لیزر در پزشکی ۱۴۰۰/ دوره ۱۸ / شماره (۳) / صفحات ۱۱-۱.

مقاله پژوهشی

مطالعه لیزر کم‌توان و عصاره پلی‌فنلی پوست مرکبات بر تغییرات بیولوژیکی سلول‌های CHO و Hela

بهنام جواهری[۱]
غلامرضا اسماعیلی جاوید[۲]*
کاظم پریور[۳]
آزاده حکمت[٤]

۱- گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲ استادیار پژوهش، گروه پژوهشی ترمیم نوری مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسندهٔ‌مسئول: غلامرضا اسماعیلی جاوید
پست الکترونیکی:
e_djavid@yahoo.com

شماره تماس: ۰۹۱۲۵۰۳۲۰۶۵

چکیده

مقدمه: سرطان دهانه رحم و تخمدان از علل شناخته شده مرگ در بین زنان است. پلی‌فنول‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه بوده و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و نقش به سزایی در درمان سزطان ایفا می‌کند. سیننستین یکی از اعضاء خانواده پلی‌فنل‌های متیله شده بوده که در مرکباتی نظیر پرتقال و گریپ فروت یافت می‌شوند. در این مطالعه استفاده همزمان لیزر کم‌توان و پلی‌فنل متیله شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش: سلول‌های CHO و Hela در پلیت‌های مشخصی کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به زمان مناسب رشد، توسط سیننستین با غلظت ۱/۰-۱-۱۰-۱۵۰/۵۰ میکرومولار به مدت ۲٤ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. گروهی دیگر در تابش لیزر کم‌توان در مدت ۹۰ ثانیه(با انرژی ۳J/cm2) و گروه آخر تحت درمان همزمان لیزر کم‌توان و سیننستین قرار گرفتند. برای تعیین میزان شکست احتمالی DNA از روش کامت استفاده شد و به منظور بررسی فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی از DCFH-DA استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS،(ANOVA) و برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون t استفاده شد. کلیه آزمایشات به صورت سه گانه انجام شد.

نتیجه: نتایج ما نشان داد که زمان دوبرابرشدن سلول‌های CHO و Hela به ترتیب ۲۰/۷ و ۲۷/۷ ساعت بوده است. میزان غلظت مهاری ۵۰ درصدی CHO ۱۰ و برای سلول‌های Hela ۵۰ میکرومولار است.

نتایج MTT نشان داد که که پیش درمان با لیزر کم‌توان و سیننستین می‌تواند مرگ سلولی را در مقایسه با سیننستین و لیزر کم‌توان به تنهایی افزایش دهد. تولید ROS در سلول‌های درمان‌شده با لیزر کم‌توان و سیننستین افزایش یافت. در هر دو رده سلولی که تنها با لیزر کم‌توان و لیزر کم‌توان – سیننستین تحت درمان قرار گرفتند تغییرات DNA به صورت جزئی رخ دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که استفاده همزمان لیزر کم‌توان و پلی‌فنل سیننستین درمان کارآمد برای درمان سلول‌های CHOو Hela هستند.

واژه‌های کلیدی: لیزر کم‌توان، سیننستین، آنتی‌اکسیدان، اثر ضدسرطان، ترکیب درمان، سلول‌هایCHO و Hela

مقـــدمه

سرطان دهانه رحم یکی از سرطان‌های شایع زنان در کشورهای در حال توسعه است. بیماران در سن‌های پایین‌تر نیز مجبور به تحمل سرطان دهانه رحم می‌شوند و انواع آسیب‌شناسی بدخیمی‌ها تغییر می‌کند. عامل اصلی ایجاد این سرطان HPV است. انواع HPV بسته به پتانسیل انکوژنیک آنها به عنوان گونه‌های کم‌خطر یا پرخطر طبقه‌بندی می‌شوند(۱و۲). یکی از شایع‌ترین و در حقیقت دومین بیماری بدخیمی سرطان‌های زنان، تخمدان است(۳). پلی‌فنل‌ها به عنوان ماده آنتی‌اکسیدانتی محسوب می‌شوند و وفور آن‌ها در مواد غذایی و نقش آن‌ها در پیشگیری از ابتلا به بیماری‌هایی همچون سرطان، بیماری‌های قلبی - عروقی و خود ایمنی بوده است. این ترکیبات می‌توانند براساس ساختار شیمیایی خود رادیکال‌های آزاد را از محیط حذف کنند(٤). پلی‌فنول‌ها به‌طور مستقیم به اجزای پروتئینی دخیل در ایجاد سرطان متصل و فعالیت آن‌ها را تنظیم می‌کنند. اتصال پلی‌فنول‌ها به پروتئین‌های مختلف به وسیله شباهت‌های ساختاری بین آن‌ها صورت می‌گیرد بنابراین در سلول پلی‌فنول‌ها می‌توانند پروتئین‌های مختلف را هدف‌گیری کرده و به عنوان یک عامل شیمیایی ضدسرطان عمل کنند(٥). پلی‌فنول‌ها می‌توانند از ایجاد سلول‌های سرطانی در مراحل اولیه جلوگیری کنند و یا در صورت ایجاد آن، تبدیل سلول‌های پیش سرطانی به سلول‌های بدخیم را متوقف نمایند(٦). به نظر می‌رسد که مرکبات منابع عالی گیاهی هستند و در آنها پلی‌متیلیتد فلاون (PMF) وجود دارد. Sinensetin یک PMFS است که در Stamineus Orthosiphon و روغن پرتقال یافت می‌شود، این PMFs در برابر سرطان با اثرات آنتی‌اکسیدانی است(۷).



