

پاسخ سلول‌های فیبروبلاست انسانی تحت تابش انرژی‌های مختلف لیزر کم‌توان به آلاینده محیطی بنزن

خلاصه

مقدمه: بنزن از هیدروکربن‌های آلی فرار می‌باشد که مواجهه با آن خطرات جدی را برای سلامت انسان به دنبال دارد. در این مطالعه اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر سمیت سلولی ناشی از بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان بررسی شد.

روش بررسی: سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان (رده Hu02) در معرض غلظت‌های مختلف بنزن ($0-100 \mu\text{g/mL}$)، قرار گرفت و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. سپس اثر تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی 3 J/cm^2 بر بقای سلول‌های در معرض بنزن و همچنین اثر تابش میزان انرژی‌های متفاوت لیزر کم‌توان 1 J/cm^2 ، 2 J/cm^2 ، 3 J/cm^2 و 6 J/cm^2 بر سلول‌های در معرض غلظت‌های ($0, 10, 20 \mu\text{g/mL}$) از بنزن با استفاده از تست MTT و میکروسکوپ اینورت نوری بررسی شد.

یافته‌ها: اثر لیزر کم‌توان بر بقای سلول‌های در معرض غلظت‌های پایین‌تر از ($10 \mu\text{g/mL}$) از بنزن مثبت و در جهت حفظ بقاء سلولی ولی در غلظت‌های بالاتر از ($10 \mu\text{g/mL}$)، با کاهش بقاء سلولی همراه است. اثر میزان انرژی‌های متفاوت در غلظت‌های (0 و $10 \mu\text{g/mL}$) در جهت حفظ بقاء سلولی است ولی در غلظت ($20 \mu\text{g/mL}$) با افزایش میزان دوز انرژی کاهش بقاء سلولی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: لیزر کم‌توان در غلظت‌های پایین بنزن، سمیت سلولی ناشی از بنزن را کاهش و بقای سلولی را حفظ می‌کند. در غلظت‌های بالا و در حضور لیزر کم‌توان، بقای سلولی نسبت به حالت عدم حضور لیزر روند کاهشی دارد. با افزایش میزان دوز انرژی تابش در غلظت بالا، روند کاهشی بقای سلولی مشاهده می‌شود. نتایج بررسی مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ اینورت نوری، یافته‌های حاصل از MTT را تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آلاینده‌های نفتی، بنزن، لیزر کم‌توان درمانی (LLLT)، سلول فیبروبلاست انسانی، بقاء سلولی

مهسا سالمی^۱
رضا حسین زاده^۲
پروانه مقامی^۱
خاطره خرسندی^۳

۱. دپارتمان بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: پروانه مقامی، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۶۵۳۲۲
پست الکترونیک: maghami@srbiau.ac.ir

نویسنده مسئول: خاطره خرسندی، تلفن: ۰۲۱۶۴۴۹۲۵۷۲
پست الکترونیک: khorsandi.kh@ut.ac.ir

مقدمه

رشد فن‌آوری و صنعت، کشف و کاربرد ده‌ها هزار نوع ترکیب با خواص فیزیکی، شیمیایی مختلف، موجب آلودگی هوای شهرها و محیط‌های کاری گردیده است. همچنین تراکم وسایل نقلیه موتوری و استقرار صنایع در شهرها و پیرامون آن‌ها محیط شهری را با مشکلات زیست‌محیطی مواجه نموده است که در رأس آن، وضعیت نامطلوب و بیمارگونه کیفیت هوا است. روند روبه‌افزایش آلودگی هوا به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه به‌طور جدی سلامت انسان‌ها را تهدید می‌کند. یکی از مهم‌ترین خطرات این فرآیند که از هر سه جنبه بهداشت، ایمنی و محیط زیست حائز اهمیت است، نشر هیدروکربن‌های آلی در هوا است. از انواع هیدروکربن‌ها دسته آروماتیک از عوامل آلاینده و خطرناک محیط زیست به‌شمار می‌روند که عمدتاً بر اثر سوخت ناقص فسیلی تولید می‌شوند [۱ و ۲]. بنزن کوچک‌ترین و پایداری‌ترین هیدروکربن آروماتیک (شکل ۱) و یک مایع بی‌رنگ متمایل به رنگ زرد با بوی نافذ است. وزن مولکولی بنزن $78/1$ ، نقطه جوش آن $80/1^{\circ}\text{C}$ ، نقطه ذوب آن $5/5^{\circ}\text{C}$ و چگالی نسبی بخار آن $2/7 \text{ g/L}$ می‌باشد. بنزن به مقدار کمی در حدود $1/29 \text{ g/L}$ در آب با دمای 25 درجه سانتی‌گراد قابل حل است [۳-۵]. بنزن به‌طور گسترده در صنعت تولید پلیمرها، رزین و الیاف مصنوعی استفاده می‌شود و یکی از ترکیبات اصلی تنباکو و سیگار می‌باشد [۶]. قرارگرفتن به‌مدت طولانی و بیش از حد در معرض بنزن، باعث آسیب در خون‌سازی بدن می‌شود. مشخص شده است که مواجهه با سطح بالایی از بنزن با ایجاد و پیشرفت سرطان خون در ارتباط است. آزمایش‌های حیوانی نیز نشان‌دهنده این مطلب است که قرارگیری بیش از حد در معرض بنزن خطر ناباروری یا باروری پرخطر را به‌دنبال دارد [۷].

