

افزایش زنده‌مانایی سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرائی با استفاده از نور لیزر کم‌توان

خلاصه

مقدمه: در سال‌های اخیر، مطالعات انجام‌شده در زمینه سلول‌های بنیادی باعث افزایش تقاضای درمان بیماری‌های مختلف با استفاده از روش سلول‌درمانی شده است. بهبود زنده‌مانایی سلول‌های بنیادی باعث بهبود روش‌های سلول‌درمانی می‌شود. امروزه، از لیزرهای کم‌توان برای کاربردهای بسیاری در پزشکی از جمله ترمیم زخم و همچنین درمان ریزش مو استفاده می‌شود. در این مطالعه اثر تابش نور لیزر کم‌توان بر زنده‌مانایی سلول‌ها مورد بررسی قرار داده شد.

روش بررسی: فولیکول مو از ناحیه سبیل موش صحرائی با استفاده از روش برداشت اسلیت جداسازی شد و در آزمایشگاه پس از جداسازی سلول‌ها از طریق هضم آنزیمی و مکانیکی در فلاسک کشت در داخل محیط کشت FBS+ F12-DMEM کشت داده شدند. پس از رشد سلول‌های بنیادی فولیکول مو، بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها تحت تابش دوزهای مختلف لیزر با استفاده از آزمون MTT سنجیده شد و با میکروسکوپ نوری عکس گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج تیمار سلول‌های بنیادی فولیکول مو با دوزهای مختلف نور لیزر کم‌توان نشان داد که نور لیزر کم‌توان در دوزهای مختلف، اثرات مختلفی بر روی سلول‌ها دارد به‌طوری‌که در دوز ۵ ژول بر سانتی‌متر مربع بالاترین زنده‌مانایی را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: افزایش زنده‌مانایی سلول‌های بنیادی فولیکول مو تحت تأثیر نور لیزر کم‌توان می‌تواند رویکرد جدیدی را سلول‌درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی پوستی ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، نور لیزر، زنده‌مانایی

مینا سادات نادری^۱
سید مهدی طبایی^۲
مجید پرنور^۳

۱. استادیار بیوفیزیک، گروه پژوهشی ترمیم نوری مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران

۲. دانشیار پوست و مو، گروه پژوهشی ترمیم نوری مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران

۳. استادیار بیوتکنولوژی پزشکی، گروه پژوهشی ترمیم نوری مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: سید مهدی طبایی، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۴۸۶۲
پست الکترونیک: mtaba@jdtums.ir

مقدمه

آن است که این فولیکول‌ها تقویت شوند و رشد نمایند به طوری که با تحریک و تقویت و ایجاد شرایط مناسب رشد موها شروع می‌شود. اگر در منطقه‌ای به هر دلیل فولیکول مو تحلیل رفته و از بین رفته باشد نیاز به کاشت مو پیدا می‌شود. یعنی از منطقه دیگری که فولیکول مو وجود دارد، این فولیکول‌ها برداشته شود و در منطقه مورد نیاز کاشته شود. این فولیکول‌ها چون زنده هستند و نیاز به تغذیه دارند و تغذیه آن‌ها از طریق خون‌رسانی است پس باید تا جایی زیر پوست قرار گیرند که خون‌رسانی کاملاً انجام شود [۷ و ۸]. همان گونه که ذکر شد تحریک زیستی با نور به وسیله لیزرهای کم‌توان دیرزمانی است که در جوامع پزشکی مطرح شده و تاکنون تأثیر لیزر کم‌توان در درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های مربوط به پوست و مو مورد بررسی قرار گرفته است [۹]. باتوجه به موارد ذکر شده در مورد سلول‌های بنیادی فولیکول مو و همچنین اثرات لیزر کم‌توان اطلاعات کمی در دسترس است، لذا، در این مطالعه سعی بر آن است که اثر لیزر کم‌توان بر روی زنده‌مانایی سلول‌های بنیادی فولیکول مو بررسی شود.