ساختار شیمیایی پلی‌فنل سیننستین

لیزر کم‌توان می‌تواند نفوذپذیری سلولی را برای داروها به دلیل انتقال میتوکندری اجباری با واسطه گونه‌های اکسیژن فعال افزایش دهد(۸). لیزر کم‌توان با سیتوکروم c اکسیداز پذیرفته می‌شود. افزایش پتانسیل غشای میتوکندری، مصرف اکسیژن و تولید ATP به‌طور جدی نشان داده شده است. اکسید نیتریک و ROS به طور گذرا تولید می‌شوند(۹).

درحقیقت زمانی که فوتون‌های لیزر به سلول، پاسخ سلولی با فعال‌شدن فوتواکسپتورهای موجود در زنجیر تنفسی واقع در میتوکندری آغاز می‌شود(۱۰).

مطالعات نشان داده است که سیتوکروم C- اکسیداز یک کروموفور اصلی در پاسخ به نور لیزر کم‌توان است. جذب فوتون‌ها به‌وسیله سیتوکروم C-اکسیداز منجر به برانگیختگی الکترونی کروموفور می‌شود. بنابراین فعال‌شدن فوتون‌ها به‌وسیله آنزیم سیتوکروم C-اکسیداز نقش حیاتی در فعال‌شدن آبشارهای بیولوژیکی متنوع پس از تابش لیزر ایفا می‌کند(۱۱و۱۲) و لیزر کم‌توان می‌تواند نفوذپذیری سلولی را برای داروها به دلیل انتقال میتوکندری اجباری با واسطه گونه‌های اکسیژن فعال افزایش دهد(۹).

این مطالعه به منظور بررسی اثر تابش همزمان لیزر کم‌توان و پلی‌فنل سیننستین بر روی سلول‌های نرمال CHO و سرطانی Hela انجام گرفت. با توجه به جدیدبودن استفاده از پلی‌متیلیتدهای متابولیت ثانویه و لیزر کم‌توان بر آن شدیم تا با انجام این پروژه کمکی به درمان سرطان تخمدان باشیم.

برای انجام این امر بخشی از سلول‌ها (نرمال و سرطانی) در معرض تابش لیزر کم‌توان قرار گرفتند، گروهی دیگر با کمک پلی‌فنل‌سیننستین تحت تیمار دارویی بوده و نهایتاً گروه آخر در معرض درمان لیزر کم‌توان و پلی‌فنل سیننستین قرار گرفتند.

روش بررسی

رده‌های سلولیCHO (سلول‌های تخمدان همسترچینی) و Hela (سلول سرطانی)،

از بانک ملی سلول ایران (موسسه پاستور، ایران) خریداری شد.

سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco)، استرپتومایسین ۲۰۰ μg/ml و پنی‌سیلین ۵۰۰units/ml، (Sigma) کشت داده در انکوباتور (رطوبت ۳۷درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد co_2) قرار داده شد. پس از رشد مناسب، سلول‌ها ۰/۲۵Trypsin/EDTA درصد در بافر فسفات نمکی(PBS) پاساژ داده می‌شدند.

منحنی رشد

محاسبه مدت زمان دو برابرشدن[۱]سلول‌ها و شناسایی خصوصیات رشد یک رده سلولی حائز اهمیت است. در این مرحله سلول‌های CHO و Hela با تراکم $cell/cm^2$ ۱۰۰۰۰ و$cell/cm^2$ ۸۰۰۰، در هر چاهک پلیت‌های ۲۴ چاهکی افزوده شد. روزانه سلول‌های کف و رویی سه چاهک جمع‌آوری شده و تعداد سلول‌های زنده شمارش گردید. هر سه روز یک بار نیمی از محیط کشت هر چاهک خارج و محیط کشت جدید حاوی ۱۰ درصد سرم به درون هر چاهک افزوده شد. هر رده سلولی سه بار آزمایش از سه نمونه مستقل با سه بار تکرار در هر روز انجام شد. تکثیر سلول‌ها و منحنی رشد آن‌ها به صورت یک الگوی سیگموئیدی بوده و می‌توان در آن چهار فاز مختلف را مشاهده کرد. برای رسم منحنی رشد محور عمودی تعداد سلول‌ها در مقیاس لگاریتمی و محور عمودی تعداد سلول‌ها در مقیاس لگاریتمی و روی محور افقی روزهای شمارش قرار گرفت.

لیزر کم‌توان[۲]

به منظور تیمار سلول‌ها به از لیزر کم‌توان (BTL-5000, Germany) با مشخصات طول موج ۶۸۵-۸۳۰ نانومتر، صورت خواهد گرفت. این سیستم دارای طول موج ۶۸۵/۸ نانومتر است، حالت تابش پرتو به صورت مداوم بوده و توان خروجی آن ۵۰MV و چگالی انرژی آن $J/^{cm2}$ ۳ است. حجم محیط درون ظرف‌های محیط کشت طوری تنظیم شد که پرتو لیزر به‌صورت یکنواخت به تمامی ناحیه پرتودهی برسد.