دستگاه‌های لیزر سیستم‌هایی هستند که باریکه‌های نوری منسجم، تکرنگ و با شدت بالا تولید می‌کنند. امروزه، کاربرد لیزرها به دو دلیل عمده بسیار گسترده شده است: ۱- لیزرها به‌عنوان منبع نوری (فوتونی) به‌شدت متمرکز و تک‌موج معروف هستند و ۲- طبیعت همدوسی بالای لیزر باعث کاربردهای قابل توجه آن‌ها می‌باشد [۸]. در میان فن‌آوری‌های توسعه‌یافته، درمان با لیزر کم‌توان روش نسبتاً جدیدی می‌باشد. لیزر کم‌توان در سطح سلولی عمل می‌کند و نتایج آن شامل کاهش درد، کاهش التهاب و بهبود بخشیدن به ترمیم بافت است [۹].

لیزر کم‌توان درمانی دارای توان کمتر از 250 میلی‌وات بوده و معمولاً طیف باریکی از محدوده قرمز یا نزدیک به مادون قرمز ($600-1100$ نانومتر)، با چگالی توان (تابش) کمتر از (100 mW/cm^2) و چگالی انرژی بین $(50-400 \text{ J/cm}^2)$ دارد [۱۰]. مکانیسم سلولی لیزر کم‌توان با جذب نور قرمز و مادون قرمز به‌وسیله کروموفور یا گیرنده‌های نوری موجود در میتوکندری، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، نیتریک اکسید (NO) و درنهایت افزایش ATP و فعال شدن آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز، پراکسیداز و .. همراه می‌باشد [۱۱]. مطالعات نشان داده است که سیتوکروم سی‌اکسیداز یک کروموفور اصلی در پاسخ به نور لیزر کم‌توان است [۱۲]. جذب فوتون‌ها به‌وسیله سیتوکروم سی‌اکسیداز منجر به برانگیختگی الکترونی کروموفور می‌شود و در نتیجه واکنش انتقال الکترون تسریع می‌یابد. انتقال الکترون لزوماً باعث افزایش تولید ATP می‌شود. بنابراین فعال شدن فوتون‌ها به‌وسیله آنزیم سیتوکروم سی‌اکسیداز، نقش حیاتی در فعال شدن آبشارهای بیولوژیکی متنوع پس از تابش لیزر ایفا می‌کند [۱۳ و ۱۴]. یکی دیگر از مکانیسم‌های اثر لیزر، اثر مهار NO می‌باشد بدین‌صورت که NO به میزان زیادی توسط فرآیند التهابی در میتوکندری ایجاد می‌گردد و به سیتوکروم سی‌اکسیداز متصل و مانع از اتصال اکسیژن به سیتوکروم سی‌اکسیداز می‌شود که این فرآیند به‌ویژه در شرایط استرسی و یا در مواردی که سلول در شرایط هیپوکسیک وجود دارد، بسیار مهم می‌باشد و می‌تواند به کاهش فعالیت سیتوکروم سی‌اکسیداز منجر گردد. مشخص شده است که تابش لیزر کم‌توان می‌تواند عمل مهار سیتوکروم سی‌اکسیداز به‌وسیله NO را وارونه کند، به این صورت که NO را به‌وسیله برهمکنش‌های نوری از محل‌های اتصال آن جدا می‌کند. اتصال NO به سیتوکروم سی‌اکسیداز نسبت به پیوندهای کووالانسی ضعیف‌تر می‌باشد این جدایی ممکن است به‌وسیله نور مرئی یا مادون قرمز که انرژی کافی برای شکستن پیوندهای کووالانسی را دارا نمی‌باشند، انجام پذیرد. در نتیجه جدایی NO از سیتوکروم سی‌اکسیداز تنفس سلولی و ATP افزایش می‌یابد [۱۴]. در نتیجه لیزر کم‌توان باعث افزایش متابولیسم سلولی، سیگنالینگ سلولی، تنظیم رشد و نمو سلولی، سنتز پروتئین، اسید نوکلئیک و فعال‌سازی آنزیم‌ها می‌شود. نقش لیزر کم‌توان در افزایش تولید ATP محدود نمی‌شود، بلکه از راه‌های دیگر مانند تکثیر سلولی، مهاجرت سلولی، تولید فاکتور رشد، تولید سایتوکین‌ها و از طریق فعال کردن فاکتور رونویسی هم تأثیرگذار است [۱۲ و ۱۷-۱۵].

مطالعات نشان داده‌است که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ویران‌کننده می‌باشد و می‌تواند به آنزیم‌ها، لیپیدهای غشایی و اسیدهای نوکلئیک آسیب برسانند. در شرایطی که میتوکندری‌ها (به‌دلیل کمبود ADP یا O_2) تولید ATP نکنند (به همین دلیل دارای یک نیروی حرکتی پروتونی بزرگ هستند) و همچنین نسبت بالای NADH/NAD^+ در ماتریکس وجود داشته باشد.

