ABSTRACT

The increasing possibility of the development of *Pseudomonas aeruginosa* resistant strains beside the few available effective antipseudomonal antibiotics have stimulated the search for an alternative method for treating and eradicating Pseudomonal infections.

The invention and the increasing use of laser in medicine made it quite logical to introduce laser as a possible method for treating wound infections due to *P. aeruginosa*.

This research has two approaches:

1- Studying the effect of 805 nm diode laser on the viability and extracellular products of *P. aeruginosa*.

2- Studying the effect of filtered broth of irradiated bacteria on neutrophil cells chemotaxis.

Thirty three samples of wounds and burns were collected from patients in Al-Yarmouk Teaching Hospital in Baghdad. The results of bacteria isolation and identification showed that *P. aeruginosa* were 10 out of total samples (ratio 30.3 %). The isolate number 14 that gave highest extracellular protein concentration after over night incubation in brain heart infusion broth was chosen for laser exposure.

Bacteria were exposed to 805 nm diode laser using four powers (0.94, 1.49, 2.01 and 2.76 W) for different exposure intervals for each power, after over night incubation bacteria surviving, viability, concentration of extracellular protein, proteolytic enzymes specific activity and hemolysin activity were measured. The results showed that the 805 nm diode laser was lethal at 8, 5, 2 and 2 minutes exposure times for the power densities 1.87, 2.96, 4.0 and 5.49 W/cm^2 respectively.

P. aeruginosa viable counts had different results compared with control. Energy density range from 178.8 to 357.6 J/cm^2 showed significant ($P<0.05$) activation effect for 178.8 J/cm^2, and non significant ($P>0.05$) activation effect for the energy densities 225.6, 241.2, 331.2, 338.4 and 357.6 J/cm^2,while energy densities out of this range showed significant ($P<0.05$) decreasing in the viable count.

The extracellular protein concentrations were greater than control at all exposure times and for all power densities. The amount of proteolytic enzyme

(concluded from it's specific activity) was also higher significantly ($P<0.05$) (for the power densities 1.87 W/cm^2 at 3^{ed} minute and 2.96 W/cm^2 at 2^{ed}, 3^{ed}, and 4th minutes) and higher non significantly ($P>0.05$) (for the power densities 1.87 W/cm^2 at 1st, 2^{ed}, 4th, 5th minutes and 2.96 W/cm^2 at 1st minute and 4.0 W/cm^2 at 1st minute and 5.49 Wcm^2 at 1st minute) compared with control for all exposure times and for all power densities except at 6 and 7 minutes for power density 1.87 W/cm^2 .

Hemolysin enzyme production (also concluded from it's specific activity) was significantly ($P<0.05$) inhibited at all exposure times and for all power densities compared with control.

The filtered broth of irradiated bacteria at 1.87 W/cm^2 for 3 minutes exposure time was chosen to study neutrophil chemotaxis which had the highest extracellular protein concentration and proteolytic specific activity from all other filtered broths of laser treated bacteria. The highest significant ($P<0.05$) enhanced effect for neutrophil chemotaxis was at concentration 2.196 µg/ml. The number of attracted cells were 43.6 and 14.5×10^6 cells in the lower surface of Millipore filter paper and in the lower compartment of Boyden chamber respectively, while in control the highest significant ($P<0.05$) attracted neutrophil cells 36.1 and 11.8×10^6 (in the lower surface of Millipore filter paper and in the lower compartment of Boyden chamber) were at the concentration 1.677 µg/ml.

الخلاصة

لتزايد ظهور عزلات للبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* مقاومة لمضادات الحياة و لقله توفر مضادات حياة لهذه البكتريا لذا توجه هذا البحث لدراسة طريقة بديلة لعلاج اصابات *P. aeruginosa*.

ان دخول الليزر و زيادة استخداماتة في المجالات الطبية جعل من المنطقي اعتماد الليزر اداة محتملة لعلاج اصابات الجروح المتسببة من بكتريا *P. aeruginosa*.

يقوم هذا البحث على محورين:

1- دراسة تاثير ليزر الدايود ذي الطول الموجي 805 nm في عيوشية و انتاجية المواد الخارج خلوية لبكتريا الزوائف الزنجارية .
2- دراسة تاثير راشح نمو البكتريا المشعة للانجذاب الكيمياوي chemotaxis للخلايا العدلة.

تم جمع 33 عينة من الجروح و الحروق لمرضى راقدين في قسم الجروح و الحروق في مستشفى اليرموك التعليمي في بغداد. اظهرت نتائج عزل و تشخيص البكتريا بان عدد بكتريا الزوائف الزنجارية كان 10 من مجمل العينات (بنسبة 30.3 %). اختيرت العزلة رقم 14 التي اعطت اعلى تركيزللبروتينات الخارج خلوية بعد حضانتها وسط نقيع القلب و الدماغ لغرض تعريضها لليزر.