آزمون MTT

این تست به منظور بررسی اثر سمیت یک ماده بر روی قدرت تکثیر سلول‌ها و به‌طور کلی بقاء سلولی از روش ساده سریع و ارزان که بر پایه تکنیک‌های رنگ‌سنجی[۳]است.

تست اول سنجش سمیت دارویی، هر دوره سلولی با تراکم ذکرشده در مراحل قبل در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شد و برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت سلول‌ها تحت تیمار سیننستین(Caymanchem, USA) با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰،۱۰۰/۱۵۰ میکرومولار قرار گرفته‌اند. بعد از گذشت زمان‌های ذکرشده، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک MTT (Sigma USA) با غلظت نهایی ۰/۰۵ mg/ml در محیط کشت در هر چاهک افزوده شد. بعد از سه ساعت، رسوب آبی فورمازان مشاهده شد، در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO (Merck Germany) برای حل‌کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک اضافه شد و جذب محلول هر چاهک توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۷۰nm(مربوط به جذب رنگ MTT) و ۶۳۰nm (مربوط به جذب زمینه) سنجیده شد.

تست دوم سنجش میزان سمیت نور لیزر کم‌توان، در این تست سلول‌های CHO و Hela کشت داده شده و زمانی که در فاز لگاریتمی قرار گرفتند تیمار با لیزر برای آنها آغاز شد. به هر دو رده سلولی در مدت زمان‌های ۳۰،۶۰،۹۰ ثانیه لیزر کم‌توان تابیده شد سپس از استوک MTT به آنها افزوده شد. بعد از سه ساعت، رسوب آبی فورمازان مشاهده شد، در این مرحله از حلال DMSO استفاده و جذب محلول هر چاهک توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ذکر شده خوانده و در صد بقای سلولی محاسبه شد.

تست سوم سنجش میزان سمیت ترکیب پلی‌فنل سیننستین-لیزر کم‌توان و لیزر کم‌توان - پلی‌فنل سیننستین، در این آزمون سلول‌های سرطانی و سالم ذکرشده در این پژوهش کشت داده شده و در چند مرحله تحت تیمار قرار گرفتند در مرحله نخست، سلول‌های CHO با ۱۰ ماکرومولار سیننستین و سلول‌های Hela با ۵۰ ماکرومولار سیننستین تحت تیمار قرار گرفتند و پس از گذشت ۲۴ ساعت با

---

[۱] Doubling Time

[۲] Low-Level-Laser(LLL)

[۳] Colorimetric

کمک نور لیزر کم‌توان در مدت زمان ۹۰ ثانیه درمان آن‌ها کامل شد. در آزمون دیگر سلول‌ها تحت تیمار با لیزر کم‌توان به مدت ۹۰ ثانیه و پلی‌فنل سینستین قرار گرفتند برای سلول‌های CHO ۱۰ ماکرومولار و سلول‌های Hela ۵۰ ماکرومولار.

در نهایت از استوک MTT وحلال DMSO استفاده و جذب محلول هر چاهک توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ذکر شده خوانده و در صد بقای سلولی محاسبه شد.

بررسی تولید گونه‌های اکسیژن فعال

در این تست از رنگ فلوروژنیک DCFDA استفاده گردید. DCF یک ماده بسیار فلورسنت است که می‌تواند با طیف‌سنجی فلورسانس مشاهده شد

برای انجام این تست، سلول‌های CHO و Hela با تراکم cell/cm̆ ۱۰۰۰۰ و $cell/cm^2$ ۸۰۰۰ در پلیت‌های ۲٤ چاهکی کشت داده شدند. در این مرحله ۳ گروه تیمار سلول‌ها ۱-۲-۳ انجام گرفت.

۱) سلول‌های CHO با ۱۰ ماکرومولار سینستین و سلول‌های Hela با ۵۰ ماکرومولار سینستین تحت تیمار قرار گرفتند.

۲) سلول‌های CHO و Hela در مدت زمان ۹۰ ثانیه تحت تیمار قرار گرفتند.

۳) تیمار با پلی‌فنل سینستین در سلول‌های CHO۱۰ ماکرومولار و سلول‌های Hela ۵۰ ماکرومولار و لیزر کم‌توان به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد.

بعد از قرارگرفتن در بهترین وضعیت سلولی به مدت یک روز دیگر انکوبه شدند. بعد از آن سلول‌ها با بافر PBSشسته و با ۲۰ ماکرومولار DCFDبه مدت ٤۵-۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رنگ شدند بعد از آن سلول‌ها مجدداً با بافرPBS شسته شدند. درنهایت شدت فلورسانس DCFDA (Sigma USA) با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی سنجش میزان شکست‌های ایجادشده در DNA

اساس این روش بر مبنای حرکت رشته‌های DNA واسرشته شده در الکتروفورز است به طور کلی این روش به چهار قسمت تقسیم می‌شود.

۱- انجام تست کامت بر روی سلول‌های CHO وHela (در ارتباط با این مرحله می‌توان گفت که تنها سلول‌ها کشت داده و مورد آزمون قرار گرفت.)