میتوکندری در شرایط استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرد و تولید ROS افزایش می‌یابد [۱۸]. مکانیسم‌های دفاعی در برابر آسیب‌های ROS بسیار مهم هستند و باعث کاهش آسیب‌های ثانویه در عدم تعادل بین تولید ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز، کاتالاز و هم‌اکسیژناز می‌شوند. بیشتر مطالعات نشان می‌دهد که لیزر کم‌توان اثرات مفیدی بر سطح استرس اکسیداتیو دارد که به عمل خود لیزر و عوامل آنتی‌اکسیدان بستگی دارد.

کشت، سلول‌ها با مقادیر مشخصی از بنزن شامل ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به مدت دو ساعت انکوبه شدند. پس از طی شدن زمان مورد نظر، سلول‌ها در معرض تابش لیزر (دستگاه لیزر LX2 Thor) با طول موج ۶۶۰ نانومتر به مدت ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی J/cm^2 قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، مرگ و میر سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی و درصد توان زیستی باقیمانده سلول‌ها در مقایسه با کنترل منفی تعیین شد. گروه کنترل منفی به عنوان سلول‌های فقط در معرض تابش لیزر کم توان تعریف شدند.

در غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن، زمان تابش لیزر در بازه‌های زمانی متفاوت و با انرژی مختلف تابش، $(1J/cm^2)$ و $(2J/cm^2)$ و $(6J/cm^2)$ انجام شد. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار گردید.

بررسی توان زیستی سلول‌ها به روش MTT

در این مطالعه به منظور بررسی توان زیستی سلول‌ها از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. در روش MTT، آنزیم‌های دهیدروژناز در سلول‌های زنده با فعالیت آنزیمی خود منجر به تبدیل شدن MTT به رنگ فورمازان می‌شوند. بنابراین میزان فورمازان تولیدشده متناسب با تعداد سلول‌های زنده خواهد بود.

برای انجام تست MTT جهت بررسی سمیت تاریکی و نوری بنزن، بعد از طی شدن زمان انکوباسیون به مدت دو ساعت با بنزن و لیزر کم‌توان، محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها دوبار با بافر فسفات سالین (PBS) شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک ۵/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور برای مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. پس از طی شدن زمان مورد نظر چاهک‌ها تخیله شدند و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی‌متیل سولفاکساید (DMSO) اضافه شد. DMSO به عنوان حلال بلورهای فورمازان عمل می‌کند و باعث ایجاد رنگ بنفش با شدت‌های مختلف بسته به زنده بودن یا مردن سلول می‌شود.

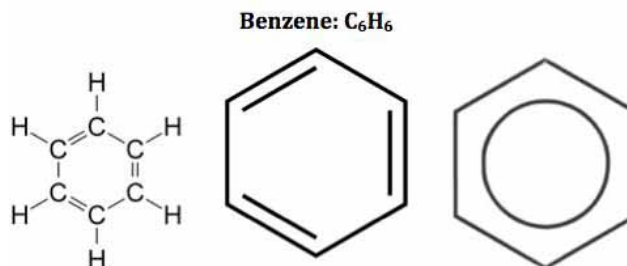
جذب نوری سلول‌ها در هر چاهک جهت بررسی درصد توان زیستی سلول‌ها به وسیله دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر در مقایسه با جذب نوری گروه کنترل منفی (سلول‌های بدون بنزن) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده تحلیل گردیدند و بر روی نمودار آورده شدند.

بررسی مورفولوژی با میکروسکوپ اینورت نوری

به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست انسانی در معرض بنزن و تابش لیزر کم‌توان، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از بنزن (۰، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت دو ساعت انکوبه شدند. پس از طی شدن زمان مورد نظر، سلول‌ها در معرض تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی تابشی J/cm^2 قرار گرفتند سپس سلول‌ها با

لیزر درمانی با ایجاد تعادل بین تولید ROS و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و با کاهش تولید عوامل استرس اکسیداتیو و افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از سلول در برابر عوامل اکسیداتیو محافظت می‌کند [۱۹].

در مطالعه حاضر، اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر بر پتانسیل سمیت سلولی بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی در تاریکی و در معرض تابش لیزر مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱: ساختار مولکولی بنزن

روش بررسی

کشت سلول

سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی رده Hu02 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند.

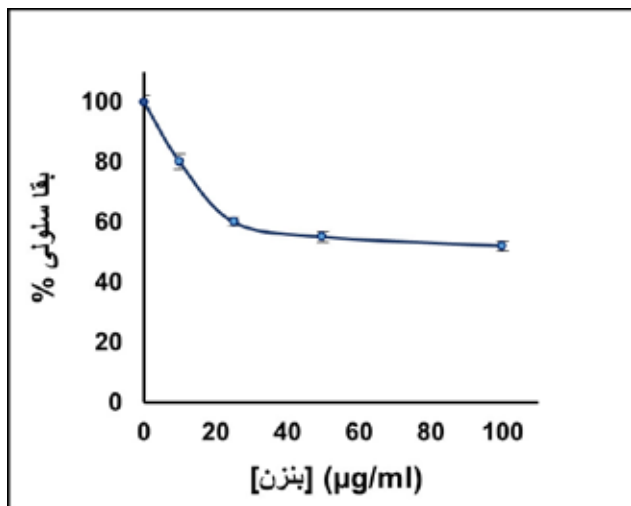
سلول‌ها در محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند.