روش بررسی

جداکردن سلول‌های بنیادی فولیکول مو

موش‌ها در ظرف استوانه‌ای حاوی پنبه آغشته به کلروفرم قرار داده شدند، بعد از بیهوش شدن موش صحرایی، سر و صورت موش توسط محلول ۱:۱ بتادین و پراکسید به مدت ۳ دقیقه شستشو داده شد و سپس بافت لب بالای موش که حاوی سبیل بود، بریده شد به طوری که چند بیوپسی از بافت پشت لب که حاوی موهای سبیل بود، برداشته شد. نمونه‌های بیوپسی اخذ شده با بافر فسفات و الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد و در فالتون حاوی محیط کشت قرار داده شد و سپس در زیر هود مراحل مربوط به استخراج سلول‌های بنیادی فولیکول مو انجام گردید.

استخراج سلول‌های بنیادی

برای استخراج سلول‌های بنیادی چندتوان فولیکول مو از دو روش مکانیکی و آنزیمی استفاده می‌شود. به این صورت که ابتدا با روش مکانیکی، بافت همبند اطراف فولیکول برداشته شد و با اسکالپل نمونه‌ها به قطعات کوچک تقسیم شد. در روش آنزیمی، نمونه‌های حاصل از مرحله مکانیکی در محلول آنزیمی کلاژناز و دیسپاز II و در مدت زمان نیم ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

اثبات سلول‌های بنیادی

جهت اثبات سلول‌های بنیادی چندتوان از مارکرهای سطحی استفاده شد که این سنجش از طریق فلوسایتومتری BD FACS Calibur (BD biosciences, San Jose, CA, USA) انجام شد [۱۰]. پروتکل

تابش لیزر کم‌توان می‌تواند باعث تحریک سلول و افزایش تکثیر سلولی در برخی سلول‌ها گردد. در برخی مطالعات جهت درمان طاسی آندروژنیک اثر لیزر کم‌توان مورد بررسی قرار گرفته است [۱ و ۲]. لیزرهای کم‌توان لیزرهایی هستند که اثر حرارتی بر روی بافت نمی‌گذارند و با تحریک نوری بر روی سلول باعث واکنش‌های نوری در بافت می‌شوند که به آن تحریک زیست نوری می‌گویند [۱]. توان این لیزرها معمولاً زیر ۲۵۰ میلی‌وات می‌باشد. مکانیسم سلولی تأثیر لیزرهای کم‌توان بدین صورت است که به دنبال تابش فوتون‌های لیزر به سلول، پاسخ سلولی با فعال شدن گیرنده‌های نوری موجود در زنجیره تنفسی واقع در میتوکندری آغاز می‌شود و در اثر آن حالت اکسیداسیون-احیا سلولی تغییر حالت می‌دهد و همراه با تغییرات حالت غشاء سلولی با جابه‌جایی یون کلسیم و تغییرات PH و فعال شدن cAMP و رونویسی و نهایتاً بیان برخی پروتئین‌های دخیل در مسیرهای سیگنالینگ سلولی می‌شود. برخی از مسیرهای تنظیمی توسط حالت احیایی سلول میانجی‌گری می‌شود که تغییرات در حالت احیایی القاءکننده فعالیت تعداد زیادی مسیرهای سیگنالینگ است که این پاسخ سلولی القاءکننده تغییرات رونویسی است برخی از فاکتورهای رونویسی توسط تغییرات در حالت احیایی سلول تنظیم می‌شوند، از بین آن‌ها می‌توان به فاکتور رونویسی NF-kB اشاره کرد. لازم به ذکر است که لیزر کم‌توان از طریق تأثیر بر مسیر NF-kB می‌تواند منجر به افزایش تکثیر سلولی گردد. مطالعات نشان داده‌است که تحریک زیست‌نوری با استفاده از منابع نوری لیزرهای کم‌توان در طول موج‌های قرمز و مادون قرمز موجب افزایش فعالیت میتوکندری به صورت افزایش سنتز ATP، افزایش گرادیان پروتونی (ΔpH)، تغییر پتانسیل غشای میتوکندری ($\Delta\Psi$) و افزایش میزان ROS می‌گردد. از طرفی تحریک زیست نوری باعث افزایش سنتز mRNA در سلول، افزایش ترشح برخی از فاکتورهای رشد و سیتوکاین‌هایی که در روند ترمیم نقش دارند، می‌گردد [۳ و ۴]. به طور کلی بیشترین مطالعات به عمل آمده در لیزرهای کم‌توان در زمینه عملکرد سلولی و تغییرات مولکولی بوده است. از طرفی سلول‌های بنیادی که در انتهای فولیکول در لامینین و نواحی غنی از کلاژن ۴ ماتریکس خارج سلولی جای گرفته‌اند و برای القاء رشد مو ضروری هستند. مو از دو قسمت اصلی ریشه و ساقه تشکیل شده و در میان سه لایه پوست قرار گرفته است. مو از داخل کیسه‌ای به نام فولیکول رشد می‌کند. انتهای فولیکول‌ها در لایه مرکزی پوست متصل به مویرگ‌های خونی است. این مویرگ‌های خونی منبع مهمی برای تهیه اکسیژن و مواد مغذی برای رشد مو هستند [۵]. می‌توان گفت سلول‌های بنیادی فولیکول مو به عنوان stem cell های پرتوان (multipotent) که قابلیت Stemness و القای تشکیل فولیکول مو را دارد می‌باشد [۶]. تا زمانی که در یک منطقه فولیکول مو وجود داشته باشد، سعی بر