۲- بررسی این تست بر روی سلول‌های بعد از تابش لیزر کم‌توان

۳- ارزیابی این آزمایش بعد از تیمار با پلی‌فنل مربوطه در رده سلولی CHO وHela (در این مورد بعد از کشت سلولی سلول‌ها، تحت تیمار سینستین با غلظت ۱ و ۱۰ میکرومولار قرار گرفتند سپس آزمون کامت انجام شد.)

٤- سنجش تست الکتروفورز منفرد سلول‌های CHO و Hela بعد از تیمار لیزر کم‌توان و سینستین می‌شود.

پلیت مورد نظر (تریپسینه شد) سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۲۰۰ میکرو لیتر از ژل آگارز با دمای ذوب پایین (۱%) مخلوط کرده و که حالت ۵% ایجاد می‌شود، سپس ۳۰۰ میکرو لیتر از سلول‌ها را برداشته و روی یک سمت لام پوشیده شده با آگارز معمولی قرار می‌دهیم و با لامل پخش می‌کنیم. لام‌ها به جار فلزی منتقل و در یخچال گذاشته می‌شود تا ژل کاملاً بسته شود بعد از ۵ تا ۱۰ دقیقه باید محلول لیزکننده را اضافه کرده و مجدداً لام‌ها را برای یک ساعت در یخچال قرار می‌دهیم. پس از گذشت این مدت زمان لام‌ها را در تانک الکتروفورز قرار می‌دهیم و محلول دناتوره‌کننده را را روی سطح لام‌ها می‌ریزیم. سطح تانک با فویل پوشیده شده تا نور به آن برخورد نکند. برای این که محلول دناتوره‌کننده روی سلول‌ها اثر گذاشته و رشته‌های DNAاز هم باز شود باید لام‌ها ۳۰ دقیقه در این محلول قرار بگیرد سپس تانک را به برق‌وصل کرده (۱v/cm) و نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در این شرایط قرار داده می‌شوند (عرض تانک ۱٦ سانتیمتر است بنابراین ولتاژ روی ۱٦ ولت تنظیم می‌شود) پس از این مرحله لام‌ها در بافر خنثی‌کننده برای ۵ دقیقه قرار گرفتند.

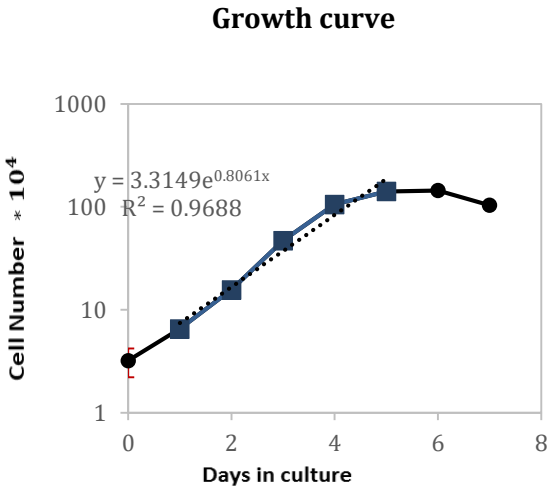
تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی متغییرها از نرم‌افزارهای Excel و MATLAB و SPSS نسخه ۱۷ و از روش T-Test استفاده گردید و برای بررسی سنجش معنی‌داری از روشANOVA استفاده شد. تمامی داده‌های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بودند. میزان معنا داری آزمون۰٫۰۵>P محاسبه شد.

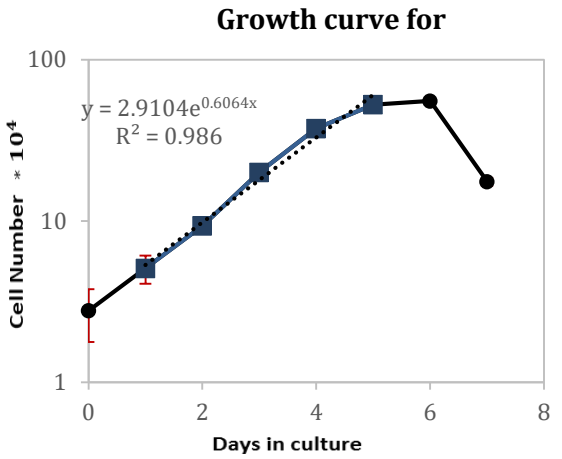
یافتـه‌ها

منحنی رشد سلول‌هایCHO وHela

شمارش و رسم منحنی رشد در مقیاس نیمه لگاریتمی، سه فاز رشد تاخیری، رشد لگاریتمی و رشد ثابت مشخص شده است. در نمودار زیر منحنی رشد سلول‌هایCHO وHela از مجموع سه آزمایش مستقل نمایش داده شده است. بر این اساس، متوسط زمان دوبرابرشدن از مجموعه سه آزمایش مستقل برای سلول‌های CHO و Hela به ترتیب ۲۰/۷ و ۲۷/۷ ساعت بدست آمد (نمودار ۱ الف و ب).