بررسی سمیت تاریکی بنزن

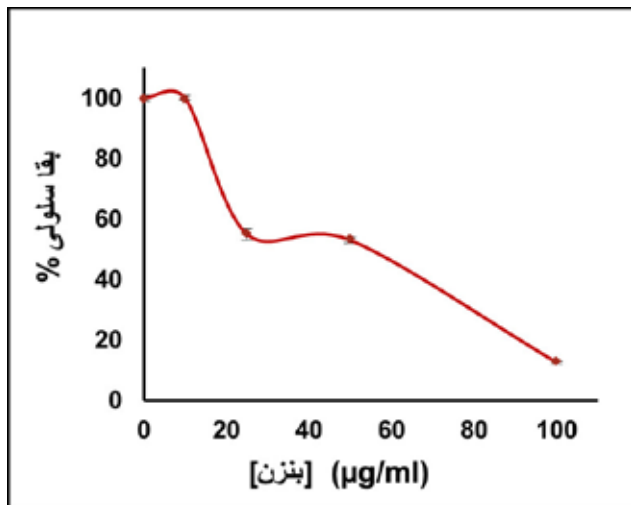
برای بررسی سمیت سلولی بنزن بر سلول‌ها در غیاب نور (سمیت تاریکی) در هر چاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی 1×10^4 سلول فیبروبلاست کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از کشت، سلول‌ها در تاریکی با غلظت‌های متفاوتی از بنزن شامل ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت دو ساعت انکوبه شدند. میزان مرگ و میر سلولی با استفاده از تست رنگ‌سنجی MTT بررسی شد.

بررسی سمیت بنزن در حضور انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم توان (سمیت نوری)

جهت بررسی اثر لیزر بر سمیت سلولی ایجادشده توسط بنزن، ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه‌شده از سلول‌های فیبروبلاست حاوی 1×10^4 سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با بنزن در تاریکی



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با بنزن و تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی ۳ J/cm²

میزان ۶۴ درصد مشاهده می‌گردد. این کاهش بقاء در حضور انرژی تابش لیزر ۱ J/cm²، به مقدار کمی تا ۶۹ درصد نسبت به آزمایش تاریکی افزایش یافت. در انرژی تابش ۲ J/cm²، میزان بقاء سلولی بدون تغییر و در انرژی تابش ۳ J/cm²، کاهش بقاء سلولی به ۵۱ درصد و در انرژی تابش ۶ J/cm²، کاهش بقاء سلولی به میزان ۴۸ درصد مشاهده شد. نتایج نشان داد که تابش لیزر کم‌توان در انرژی‌های بالاتر منجر به کاهش بقاء سلول‌ها و در انرژی‌های کمتر، از مرگ و میر سلول‌ها نسبت به حالت کنترل جلوگیری نموده است.

باتوجه به نتایج به‌دست آمده به‌منظور مشاهده اثر لیزر کم‌توان بر سمیت سلولی ناشی از بنزن بر مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست انسانی، سلول‌ها

میکروسکوپ اینورت نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰X مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها

اثر سمیت تاریکی بنزن بر توان زیستی سلول‌های فیبروبلاست انسانی

نتایج آزمایش مربوط به بررسی اثر بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی در غیاب نور نشان داد که با افزایش غلظت بنزن بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی در یک رفتار وابسته به غلظت کاهش می‌یابد. به طوری که در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن درصد بقاء سلول‌ها به ترتیب ۸۰، ۶۰، ۵۵ و ۵۲ درصد کاهش می‌یابد (شکل ۱).

اثر سمیت بنزن به‌همراه لیزر کم‌توان (سمیت نوری) بر توان زیستی سلول‌ها

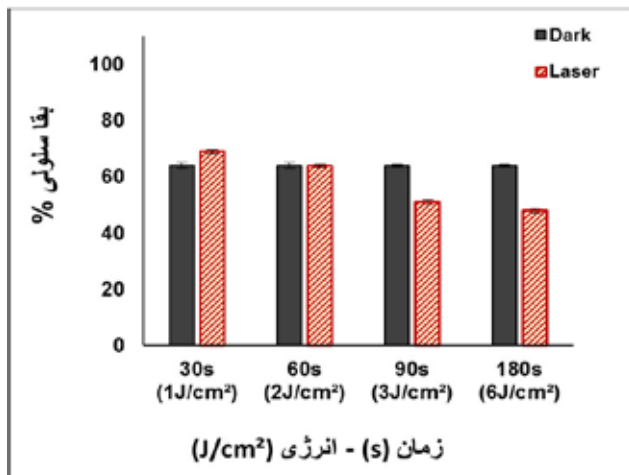
نتایج آزمایش مربوط به بررسی اثر بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی در حضور تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی ۳ J/cm² نشان داد که اثر لیزر کم‌توان در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مثبت بوده و به‌عبارتی بقاء سلولی را حفظ کرده است. در غلظت‌های بالاتر (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کاهش میزان بقاء سلولی (به ترتیب به‌میزان ۵۵، ۵۳ و ۱۲/۵ درصد) نسبت به آزمون تاریکی (کنترل) مشاهده شد (شکل ۲).

اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر بر توان زیستی سلول‌های فیبروبلاست انسانی در معرض بنزن

در ادامه مطالعات، اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن، انرژی‌های مختلف بر روی بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی اثری ندارد و فقط در دوز انرژی بالاتر (۶ J/cm²)، تغییر نامحسوسی دیده می‌شود.

آزمایش مشابهی با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان انرژی لیزر کم‌توان در غلظت پایین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اثری بر مرگ و میر سلولی نسبت به حالت کنترل (تاریکی) مشاهده نشد، در انرژی‌های ۱، ۲ و ۳ J/cm² میزان بقاء سلولی نسبت به حالت کنترل (تاریکی) افزایش داشت که این افزایش در انرژی بالاتر (۶ J/cm²)، نسبت به انرژی‌های دیگر کمتر بوده است اما، نسبت به حالت کنترل (تاریکی) کمی افزایش داشته است (شکل ۵).

همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن در عدم حضور لیزر کم‌توان کاهش بقای سلولی به



شکل ۶: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر بقای سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی در معرض غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به مدت ۲ ساعت، در محیط تاریک و تابش لیزر کم‌توان با انرژی‌های 1 J/cm^2 ، 2 J/cm^2 ، 3 J/cm^2 و 6 J/cm^2

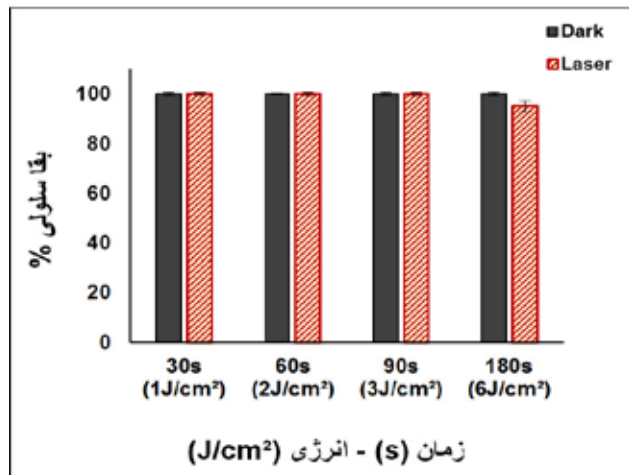
می‌شود، با افزایش غلظت بنزن (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از تعداد سلول‌ها کاسته می‌شود و همچنین مورفولوژی سلول‌ها از حالت دوکی شکل و گرد و کوچک‌شده تغییر شکل می‌یابد.

بحث و نتیجه‌گیری

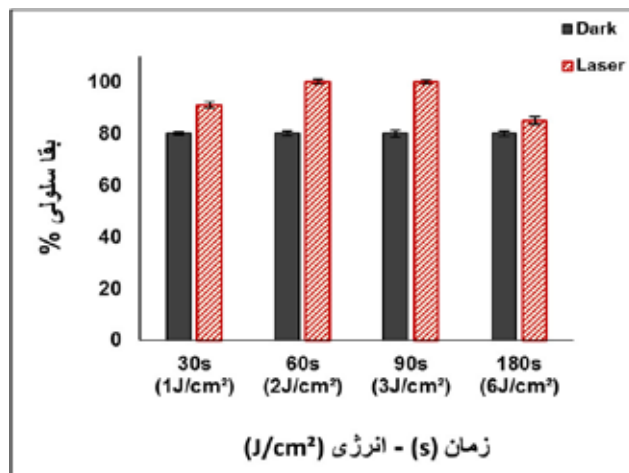
مطالعات مختلف نشان داده‌است که تماس طولانی‌مدت با بنزن و متابولیت‌های آن منجر به اثرهای زیان‌بار در سیستم خون‌سازی، ایجاد و توسعه سرطان خون در بدن می‌گردد. Zhang و همکاران مکانیسم‌های بالقوه سمیت بنزن را در زمینه‌های نقش متابولیسم بنزن در کبد و انتقال به مغز استخوان برای متابولیسم ثانویه، ایجاد استرس اکسیداتیو توسط گونه‌های فعال اکسیژن توسط چرخه ردوکس، تغییر کروموزومی از جمله جابه‌جایی، ایجاد آناپلوئیدی، آسیب به پروتئین‌های توبولین، پروتئین هیستون و توپوایزومراز II و اختلال در عملکرد سیستم ایمنی بدن [۲۰] بررسی کردند.

همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد متابولیت‌های بنزن نقش مهمی در سمیت ناشی از بنزن ایفا می‌کنند [۲۱]. همان‌طور که مطالعات نشان داده‌است، بنزن می‌تواند ساختار پروتئین و آنزیم‌های مختلف را تغییر و فعالیت آن را کاهش دهد و در نهایت بر عملکرد سلول تأثیر بگذارد. بنزن می‌تواند دیواره سلولی را تخریب کند و باعث از بین رفتن سلول شود. قرار گرفتن در معرض بنزن در سطح مولکولی باعث تغییر بیان ژن در سلول‌های خون [۲۲]، آناپلوئیدی در سلول‌های خون ساز [۲۳] و باعث آسیب کروموزوم در سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی می‌شود [۲۴]. بسیاری از اثرات مخرب بنزن منجر به اختلال در کاهش ایمنی و در نهایت بدخیمی‌های خونی می‌گردد [۲۵].