روز یک بار محیط کشت فلاسک ها تعویض می شوند. این سلول ها شبیه فیبروبلاست در محیط آزمایشگاهی تکثیر و رشد پیدا می کنند.

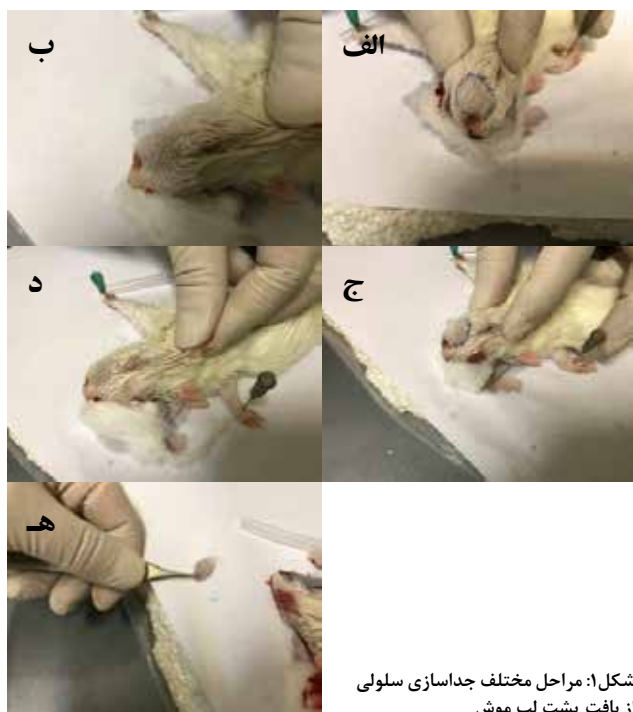
تصاویر مربوط به سلول های جدا شده در زیر نشان داده شده است: در روز اول و بلافاصله بعد از استخراج، ناخالصی های زیادی همراه با این سلول ها می باشد بعد از تعویض محیط کشت و حذف سلول های شناور، سلول های چسبیده به کف فلاسک قابل مشاهده بودند. معمولاً به دنبال تعویض محیط و کاسته شدن از میزان ناخالصی ها در روز اول، تعداد معدودی سلول با مورفولوژی فیبروبلاستی نیز در محیط کشت قابل مشاهده می باشند.

بررسی بیان مارک های مولکولی سلول های بنیادی چند توان استخراج شده

جهت اثبات سلول های بنیادی چند توان از مارک های سطحی استفاده شد که این سنتش از طریق فلوسایتومتری انجام شد. با توجه به مطالعات مختلف در زمینه بررسی سلول های بنیادی فولیکول موی بیومارک های مورد بررسی قرار گرفتند [۱۴ و ۱۵]. که بیومارک های بیان شده در سطح سلول های استخراج شده با مطالعات پیشین مطابقت داشتند که در شکل زیر نشان داده شده است.