(الف)



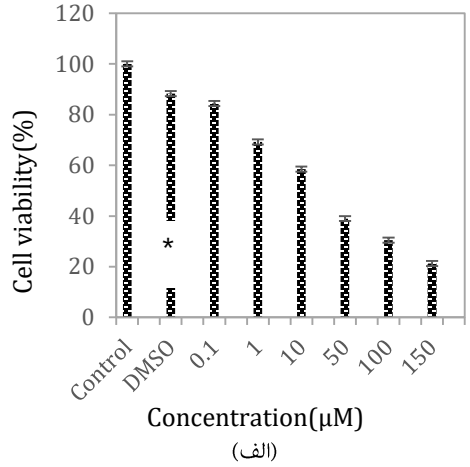
(ب)

نمودار ۱: رسم منحنی رشد سلولی الف) CHO و ب) Hela از مجموع سه آزمایش مستقل در مقیاس نیمه لگاریتمی. فاز لگاریتمی برای هر دو رده سلولی در روزهای ۱ تا ۵ داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) نشان داده شده است.

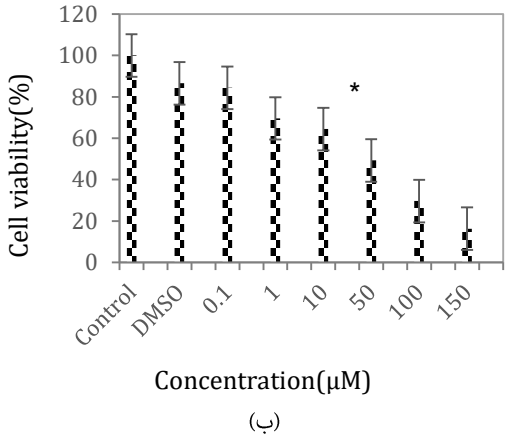
بررسی تاثیر سیننستین بر تکثیر سلول‌های HelaوCHO

تست اول سنجش سمیت دارویی

پس از قرارگرفتن سلول‌ها در فاز لگاریتمی تیمار سیننستین (یک گروه کنترل بدون تیمار و یک گروه تیمار حاوی DMSO) با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار در مدت زمان ۲۴ ساعت انجام شد. در منحنی شماره ۲ تیمار دو رده CHO و Hela نشان داده شده است. براساس آنالیز آماری انجام شده اختلاف بین درصد بقاء سلول‌ها در گروه نمونه کنترل بر نمونه کنترل حلال DMSO در هر دو رده سلولی به لحاظ آماری معنی دار نیست. براساس منحنی زیر غلظت مهاری ۵۰ درصدی سلول‌های CHO و Hela به ترتیب ۱۰ و ۵۰ میکرومولار بوده است.



(الف)

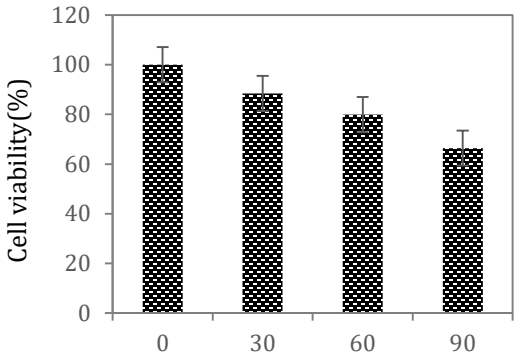


(ب)

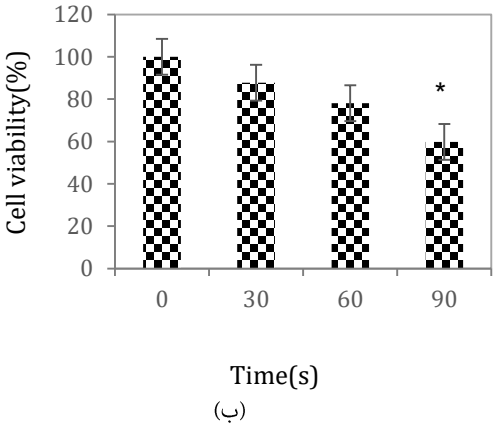
نمودار ۲: رده سلولی الف) CHO و ب) Hela تیمارشده با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میکرومولار از سینسنتین پس از ۴۸ ساعت تیمار، از طریق نمودار خطی گزارش شده است. نتایج حاصل سه بار تکرار بوده است، داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین SEM نمایش داده شده است.* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P<0.05$) میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

تست دوم سنجش میزان سمیت نور لیزر کم‌توان

در این مرحله سلول‌هایی که در فاز لگاریتمی قرار دارند به مدت زمان‌های ۹۰،۶۰،۳۰ ثانیه لیزر کم‌توان تابیده شد. در این مرحله محلول MTT و DMSO به سلول‌ها اضافه و در نهایت جذب محلول فورمازان توسط دستگاه الایزا درطول موج‌های۵۷۰ nm و۶۳۰ nm خوانده شد. در منحنی شماره ۳ تیمار دو رده CHO و Hela نشان داده شده است.با توجه به نمودار حاصله مدت زمان تیمار ۹۰ ثانیه‌ای لیزر انتخاب شد.