عرضت البكتريا لليزر الدايود 805 nm باستخدام اربع قدرات (0.94 و1.49 و2.01 و 2.76 واط) و باوقات تشعيع مختلفة لكل طاقة، بعد فترة حضانة ليلة تم قياس عيوشية و عدد الخلايا البكتيرية و تركيز البروتينات الخارج خلوية و الفعالية النوعية للازيمات الحالة و فعالية انزيم الهيمولايسين. اظهرت النتائج ان لليزر الدايود تاثيرا قاتلا عند الدقائق 8 ,5 ,2 ,2 عندما كانت كثافة القدرات 1.87 ,2.96 , 4.0 و 5.49 واط/سم^2 على التوالي .

الاعداد الحية للزوائف الزنجارية كانت لها نتائج مختلفة (مقارنة مع السيطرة)، فقد اظهر مدى كثافة الطاقة من 178.8 الى 357.6 جول/سم^2 تاثير محفزا معنوي ($P<0.05$) لكثافة الطاقة 178.8 واط/سم^2 اثيرا محفزاغير معنوي($P>0.05$) لكثافة الطاقات 225.6, 241.2, 331.2, 338.4, 357.6 جول/سم^2 ،بيما اظهر كثافة الطاقة الاعلى و الاقل من هذا المدى تناقصا معنويا ($P<0.05$) باعداد الخلايا الحية.

كانت هناك زيادة في تراكيز البروتينات الخارج خلوية مقارنة مع السيطرة عند جميع اوقات التشعيع و لجميع كثافة القدرات.اما كمية الانزيمات الحالة(مستنتجة من فعاليتة النوعية) فقد ازدادت كذلك معنويا ($P<0.05$) (للكثافة القدرات 1.87 واط/سم^2 عند الدقيقة الثالثة و 2.96 واط/سم^2 عند الدقيقة الثانيه و الثالثة و الرابعة) و غير معنويا ($P>0.05$) (للكثافة القدرات 1.87واط/سم^2 عند الدقيقة الاولى و الثانية و الرابعة و الخامسة و 2.96 واط/سم^2 عند الدقيقة الاولى و 4.0 واط/سم^2 عند الدقيقة الاولى و 5.49 واط/سم^2 عند الدقيقة الاولى) مقارنة مع السيطرة عند اوقات التشعيع جميعها و لجميع كثافة القدرات ،ماعدا عند الدقائق 6 و7 لكثافة القدرة 1.87 واط/سم2.

انتاج انزيم الهيمولايسن (ايضا مستنتجة من فعاليتة) كان مثبط نوعيا ($P<0.05$) عند اوقات التشعيع جميعها و لجميع كثافة القدرات مقارنة مع السيطرة.

اختير راشح النمو للبكتريا المشععة عند 1.87 واط/سم^2 و لوقت تشعيع 3 دقيقة لدراسة الانجذاب الكيمياوي للخلايا العدلة و الذي كان له اعلى تركيز بروتين و اعلى فعالية نوعية للانزيمات الحالة مقارنة مع غيره من رواشح النمو للبكتريا المعاملة الاخرى. اظهرت النتائج ان اعلى تحفيز معنوي ($P<0.05$) للانجذاب الكيمياوي للخلايا العدلة كان عند التركيز 2.196 مايكروغرام/ مل .عدد الخلايا المنجذبة كان 43.6 و 14.5×10^6 خلية على السطح السفلي لورقة الترشيح و في الجزء السفلي من جهاز بويدن على التوالي، بينما كان اعلى عدد معنوي للخلايا المنجذبة للسيطرة (على السطح السفلي لورقة الترشيح و في الجزء السفلي من جهاز بويدن) 36.1 و 11.8×10^6 خلية عند التركيز 1.677مايكروغرام/ مل.

Changes in survival and extracellular products of *Pseudomonas aeruginosa* and neutrophil's chemotaxis after exposing to 805 nm diode laser

A thesis

Submitted to the Institute of laser for postgraduate studies University of Baghdad in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Laser / Biology

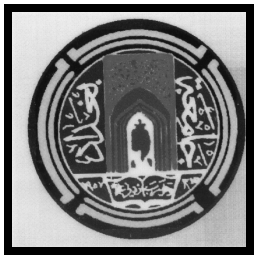
By

Ayat Mudhafer Ali

B.Sc. / Biology

2000

2008 A.D. 1429 A.H



التغيرات في العيوشية و المنتجات الخارج خلويه للزوائف الزنجاريه و الانجذاب الكيمياوي للخلايا العدله بعد التعرض لليزر الدايود 805 نانومتر

رسالة

مقدمة الى معهد الليزر للدراسات العليا /جامعة بغداد

كجزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم ليزر/علوم الحياة

من قبل

آيـات مـظفـر عـلـي

بكالوريس علوم حياة

2000

1429هـ 2008 م