بررسی اثر لیزر بر زنده مانایی سلول های بنیادی فولیکول موی

جهت بررسی اثر لیزر کم توان، سلول های کشت داده شده در معرض نور لیزر با طول موج ۶۸۵ نانومتر، با انرژی های $1-20 \text{ J/cm}^2$ قرار گرفتند و پس از دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱: مراحل مختلف جداسازی سلولی از بافت پشت لب موش

آماده سازی سلول های مزانشیمی جهت انجام ایمونوفنوتایپ: در مرحله اول پس از جداسازی سلول ها از فلاسک، با اضافه کردن $2 \mu\text{l}$ از محلول PBS در 1500 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم و شستشو می دهیم. پس از شستشو حجم نهایی رسوب سلولی را به وسیله PBS به 1 ml می رسانی. تعداد ۱۰ لوله فلوسایتومتری را انتخاب و به هر کدام $100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون سلولی اضافه می کنیم. به طور جداگانه به لوله ها آنتی بادی منوکلونال را اضافه می کنیم. پس از مخلوط کردن لوله ها آن ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4°C سانتی گراد انکوبه می کنیم. سپس جهت شستشو $500 \mu\text{l}$ از محلول PBS به لوله ها اضافه می نماییم و در دور 1500 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. به رسوب سلولی $250 \mu\text{l}$ محلول PBS اضافه می نماییم و نمونه را در دستگاه فلوسایتومتری خوانش می کنیم.

بررسی اثر لیزر بر سلول های بنیادی فولیکول مو

جهت بررسی اثر لیزر کم توان، سلول های کشت داده شده در معرض نور لیزر با طول موج ۶۸۵ نانومتر با انرژی های $1-20 \text{ J/cm}^2$ و در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار می گیرند و سپس زنده مانایی سلولی مورد بررسی قرار می گیرد [۱۳-۱۱].

بررسی تکثیر و توان زیستی سلول ها

برای بررسی اثر لیزر کم توان بر روی زنده مانایی سلول ها از تست MTT که یک تست رنگ سنجی به شمار می آید، استفاده خواهد شد. براساس اطلاعات به دست آمده از MTT می توان میزان تکثیر و زنده مانایی سلول ها را قبل و بعد از تابش نور لیزر کم توان بررسی کرد. به این ترتیب که بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تابش نور لیزر کم توان، پلیت سلول ها را از انکوباتور خارج می نماییم و یکدهم حجم رویی سلول ها به هر چاهک محلول (MTT) Dimethylthiazol-2yl 2-5 diphenyl tetrazolium bromide اضافه می کنیم و پلیت را به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار می دهیم. پس از سپری شدن ۴ ساعت، پلیت بیرون آورده شد و با خارج کردن محیط رویی به چاهک ها محلول DMSO اضافه گردید تا کریستال های بنفش رنگ فومارازون ایجاد شده در سلول هایی که زنده مانده اند، حل می شود و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. این مایع رنگی را به چاهک های پلیت الایزا منتقل و جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA READER با فیلتر رفرانس ۶۲۰ خوانده شد و درصد سلول های زنده در هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

جداسازی و استخراج سلول های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی

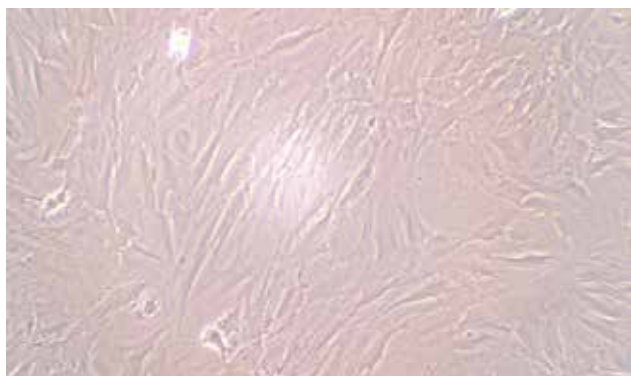
سلول ها پس از جداسازی به فلاسک حاوی محیط کشت و آنتی بیوتیک منتقل و داخل انکوباتور قرار داده می شوند. از روز پنجم به بعد هر سه