(الف)



(ب)

نمودار ۳: الف) رده سلولی CHO و ب) Hela تیمارشده در زمان‌های ۶۰،۳۰ و ۹۰ ثانیه.نتایج حاصل سه بار تکرار بوده است، داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین SEM نمایش داده شده است.* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P<0.05$) میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

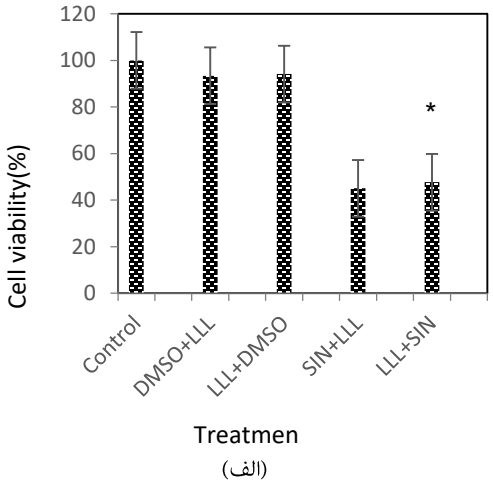
تست سوم سنجش میزان سمیت ترکیب

این تست در دو مرحله آزمایشگاهی انجام گرفت و در نمودار شماره ٤ درمان‌ها به به صورت زیر بود:

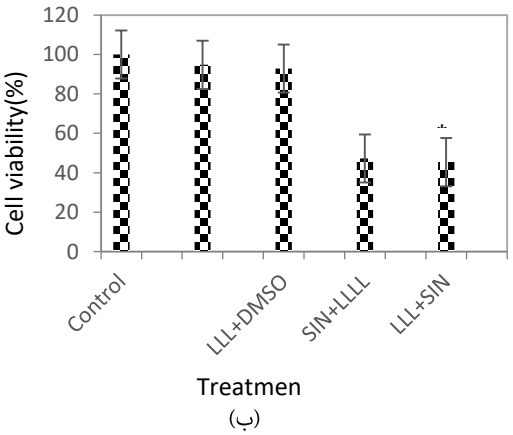
الف) پلی‌فنل سیننستین - لیزر کم‌توان: در این مرحله، سلول‌های CHO و Hela به ترتیب با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰

ماکرومولار سیننستین تحت تیمار قرارگرفتند و جذب محلول هر چاهک توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد.

۲) لیزر کم‌توان - پلی‌فنل سیننستین: در این مرحله، سلول‌های CHO و Hela برای مدت ۹۰ ثانیه تحت تابش لیزر کم‌توان قرار گرفتند بلافاصله بعد از پرتودهی تیمار سلول‌های با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ خوانده شد.



(الف)



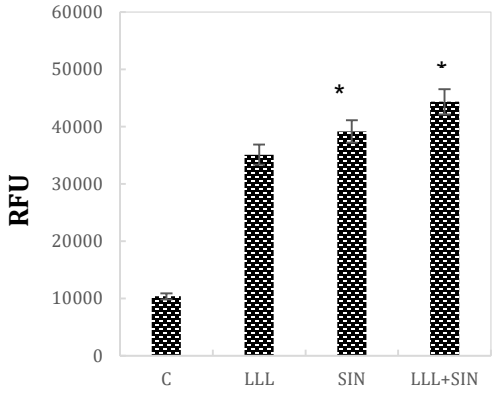
(ب)

نمودار ٤: رده سلولی الف)CHO و ب) Hela تیمارشده با غلظت ۱۰و۵۰ میکرومولار از سیننستین و تابش ۹۰ ثانیه‌ای لیزر کم‌توان - و تابش ۹۰ ثانیه‌ای تیمارشده با غلظت ۱۰و۵۰ میکرومولار از سیننستین. نتایج حاصل سه بار تکرار بوده است، داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین SEM نمایش داده شده است.* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P<0.05$) میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

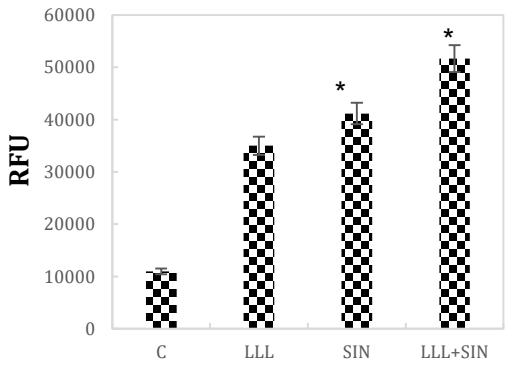
بررسی تولید گونه‌های اکسیژن فعال

همان‌طورکه گفته شد در بررسی میزان اکسیژن فعال برای ارزیابی غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار سیننستین برای سلول‌هایCHO وHela، تابش ۹۰ ثانیه لیزر کم‌توان و استفاده همزمان لیزر کم‌توان – سیننستین در این پژوهش از رنگ فعال ماده فلورسنت استفاده گردید.

همان‌طور که در نمودار ۵ الف و ب مشخص است، سلول‌های CHO و Hela تولید ROS را نشان دادند. سطح ROS به ویژه در طول درمان ترکیبی (لیزر کم‌توان – سیننستین) افزایش یافت.