برخی از پژوهشگران در مطالعات جداگانه‌ای اثر لیزر کم‌توان را بر آنزیم



شکل ۴: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر بقای سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی در معرض غلظت ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به مدت ۲ ساعت در تاریکی و تابش لیزر کم‌توان با انرژی‌های 1 J/cm^2 ، 2 J/cm^2 ، 3 J/cm^2 و 6 J/cm^2



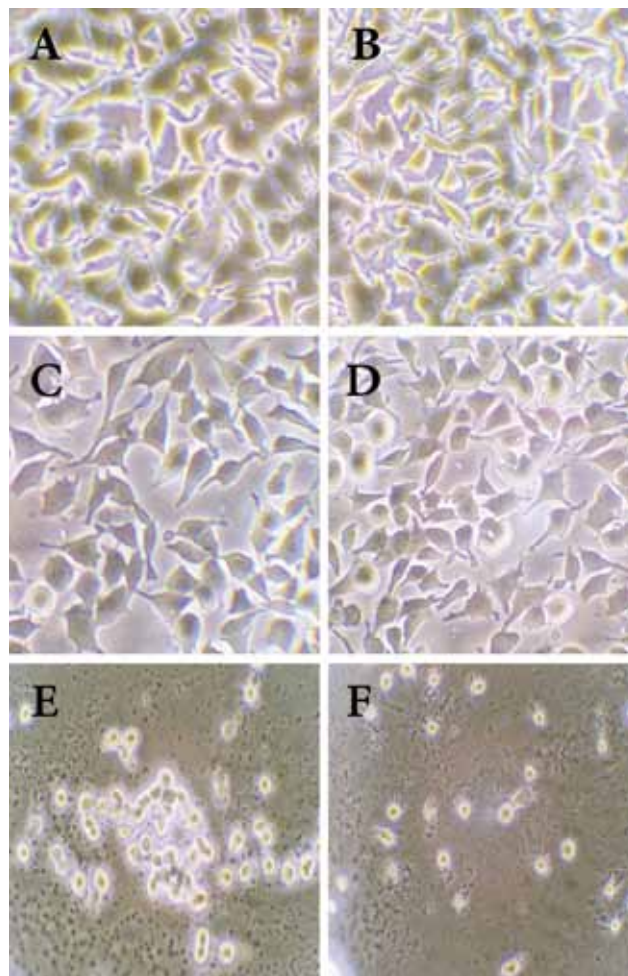
شکل ۵: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر بقای سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی در معرض غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به مدت ۲ ساعت در محیط تاریک و تابش لیزر کم‌توان با انرژی‌های 1 J/cm^2 ، 2 J/cm^2 ، 3 J/cm^2 و 6 J/cm^2

با غلظت‌های متفاوت از بنزن (۰، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت دو ساعت انکوبه شدند. پس از طی شدن زمان مورد نظر، سلول‌ها در معرض تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی تابشی 3 J/cm^2 قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت نوری و بزرگ‌نمایی $40\times$ مورد مطالعه قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، قسمت A و B و D به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های فیبروبلاست انسانی در محیط تاریکی و لیزر با غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن، C و D به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های فیبروبلاست انسانی در محیط تاریکی و لیزر با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن و E و F نشان‌دهنده سلول‌های فیبروبلاست انسانی در محیط تاریکی و لیزر با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن می‌باشد (شکل ۷). همان‌طور که مشاهده

سلول‌ها با SNP قبل از تابش به‌طور قابل توجهی ویژگی سلول‌های متصل‌شده را تغییر می‌دهد. ظاهراً این عمل از طریق اتصال NO به سیتوکروم سی‌اکسیداز انجام می‌شود [۲۸]. همانگونه که اشاره شد، شواهد بسیاری در رابطه با تأیید اثرگذاری لیزر کم‌توان بر مسیرهای میتوکندریایی وجود دارد. نقش میتوکندری به عنوان تأمین‌کننده اساسی انرژی سلول از اهمیت بالایی برخوردار است و فیزیولوژی ترمیم بدون مشارکت فعال این جزء سلولی ناممکن خواهد بود. به همین دلیل اثر تابش لیزر بر اجزاء زنجیره تنفسی در میتوکندری در بسیاری از مطالعات مورد توجه بوده است. در مطالعه حاضر نشان داده شد که افزایش غلظت بنزن می‌تواند تأثیرات مشخصی بر کاهش بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی بگذارد که یافته‌های به‌دست‌آمده از مطالعه ما با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. Gaido و همکاران نشان دادند که با افزایش غلظت متابولیت‌های بنزن درصد تشکیل کلونی سلول‌ها کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند در صورتی که غلظت‌های پایین متابولیت‌های بنزن تأثیر کمتری بر تشکیل کلونی سلول‌های بافت بنیادی داشت [۲۹]. در این مطالعه اثر سمیت بنزن در حضور لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی J/cm^2 ۳ مطالعه شد. در غلظت پایین بنزن (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اثر لیزر کم‌توان در جهت حفظ بقاء سلولی (حدود ۱۰۰ درصد بقاء سلولی در حضور لیزر کم‌توان) در برابر سمیت ایجادشده توسط بنزن (۸۰ درصد بقاء سلولی در تاریکی) می‌باشد. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که لیزر کم‌توان اثرهای مفیدی بر کاهش استرس اکسیداتیو سلول دارد که به عمل خود لیزر و همچنین عوامل آنتی‌اکسیدان بستگی دارد. لیزر کم‌توان با ایجاد تعادل بین تولید ROS و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. به این ترتیب که با کاهش تولید عوامل استرس اکسیداتیو و افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان مثال آنزیم‌های گلوکاتایون، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز از سلول در برابر عوامل اکسیداتیو محافظت می‌کند. برخی پژوهشگران اظهار داشته‌اند که لیزر کم‌توان از سلول‌های حیوانی به‌واسطه مهار فعالیت NADPH اکسیداز در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند [۱۹ و ۳۰]. بنابراین یافته‌های حاصل از این مطالعه با بررسی‌های قبلی در ارتباط با اثرهای مثبت لیزر کم‌توان مطابقت دارد.