شکل ۳: سلول‌های استخراج‌شده پس از ۳ روز با مرفولوژی شبه فیبروبلاست



شکل ۴: سلول‌های استخراج‌شده پس از ۷ روز با مرفولوژی شبه فیبروبلاست



شکل ۵: سلول‌های استخراج‌شده پس از پاساژ با مرفولوژی شبه فیبروبلاست

تأثیر نور لیزر بر روی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی انجام شد. نتیجه نشان‌دهنده تأثیرات وابسته به دوز نور لیزر بر روی ویژگی‌های مرفولوژی و قابلیت تمایزی بود که داده‌های این مطالعه می‌تواند کمک مؤثری در مورد درمان سلولی بعد از پیوند باشد [۱۷]. همچنین مطالعه دیگری در مورد تأثیرات نور لیزر کم‌توان بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت مغز استخوان و چربی نشان‌دهنده رفتار وابسته به دوز هست به‌طوری‌که رشد و تکثیر بیشتر مشاهده شده مربوط به انرژی‌های ۱ ژول بر سانتی‌متر مربع می‌باشد. تحریک زیست‌نوری سلول‌های بنیادی



شکل ۲: مراحل استخراج سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی

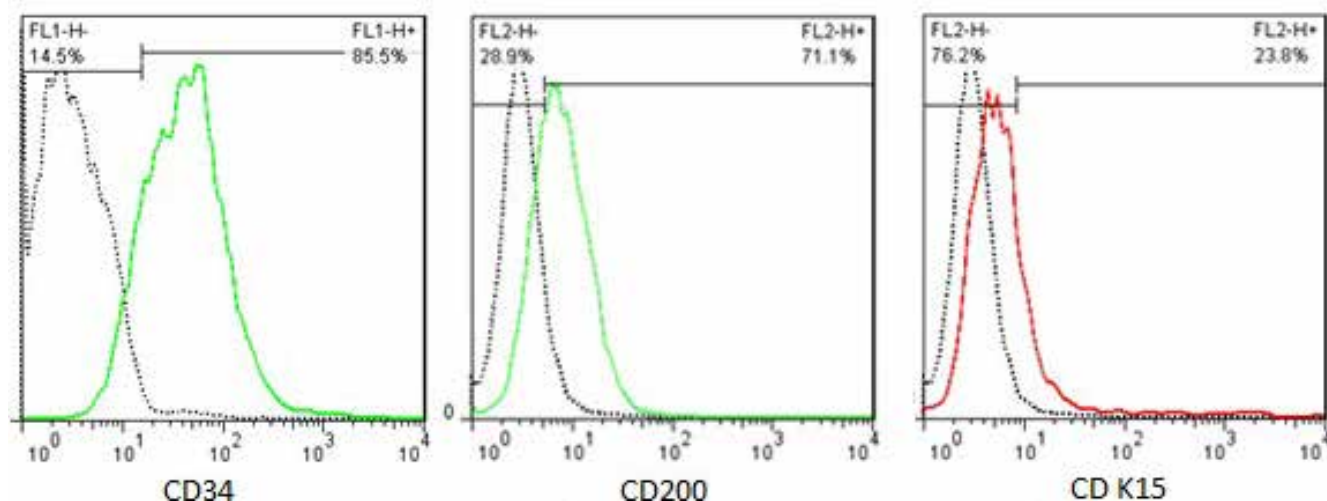
نمودارهای زیر زنده‌مانایی این سلول‌ها را در اثر نور لیزر با انرژی‌های مختلف و در دو بازه ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهد.

همان‌گونه‌که در شکل دیده می‌شود و با توجه به محاسبات آماری در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان زنده‌مانایی در انرژی ۵ ژول بر سانتی‌متر مربع بیشترین مقدار است که این تفاوت انرژی در ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار خود رسیده است.