(الف)

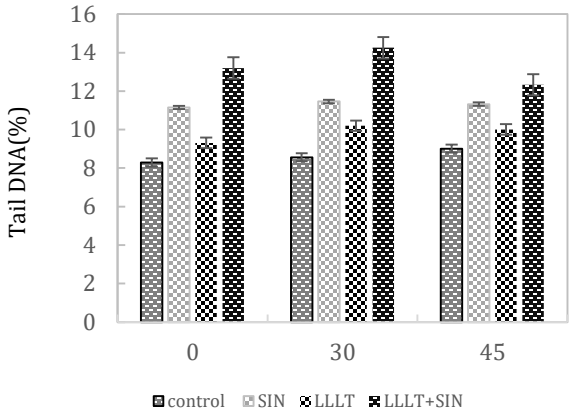


(ب)

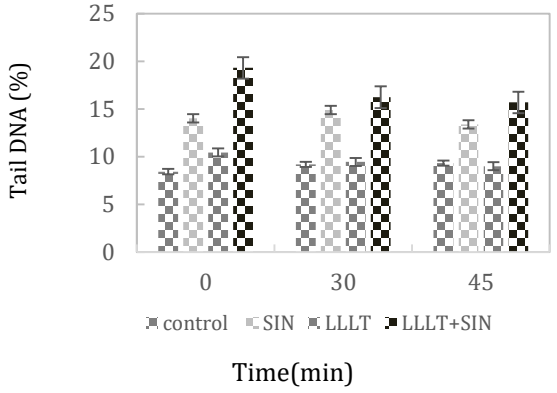
نمودار ٥: رده سلولی الف)CHO و ب) Hela تیمارشده با ۹۰ ثانیه لیزر کم‌توان - سیننستین۱۰ و ۵۰ میکرومولار به تنهایی و تابش ۹۰ ثانیه ای تیمار شده با غلظت ۱۰و۵۰ میکرومولار از سیننستین.نتایج حاصل سه بار تکرار بوده است، داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین SEM نمایش داده شده است.* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P<0.05$) میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

بررسی میزان آسیب‌های ایجاد شده ناشی از لیزر کم‌توان، سیننستین و درمان لیزر کم‌توان - سیننستین در سلول‌های CHO و Hela

به منظور بررسی میزان آسیب ایجادشده در DNA از آزمون کامت استفاده شد. سنجش کامت با استفاده از سیننستین (۵۰،۱۰ میکرومولار) برای CHO و Hela، تابش ۹۰ ثانیه‌ای لیزر کم‌توان و درمان ترکیبی (لیزر کم‌توان – سیننستین) برای ارزیابی آسیب DNA ناشی از هر روش انجام شد. در سلول‌های CHO و Hella تحت درمان با سیننستین به تنهایی هیچ مورد قابل توجهی وجود ندارد. در هر دو رده سلولی که تنها با لیزر کم‌توان و لیزرکم‌توان – سیننستین تحت درمان قرار گرفتند تغییرات جزئی رخ دادند. سطح DNA در شکل ٦ مشخص گردید. ($P<0.05$)



(الف)



(ب)

نمودار ٦: میزان شکست‌های DNA با استفاده از آزمون کامت قلیایی به صورت میزان طول دنباله در زمان‌های ۴۵،۳۰،۰ الف)CHO و ب) Hela تیمارشده با ۹۰ ثانیه لیزر کم‌توان -سیننستین۱۰ و ۵۰ میکرومولار به تنهایی و تابش ۹۰ ثانیه‌ای تیمارشده با غلظت ۱۰و۵۰ میکرومولار از سیننستین.نتایج حاصل سه بار تکرار بوده است، داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین SEM نمایش داده شده است.* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری ($P<0.05$) میان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

محدودیت اصلی در استفاده از مواد شیمی درمانی یا پرتودرمانی ایجاد اثرات جانبی در بافت‌های سالم مجاور تومور است. با توجه به این‌که استفاده همزمان مواد حساس‌کننده پرتویی به موادشیمیایی، در صورتی که همزمان استفاده شوند. استفاده از درمان‌های ترکیبی پلی‌فنلی‌های گیاهی به همراه شیمی درمانی یا پرتودرمانی به علت استفاده از دوزهای درمانی کمتر، سبب کاهش سمیت سیستمیک درمان‌های رایج سرطان مانند شیمی درمانی و لیزردرمانی می‌شود. پلی‌فنل‌ها همچنین باعث محافظت بافت سالم در کنار تومورها می‌شوند. استفاده از درمان ترکیبی به واسطه پلی‌فنل‌های گیاهی همراه با پرتودرمانی، منجر به استفاده دزهای کمتر شده در نتیجه موجب کاهش سمیت سیستمیک می‌شود(۱۳و۱٤). امروزه فتوتراپی با نور مادون قرمز ٦۰۰–۱۰۰۰ نانومتر) (لیزر) به عنوان ابزاری ارزشمند در پزشکی معرفی شده است و تأثیر مثبت فتوتراپی بر رشد سلول‌های مختلف به خوبی شناخته شده است(۱۵). در سال ۲۰۱۰نشان داده

شد که لیزرها تاثیر به سزایی در بهبود سلول‌ها و بافت‌ها دارند(۱۶) لدن و همکارانش در سال ۲۰۱٤ بیان کردند که، تأثیرات درمانی فتومدیسین ناشی از تبدیل انرژی جذب‌شده به ATP است(۱۷). پلی‌فنول‌ها ترکیبات طبیعی هستند که در گیاهان همه جا مانند میوه‌ها، سبزیجات، غلات و نوشیدنی‌ها تشخیص داده می‌شوند. پلی‌فنول‌ها متابولیت‌های ثانویه و در برابر حشرات، گیاه‌خواران و میکروارگانیسم‌ها هستند. در غذا، پلی‌فنول‌ها بر تلخی، قابض‌بودن، رنگ، طعم، بو و ثبات اکسیداتیو تأثیر می‌گذارند(۱۸و۱۹). سیننستین یکی از گروه‌های مهم پلی‌فنول‌ها (فلاون پلی متیله شده) است. این پلی‌فنل گیاهی در چندین نوع مرکبات وجود داشته و فعالیت‌های ضدسرطانی قوی هستند(۲۰). پلی‌فنول‌ها با انتقال اتم H رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند و بنابراین ممکن است اثرات مضر ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش دهند(۲۱).

