه اثر اشعه‌ها و امواج طیف مرئی و نامرئی نور بر روی قارچ‌ها انجام گرفته است، مشخص می‌نماید که علیرغم چند مطالعه بالینی در زمینه بررسی اثر این امواج بر روی رشد قارچ‌ها، پژوهش‌های محدودی در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است [۹ و ۸].

چنانکه نیکولو پولوس و همکارانش ابتدا بر روی ۷۳ بیمار با استفاده از لیزر جراحی CO₂ ناخن‌های مبتلا به انیکومایکوزیز را دبرید نمودند سپس از طیف نور قرمز لیزر هلیوم-نئون (طول موج ۶۳۲ نانومتر، توان ۱/۵ mw و انرژی ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع) و از طیف نور مادون قرمز لیزر گالیوم آلومینیوم آرسناید (طول موج ۸۳۰ نانومتر، توان ۵۰ mw و انرژی ۴ ژول بر سانتی‌متر مربع) برای لیزر تراپی استفاده نمودند [۶].

با توجه به اینکه قارچ‌های درماتوفیتی از جمله عوامل مهم عفونت‌زای قارچی برای انسان و حیوان می‌باشند و تریکوفیتون روبروم به‌عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده آن محسوب می‌شود، لذا مطالعه حاضر در قالب یکی دیگر از مطالعات مقدماتی در خصوص بررسی اثر لیزر کم توان دیود بر روی میکروارگانسیم‌ها، توسط گروه پژوهشی لیزر پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران با همکاری گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل طراحی و اجرا شد. به این ترتیب که در این مطالعه یک بررسی مدون و کاملاً مستدل شده و با اهداف مشخص در خصوص اثر لیزر کم توان دیود با طول موج ۶۸۵ و ۸۳۰ نانومتر بر روی قارچ تریکوفیتون روبروم در شرایط آزمایشگاهی (In Vitro) مورد ارزیابی قرار گرفت.

با توجه به اینکه امروزه تمایل به استفاده از لیزر در شرایط

قارچ به طور نسبی مهار شده و کیفیت فرآیند رشد در بین اکثر گروه‌های لیزر تابانده و گروه شاهد تغییر نموده است؛ به این ترتیب که دز 20 J/cm^2 طول موج 685 nm و دز 30 J/cm^2 طول موج 830 nm در اکثر گروه‌ها بیشترین اثرها را نسبت به گروه شاهد داشته‌اند و به نظر می‌رسد که این دزهای تابش، مناسب‌تر و مؤثرتر از دیگر دزهای مورد مطالعه بوده است.

در تحقیق حاضر نیز سعی شد تا با استفاده از نتایج مطالعه قبلی به بررسی اثر لیزر کم توان دیود بر روی قارچ رشته‌ای درماتوفیتی تریکوفیتون روبروم بپردازیم تا روند ایجاد تغییرات از نظر رشد یا عدم رشد، تغییرات ماکروسکوپی، میکروسکوپی، حساسیت دارویی و تغییرات ژنومی به طور مستقل بررسی شوند. همانطور که در جدول شماره ۱ دیده می‌شود، کلنی‌های تمامی پلیت‌ها اعم از اشعه‌دیده و یا کنترل، رشد نمودند ولی بررسی روند تغییرات به این ترتیب است که بیشترین توزیع قطر کلنی در چگالی انرژی 10 J/cm^2 طول موج 685 nm دیده شده است.

در مورد تغییر نمای کلنی، بیشترین تفاوت در دزهای 30 J/cm^2 و 50 J/cm^2 طول موج 830 nm و بیشترین میزان تغییر رنگ کلنی‌ها با 50% تغییر به گروه‌های 10 J/cm^2 و 30 J/cm^2 طول موج 830 nm نانومتر مربوط است و نتایج شمارش ماکروکنیدی‌ها نشان می‌دهد که بیشترین اختلاف در گروه‌های 20 J/cm^2 طول موج 685 nm و 10 J/cm^2 طول موج 830 nm نانومتر ملاحظه شده است. و در بررسی حساسیت دارویی بیشترین تفاوت بین گروه کنترل و گروه 30 J/cm^2 در طول موج 830 nm نانومتر مشاهده گردید.