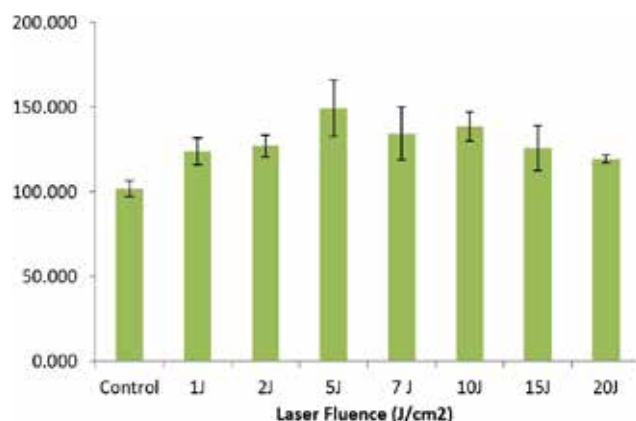
بحث و نتیجه‌گیری

امروزه، کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت‌های مختلف یکی از موضوعات جالب توجه در زمینه سلول‌درمانی و تحقیقات پزشکی است. این مسئله باعث گردیده است که محققان نگاه ویژه‌ای در ارتباط با جداسازی، کشت، تخلیص و به‌کارگیری این سلول‌ها در فرآیند درمان بیماری‌های خاص داشته باشند. از سلول‌های بنیادی فولیکول مو به عنوان مدل سیستم سلول‌های پاپیلای پوستی اولیه استفاده می‌شود. سلول‌درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی فولیکول موی پوستی می‌تواند رویکرد جدیدی را در زمینه کاشت مو ایجاد کند. قابل توجه است که سلول‌های پاپیلای پوستی، سلول‌های بنیادی پرتوان هستند که می‌توانند منجر به القای تشکیل فولیکول مو شوند [۶]. تازمانی‌که در یک منطقه فولیکول مو وجود داشته باشد، سعی بر آن است که با تحریک و تقویت و ایجاد شرایط مناسب منجر به رشد موها گردد [۷ و ۸]. نور لیزر کم‌توان برای کاربردهای بسیاری در پزشکی از جمله ترمیم زخم و همچنین درمان ریزش مو استفاده می‌شود.

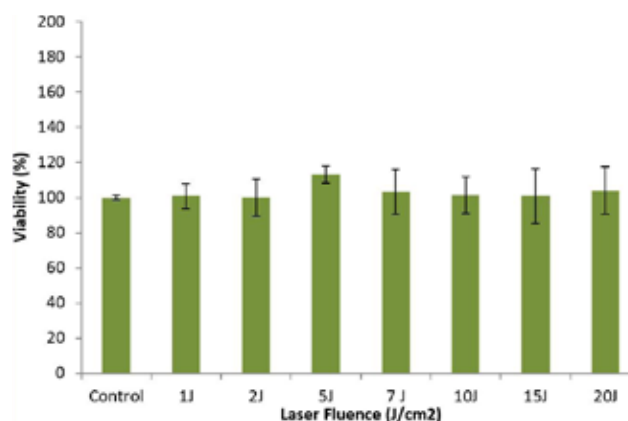
مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ توسط de Villiers در مورد اثر نور لیزر با طول موج ۶۳۹ نانومتر بر روی سلول‌های بنیادی مشتق‌شده از چربی نشان داد که نور لیزر منجر به افزایش زنده‌مانایی و تکثیر این سلول‌ها می‌شود [۱۶]. در مطالعه دیگری توسط بهاروند و همکاران در مورد



شکل ۶: بیان بیومارک های سطحی سلول های بنیادی فولیکول مو



شکل ۸: میزان زنده مانایی سلول های بنیادی فولیکول مو تحت تابش نور لیزر با انرژی های ۲۰-۱ ژول بر سانتی متر مربع در بازه زمانی ۴۸ ساعت



شکل ۷: میزان زنده مانایی سلول های بنیادی فولیکول مو تحت تابش نور لیزر با انرژی های ۲۰-۱ ژول بر سانتی متر مربع در بازه زمانی ۲۴ ساعت

در دوز ۵ ژول بر سانتی متر مربع در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش معنی داری را نشان می داد که این افزایش زنده مانایی در بازه زمانی ۴۸ ساعت به بیشترین حد خود رسید که با توجه با اثرات نور لیزر بر روی سلول ها [۱۹] مطابقت داشت. نتایج این مطالعه می تواند گامی مؤثر در جهت بهبود روش های سلول درمانی محسوب شود.