مطالعات ما نشان داد که در غلظت‌های بالاتر از بنزن، اثر لیزر کم‌توان در جهت کاهش بقاء سلولی است. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن بقای سلولی به ۱۲/۵ درصد نسبت به گروه کنترل (تاریکی) با بقای سلولی ۵۲ درصد کاهش پیدا می‌کند. بنابراین تابش لیزر اثر تخریبی بنزن را افزایش می‌دهد و میزان سمیت بنزن موجود در سلول با تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر، افزایش می‌یابد.

در مطالعه حاضر، اثر انرژی‌های متفاوت تابش لیزر بر بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی در معرض بنزن بررسی شد. در غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن انرژی‌های مختلف لیزر کم‌توان اثری بر روی سلول‌های فیبروبلاست نداشت. در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن، انرژی‌های



شکل ۷: مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان رده Hu-۲ در معرض غلظت ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن در تاریکی (A) با تابش لیزر کم‌توان (B)، غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن در تاریکی (C)، با تابش لیزر کم‌توان (D)، غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن در تاریکی (E) و با تابش لیزر کم‌توان (F)

سیتوکروم سی‌اکسیداز بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که لیزر منجر به افزایش اکسیداسیون سیتوکروم سی‌اکسیداز و انتقال الکترون می‌گردد. جذب فوتون در مولکول منجر به ایجاد حالت تحریک‌شده در سلول و تسریع واکنش‌های انتقال الکترون و در نهایت افزایش تولید ATP می‌شود که منجر به افزایش فعالیت پمپ‌های پروتونی از جمله Na^+/H^+ و Ca^{2+}/Na^+ می‌گردد [۲۶ و ۲۷].

Karu و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که NO در مکانیسم پاسخ سلولی به لیزر کم‌توان در ناحیه قرمز نقش دارد. سلول‌های سرطانی HeLa پس از ۳۰ دقیقه تابش با لیزر در طول موج ۶۰۰ تا ۸۶۰ نانومتر و یک لیزر دیود با طول موج ۸۲۰ نانومتر شمارش شدند. نیتریک‌اکسید NO، سدیم‌نیتروپروساید SNP، تری‌گلیسیریل GTN و سدیم‌نیتريت $NaNO_2$ ، به محیط سلول‌ها قبل یا بعد از تابش اضافه شدند. تیمار

مختلف لیزر کم‌توان اثر مثبت بر سلول دارد و با قدرت رادیکال‌زایی بنزن مقابله می‌کند و نسبت به گروه کنترل (تاریکی) بقاء سلولی را حفظ می‌کند. بنابراین در این غلظت، تابش لیزر کم‌توان اثرهای تخریبی بنزن را کاهش داده است.

نتایج آزمایش مشابه با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن نشان می‌دهد که با افزایش میزان وقتی تأثیر کاهشی لیزر کم‌توان بر بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی در معرض بنزن، بیشتر می‌شود. بنابراین در این غلظت لیزر کم‌توان اثرهای سمیت بنزن و قدرت رادیکال‌زایی آن را افزایش می‌دهد.

Hawkins و همکاران مطالعه‌ای در مورد اثر لیزر کم‌توان با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر در دوزهای مختلف انرژی لیزر ($۱۶, ۱۰, ۵, ۲/۵, ۰/۵$) به مدت ۲ روز متوالی بر روی فیبروبلاست نرمال و زخمی پوست انسان انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که مورفولوژی سلول‌های زخمی که در معرض تابش انرژی ۵ J/cm^2 قرار گرفتند، به حاشیه زخم مهاجرت کردند و تکثیر سلولی بدون افزایش میزان آسیب سلولی و مولکولی افزایش یافت. در حالی که در دوزهای بالاتر $۱۶-۱۰ \text{ J/cm}^2$ ، کاهش بقاء سلولی، تکثیر سلولی، آسیب به DNA و غشاء سلولی دیده شد. این بررسی نشان داد که دوز ۵ J/cm^2 ، با تحریک فعالیت میتوکندری منجر به بهبود عملکرد سلول، تحریک تکثیر سلولی و مهاجرت فیبروبلاست می‌شود و در نهایت به بسته شدن زخم کمک می‌کند [۳۱]. بنابراین تابش لیزر کم‌توان بسته به دوز انرژی مورد مصرف می‌تواند فرآیندهای سلولی را به شیوه‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهد.