داده‌های ما نشان داد که سیننستین دارای سمیت سلولی در برابر رده‌های سلولی CHO و Hela است، این داده‌ها مشابه سایر مطالعات است(۷). مطالعات نشان داده است که میزان تولید ROS توسط سلول‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر جذب انرژی توسط گیرنده‌های داخل سلولی پس از لیزر درمانی مورد استفاده قرار گیرد.. گونه‌های ROS مولکول‌های بسیار کوچکی هستند که دارای طبیعت دوگانه هستند. آنها ممکن است به عنوان یک مولکول سیگنالینگ مفید در غلظت‌های پایین و یک مولکول سمیت سلولی مضر در غلظت‌های بالا عمل کنند. آنها ممکن است به مولکول‌های حیاتی کلیدی از جمله DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب برسانند(۲۲).

با کمک اطلاعات حاصل از پروژه می‌توان گفت که سلول‌های سرطانی تحت درمان با لیزر کم‌توان به تنهایی نمی‌توانند اثر قابل ملاحظه‌ای در درمان سزطان داشته باشد اما استفاده همزمان لیزر کم‌توان و سیننستین باعث عملکرد بهتر در سلول‌های سرطانی خواهدشد.

References

1- Lopez-Charcas O, Espinosa AM, Alfaro A, Herrera-Carrillo Z, Ramirez-Cordero BE, Cortes-Reynosa P, Salazar EP, Berumen J, Gomora JC. The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of Na V 1.6 channels is mediated by MMP-2 activity. Scientific reports. 2018 Aug 29;8(1):1-6.

2- Stark A, Gregoire L, Pilarski R, Zarbo A, Gaba A, Lancaster WD. Human papillomavirus, cervical cancer and women's knowledge. Cancer Detection and Prevention. 2008 Jan 1;32(1):15-22.

3-Vargas AN. Natural history of ovarian cancer. Ecancermedicalscience. 2014;8.

4-Lecour S, T Lamont K. Natural polyphenols and cardioprotection. Mini reviews in medicinal chemistry. 2011 Dec 1;11(14):1191-9.

5-Singh A, Holvoet S, Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. Clinical & experimental allergy. 2011 Oct;41(10):1346-59.

6-Manach C, Scalbert A, Morand C, Ré mé sy C, Jimé nez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition. 2004 May 1;79(5):727-47.

7-Rezakhani N, Goliaei B, Parivar K, Nikoofar AR. Effects of X-irradiation and sinensetin on apoptosis induction in MDA-MB-231 human breast cancer cells. International Journal of Radiation Research. 2020;18(1):75-82.

8- Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. Journal of lasers in medical sciences. 2014;5(2):58.

9-de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. IEEE Journal of selected topics in quantum electronics. 2016 Jun 9;22(3):348-64.

10-Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. Annals of biomedical engineering. 2012 Feb 1;40(2):516-33.

11- de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy, IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 2016; 22: 348-64. doi:10.1109/ JSTQE.2016.2561201

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

13-Poggi MM, Coleman CN, Mitchell JB. Sensitizers and protectors of radiation and chemotherapy. Current problems in cancer. 2001 Nov 1;25(6):334-411.

14-Verheij M, Vens C, van Triest B. Novel therapeutics in combination with radiotherapy to improve cancer treatment: rationale, mechanisms of action and clinical perspective. Drug Resistance Updates. 2010 Feb 1;13(1-2):29-43.

15-Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. Exp Biol Med (Maywood). 2012;237(11):1241-1248. doi: 10.1258/ebm.2012.012180.

16-Bhide SA, Nutting CM. Recent advances in radiotherapy. BMC Med. 2010;8:25. doi:10.1186/1741-7015-8-25.

17-Ledon JA, Savas J, Franca K, Chacon A, Nouri K. Laser and light therapy for onychomycosis: a systematic review. Lasers Med Sci. 2014;29:823-829. doi:10.1007/s10103-012-1232-y.

18- Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. Phytochemistry. 1994 Jun 1;36(3):781-4.

19- Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. Drugs under experimental and clinical research. 1998;24(3):133-8.

۲۰- Lam IK, Alex D, Wang YH, Liu P, Liu AL, Du GH, Yuen Lee SM. In vitro and in vivo structure and activity relationship analysis of polymethoxylated flavonoids: identifying sinensetin as a novel antiangiogenesis agent. Molecular nutrition & food research. 2012 Jun;56(6):945-56.

21- Hossain MA, Ismail Z. Quantification and enrichment of sinensetin in the leaves of Orthosiphon stamineus. Arabian Journal of Chemistry. 2016 Nov 1;9:S1338-41.

22-Miura Y. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. J Radiat Res. 2004;45:357-372.