لذا، در مجموع بیشترین تغییرات در دزهای مساوی و بالاتر از 10 J/cm^2 طول موج‌های 685 nm و 830 nm دیده شده است که در این میان دز 20 J/cm^2 طول موج 685 nm نانومتر دز 30 J/cm^2 طول موج 830 nm در اکثر گروه‌ها بیشترین اثرها را نسبت به گروه شاهد داشته‌اند. اما، روی شاخص‌های رشدی تولید هایف‌های تغییر شکل داده و آپوتوزیس هیچ تأثیری نداشته است (جدول ۱). که نتایج مطالعه اخیر با نتایج بررسی تأثیر رشد قارچ مخمری کاندیدا آلبیکنس کاملاً مطابقت دارد.

همچنین باتوجه به اینکه فرم‌های نردبانی در مولکول DNA ایجاد نشده است، می‌توان چنین بیان کرد که پرتو لیزر با طول موج‌های درمانی به کار گرفته شده این تحقیق نیز به طور مستقل دارای تأثیر بر روی قارچ‌ها می‌باشد که این تغییرات در

بوداک و همکارانش در سال ۲۰۰۰ به مدت ۳-۲ هفته امواج مغناطیسی و لیزر آرگون را به طور توأم و مجزا روی پلیت‌های حاوی قارچ‌های بیماری‌زای تریکوفیتون روبروم، میکروسپوروم کنیس، تریکوفیتون منتاگروفیتز و اسکوپولاریوپسیس برویکالیس که از پوست و ناخن بیماران جداسازی شده بودند، تاباندند و نتیجه‌گیری نمودند که اثر مهار رشدی (فونجی‌استات) امواج مغناطیسی نسبت به لیزر بیشتر است. این محققان در پایان این مطالعه بالینی، مؤثر بودن لیزر را بر روی بیماری‌های قارچی سطحی و جلدی پیشنهاد نمودند [۱۵].

بیسکانین و همکارانش بر روی دو بیمار مبتلا به بیماری Denture Stomatitis آثار طول موج‌های 685 nm و 830 nm نانومتر لیزر درمانی کم توان را مورد بررسی قرار دادند به این صورت که با طول موج 830 nm نانومتر با انرژی ۳ ژول و توان ۶۰ میلی‌وات به مدت ۵ دقیقه و با طول موج 685 nm نانومتر با انرژی ۳ ژول و توان ۳۰ mw به مدت ۱۰ دقیقه تابش انجام شد. پس از تابش لیزر، از قارچ‌های ناحیه ضایعه‌دار لیزر تابانده شده، توسط سوآپ نمونه‌گیری شد و سوآپ‌ها بر روی پلیت‌های حاوی آگار کشت داده شدند و پس از رشد، کلنی‌های ایجاد شده شمارش گردیدند. نتیجه این بررسی نشان داد که تابش لیزر کم توان سبب کاهش تعداد کلنی‌های کاندیدا بر روی ژل آگار می‌شود و همچنین التهاب موضع کاهش پیدا می‌کند [۱۶].

همین محققان در مطالعه‌ای دیگر این روش را بر روی ۷۰ بیمار بررسی نمودند با این تفاوت که علاوه بر لیزر، داروهای ضد قارچی را هم به کار بردند در نتیجه پیشنهاد نمودند که اثر قارچ‌کشی لیزر دیود با طول موج‌های 685 nm و 830 nm نانومتر در بیماران مبتلا به بیماری Denture Stomatitis در گروه لیزر همراه با دارو بیشتر از سایر گروه‌ها می‌باشد [۱۷]. در این مطالعه که اثرهای بالینی لیزرهای کم توان را بر روی عفونت‌های قارچی مطالعه نموده بود، پیشنهاد گردید مطالعه‌ای در خصوص بررسی اثرهای لیزر روی قارچ‌ها در شرایط آزمایشگاهی انجام شود. لذا،

بر پایه همین اطلاعات بالینی در ابتدا به بررسی اثر لیزر کم توان دیود با طول موج‌های 685 nm و 830 nm نانومتر بر روی رشد قارچ مخمری کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی پرداختیم که نتایج آن نشان می‌دهد علیرغم اینکه لیزر درمانی کم توان با طول موج‌های 685 nm نانومتر و 830 nm نانومتر نمی‌تواند فرآیند رشد کاندیدا آلبیکنس را در شرایط آزمایشگاهی به طور کامل مهار کند، لیکن در چگالی انرژی‌های خاص شاخص‌های رشد این

در این تحقیق، رشد قارچ تریکوفیتون روبروم را مهار نمی‌کند.

تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از زحمات جناب آقای دکتر غلامرضا اسماعیلی جاوید عضو محترم هیئت علمی و سرکارخانم سلامی کارشناس محترم مرکز لیزر پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران و جناب آقای فرهاد مرسلی کارشناس محترم گروه قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

References:

1. Richardson M. Fungal infection diagnosis and management. 3rd ed. Blakwell :Massachusetts, 2003: 80-107.
2. Wietzman I, Summerbell RC. The Dermatophytes. Clinical Microbiology Reviews 1995; 8(2): 240-59.
3. Khosravi AR, Aghamirian MR, Mahmoudi M. Dermatophytoses in Iran. Mycoses 1994; 37(1-2): 43-8.
4. Khosravi AR, Mahmoudi M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. Mycoses 2003; 46(5-6): 222-5.
5. Falahati M, Akhlaghi L, Rastegar Lari A, Alagheband R. Epidemiology of Dermatophytoses in an Area South of Tehran, Iran. Mycopathologia 2003; 156(4): 279-87.
6. Nicolopoulos CS, Tsioutis V, Nicolopoulos N S, Giannodis P V. Clinical application of He-Neon (632nm) plus infrared diode laser GaAlAs(830nm) and co2 lasers in treatment of onychomycotic nails. The Foot 1999; 9(4): 181-4.
7. Cora G, Saltarelli C, Paveljack C. Effect of light on growth and methabolite synthesis in candida albicans. Mycologia 1977; 71: 773-85.
8. Wilson M, Mia N. Sensitisation of candida albicans to killing by low power laser light. J Oral Pathol Med 1993; 22(8): 354-7.
9. Baxter J D. Therapeutic lasers-Theory and Practice Churchill living stone 1999.

سطح پروتئین‌ها و احتمالاً پس از بیان ژن‌های سنتزکننده پروتئین‌ها می‌باشند زیرا دزهای استفاده‌شده هیچ اثری روی ژنوم قارچ تریکوفیتون روبروم ندارد و تحت شرایط ایجادشده پدیده آپوتیوزیس ایجاد نشده است.

از نتایج مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که لیزر کم‌توان دیود با یک رفتار وابسته به دز در ایجاد تغییرات روی قارچ تریکوفیتون روبروم در شرایط آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد و برپایه این مطالعات به نظر می‌رسد که تابش پرتو لیزر کم‌توان می‌تواند کیفیت رشد قارچ تریکوفیتون روبروم را تغییر دهد. اما، همانطور که در نتایج آمده است طول‌موج‌های به‌کار گرفته‌شده

منابع:

10. Karu T. The science of low power laser therapy. Gordon and breach science publishers 1996.
11. Master E, Master AF. The biomedical effects of laser application. Lasers Surg Med 1985; 5: 31-9.
12. Simonovic Z. lasers in medicine& Dentistry. Basic Science and up to date clinical application of low energy Level laser therapy. Vita graff 2000.
- 13- Tuner J, Hode L. laser therapy: Clinicad practice and scentific Background. Prima Books 2002.
- ۱۴- سیدموسوی سیدمجتبی، عطایی لایلا، رضایی ساسان، فاتح محسن، هاشمی سید جمال. بررسی اثر لیزر کم‌توان دیود با طول موج‌های ۶۸۵ و ۸۳۰ نانومتر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. لیزر پزشکی ۱۳۸۵، ۴، ۴-۱۱.
- 15- Budak A, Zyss T, Bogusz B, Dobrowolski J W, Opiola P. The Estimation of the influence of ELF magnetic field and coherent laser irradiation, applied separately and together, on the fungi growth. Mycologia 2002; 7(3): 123-6.
- 16- Biscanin M M, Stipetic M M, Jerolimov V J, Biscanin A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. Laser in Surgery and Medicine 2004; 35: 259-2.
- 17- Biscanin M M, Stipetic M M, Jerolimov V J. Effect of low level laser therapy on candida albicans growth in patients with denture stomatitis. Photomed Laser Surgery 2005; 23(3): 328-32.