مشاهدات مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با بنزن به همراه لیزر کم‌توان در غلظت‌های مختلف بنزن یافته‌های به دست آمده از مطالعه توان زیستی سلولی را تأیید کرد. میزان مرگ‌ومیر سلولی در سلول‌هایی که در معرض غلظت‌های بالای بنزن و تابش لیزر کم‌توان قرار گرفتند، نسبت به سلول‌هایی که در معرض بنزن و در تاریکی بودند، بیشتر بود. میزان مرگ‌ومیر سلولی در سلول‌هایی با غلظت پایین و تابش لیزر کم‌توان نسبت به سلول‌های قرار گرفته در تاریکی (کنترل)، کمتر و اثر مثبت لیزر کم‌توان در جهت حفظ بقاء و مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست انسانی در غلظت‌های پایین بنزن مشاهده شد.

References:

1. Coccheri RA, Arnes. Minicucci AM. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in marine organisms from Italian central Mediterranean coast. 1990.
2. Jonathan A. The health effects of nonindustrial indoor air pollution. *J Allergy Clin Immuno.* 2008; 121: 585-91.
3. Andrews LS. Effects of toluene on the metabolism, disposition, and hemopoietic toxicity of Benzene. 1997; 26: 293-300.
4. Blocsak LE, Nerland DE. Inhibition of Erythropoiesis by Benzene and Benzene metabolites. 1983; 69: 363-8.
5. HSDB. Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> and search on CAS number, 71-43-2. 12/20/16. 2016.
6. Falzone L. Occupational exposure to carcinogens: Benzene, pesticides and fibers. *J Molecular Medicine Reports.* 2016; 14: 4467-74.
7. Brief R. Benzene in the workplace. *J American Industrial Hygiene Association.* 2010: 616-23.
8. Prasad P. Introduction to Biophotonics. A John wiley & sons. INC. 2003: 618.
9. Bezerra SJC. Laser phototherapy (660nm) can be Beneficial for reducing Gingival Inflammation in Proshtodontics. 2015.
10. Pinar MD. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *J Semin Cutan Med Surg.* 2013; 32(1): 41-52.
11. Khalid MZ. Mechanism of Laser/light beam interaction at cellular and tissue level and study of the influential factors for the application of low level laser therapy. *J Physics.med-ph.* 2016.
12. Karu T, Pyatibrat L, Afanasyeva N. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *J Lasers Surg Med.* 2005: 307-14.
13. Huang YY. Biphasic dose response in low level light therapy. 2009; 7(4): 358-83.
14. Hamblin MR, Deidova TN. Mechanism of Low Level Light Therapy. *J SPIE.* 2006; 6140.
15. Lane N. Cell biology: power games. *J nature.* 2006; 443(7114): 901-3.
16. Antunes F. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *J Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004; 101(48): 16774-9.
17. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *J Photomed Laser Surg.* 2005; 23(4): 355-61.
18. Rhoads DM. Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiol.* 2006; 141(2): 357-66.
19. Carvalho J. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J Biophotonics.* 2016; 11-12: 1208-21.
20. Zhang L. Systems biology of Human Benzene

exposure. *J Chem Biol Intract.* 2010; 184(1-2): 86-93.

21. Snyder R, Witz G, Goldestein BD. The Toxicology of Benzene. *J Environmental Health perspectives.* 1993; 100: 293-306.

22. McHale CM. Changes in the peripheral blood transcriptome associated with occupational benzene exposure identified by cross-comparison on two microarray platforms. *J Genomics.* 2009; 93: 343-9.

23. Zhang L. Leukemia-related chromosomal loss detected in hematopoietic progenitor cells of benzene-exposed workers. *J Leukemia.* 2012; 26: 2494-8.

24. McHale CM. Chromosome translocations in workers exposed to benzene. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008; 39: 74-7.

25. McHale CM. Current understanding of the mechanism of benzene induced leukemia in humans: implications for risk assessmen. *J Carcinogenesis.* 2012; 33: 240-52.

26. Pastore D, Greco M, Pssarella S. Specific helium-neon laser sensitivity of purified cytochrome c oxidase. *J Radiat Biol.* 2000; 76: 863-70.

27. Hamblin MR, Deidova TN. Mechanism of Low Level Light Therapy. *J SPIE.* 2006; 6140: 1-12.

28. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *J Photomed Laser Surg.* 2005; 23(4): 355-61.

29. Gaido K, Wierda D. In Vitro Effects of Benzene Metabolites on Mouse Bone Marrow Stromal Cells. *J Department of pharmacology and Toxicology. West Vrginia.* 1984; 76: 45-55.

30. Huang YY. Biphasic dose response in low level light therapy. 2009; 7(4): 358-83.

31. Hawkins D, Abrahamse H. The Role of Laser Fluence in Cell Viability, Proliferation, and Membrane Integrity of Wounded Human Skin Fibroblasts Following Helium-Neon Laser Irradiation. *J Lasers in Surgery and Medicine.* 2006; 38: 74-83.