مزانشیمی توسط نور لیزر می تواند ابزاری مهم برای مهندسی بافت و پزشکی بازساختی باشد [۱۸].

در این مقاله اثر نور لیزر کم توان را در دوزهای انرژی ۱ تا ۲۰ ژول بر سانتی متر مربع بر سلول های بنیادی مشتق شده از فولیکول موی موش صحرایی مورد بررسی قرار دادیم. نتایج به دست آمده حاکی از افزایش زنده مانایی این سلول ها در معرض لیزر با برخی از دوزها بود به طوری که

References:

1. Van Gemert MC, Welch AJ. Clinical use of laser-tissue interactions. *Eng Med Biol Mag*. 1989; 8(4): 10-3.
2. Orasan MS. Stimulation of hair regrowth using low level laser treatment in a rat model of alopecia. *Digest. Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2013; 8(4): 1571-80.
3. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989; 56: 691-704.
4. Fernanda G, Diego M S, Mardem P, Vasconcelos B, Carlos A, Galvão B. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(8): 2189-94.
5. Chase HB. Growth of the hair. *Physiol Rev*. 1954; 34(1): 113-26.
6. Schneider R, Schmidt U, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Current Biology*. 2009; 19(3): 32-42.
7. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological Reviews*. 2001; 81(1): 450-81.
8. Yoo BY, Shin YH, Yoon HH, Seo YK, Park JK. Hair follicular cell/organ culture in tissue engineering and regenerative medicine. *Biochemical Engineering Chemical*. 2010; 48: 323-31.
9. Babapour R, Glassberg E, Lask GP. Low-energy laser systems. *Clinics in Dermatology*. 1995; 13: 87-90.
10. Nareika A. Markers Methods to Verify Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, & Quality. *Journal of Endocrinology*. 2008; 196: 45.
11. Ying-Ying H, Aaron C, Chen H, Carroll JD, Hamblin MR. BIPHASIC DOSE RESPONSE IN LOW LEVEL LIGHT THERAPY. *Dose-Response*. 2009; 7: 358-83.
12. Huang Y, C-H Chen A, Sharma S, Wu Q, Hamblin MR. Comparison of cellular responses induced by low level light in different cell types. *Society of Photo-optical Instrumentation Engineers*. 2010; 7552: 75520-32.
13. Aaron Ch, Ying-Ying H, Praveen R, Hamblin MR. Role of reactive oxygen species in low level light therapy. *The International Society for Optical Engineering*. 2009; 7165: 716502-14.
14. Nobakht M, Najafzadeh N, Pourheydar B, Golmohammadi MG. Isolation of Rat Hair Follicle Stem Cells and in Vitro Study of Stem Cell Factors in Iran. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2011; 11(2): 176- 85.
15. Behvarz M, Maleki M, Mashayekhi M. Evaluating the Expression of Mesenchymal Stem Cells Markers in Human Hair Follicle Stem Cells. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2014; 14(4): 360- 70
16. de Villiers JA, Houreld NN, Abrahamse H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. *Stem Cell Rev Rep*. 2011; 7(4): 869-82.
17. Baharvand H, Soleimani M, Gourabi H. The Effect Of Low Level Laser Irradiation On Human Embryonic Stem Cells. *The cell Journal (Yakhteh)*. 2005; 7(2): 56-125.
18. Carlos A, Galvão B, Fernanda G, Diego MS, Águida C, Gomes H, Roseana d, Almeida F. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. 2014; 12(1): 75-81.
19. Naderi MS, Razzaghi M, Esmaceli D, Javid Gh, Hajebrahimi Z. A Comparative Study of 660 nm Low-Level Laser and Light Emitted Diode in Proliferative Effects of Fibroblast Cells. *J Lasers Med Sci*. 2017 ; 8(Suppl 1): S46-S50