لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۶، دورهٔ ۱۴، شمارهٔ ۱، صفحات: ۲۵-۱۷.

مقاله پژوهشی

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

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

خلاصه

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

روش بررســی: سلول‌های فیبروبلاست پوست انســان (رده Hu02) در معرض غلظت‌های مختلــف بنزن (۱۰۰μg/mL-۰)، قرار گرفت و به‌مدت ۲ ســاعت در انکوباتور نگهداری شــد. ســپس اثــر تابش لیزر کم‌تــوان با طول‌مــوج ۶۶۰ نانومتر با انرژی J/cm^2 ۳ بر بقای ســلول هــای در معرض بنزن و همچنین اثــر تابش میزان انرژی‌های متفاوت لیزر کم‌توان J/cm^2 ۱، J/cm^2 ۲، J/cm^2 ۳ و J/cm^2 ۶ بر ســلول‌های در معرض غلظت‌های (۰،۱۰،۲۰μg/mL) از بنزن با استفاده از تست MTT و میکروسکوپ اینورت نوری بررسی شد.

یافته‌ها: اثر لیزر کم‌توان بر بقای ســلول‌های در معرض غلظت‌های پایین‌تراز (۱۰ μg/mL) از بنزن مثبت و در جهت حفظ بقاء سلولی ولی در غلظت‌های بالاتر از (۱۰ μg/mL)، با کاهش بقاء سلولی همراه است. اثر میزان انرژی‌های متفاوت در غلظت‌های (۱۰ μg/mL و۰) در جهت حفظ بقاء ســلولی اســت ولی در غلظت (۲۰ μg/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 کاهشــی 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: آلاینده های نفتی، بنزن، لیزر کم‌توان درمانی(LLLT)، سلول فیبروبلاست انسانی، بقاء سلولی

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

۲. گروه پژوهشی لیزر پزشــکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحدعلوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. گروه پژوهشــی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحدعلوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویســندهٔ مســئول: پروانه مقامــی، تلفــن: ۰۲۱۴۴۸۶۵۳۲۳
پســت الکترونیــک: **maghami@srbiau.ac.ir**

نویســندهٔ مسئول: خاطره خرســندی، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۹۲۵۷۲
پســت الکترونیــک: **khorsandi.kh@ut.ac.ir**

مقدمه

رشـد فن‌آوری و صنعت، کشف و کاربرد ده‌ها هزار نوع ترکیب با خواص فیزیکی، شـیمیایی مختلف، موجب آلودگی هوای شـهرها و محیط‌های کاری گردیده است. همچنین تراکم وسایل نقلیهٔ موتوری و استقرار صنایع در شـهرها و پیرامون آن‌ها محیط شـهری را با مشکلات زیست‌محیطی مواجه نموده است که در رأس آن، وضعیت نامطلوب و بیمارگونهٔ کیفیت هوا است. روند روبه‌افزایش آلودگی هوا به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه به‌طور جدی سـلامت انسان‌ها را تهدید می‌کند. یکی از مهم‌ترین خطرات این فرآیند که از هر سـه جنبهٔ بهداشـت، ایمنی و محیط زیسـت حائز اهمیت اسـت، نشر هیدروکربن‌های آلی در هوا است. از انواع هیدروکربن ها دستهٔ آروماتیک از عوامل آلاینده و خطرناک محیط زیست به‌شمار می روند که عمدتاً بر اثر سـوخت ناقص فسـیلی تولید می‌شوند[۱و۲]. بنزن کوچک‌ترین و پایدارترین هیدروکربن آروماتیک(شـکل۱) و یک مایع بی رنـگ متمایل بـه رنگ زرد با بوی نافذ اسـت. وزن مولکولی بنزن ۷۸/۱، نقطـهٔ جـوش آن ۸۰/۱°C، نقطهٔ ذوب آن ۵/۵°C و چگالی نسـبی بخار آن ۲/۷ g/L می‌باشـد. بنزن به مقدار کمی در حدود ۱/۷۹ g/L در آب با دمای ۲۵درجهٔ سـانتی‌گراد قابل حل اسـت[۵-۳]. بنزن به‌طور گسترده در صنعت تولید پلیمرها، رزین و الیاف مصنوعی اسـتفاده 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 می-شود. مشخص شده است که مواجهه با سطح بالایی از بنزن با ایجاد و پیشرفت سـرطان خون در ارتباط اسـت. آزمایش‌های حیوانی نیز نشان‌دهندهٔ این مطلب اسـت که قرارگیری بیش از حد در معرض بنزن خطر ناباروری یا باروری پرخطر را به‌دنبال دارد[۷].

دسـتگاه‌های لیزر سیستم‌هایی هسـتند که باریکه‌های نوری منسجم، تک‌رنگ و با شـدت بالا تولید می‌کنند. امروزه، کاربرد لیزرها به دو دلیل عمده بسـیار گسترده شده است: ۱- لیزرها به‌عنوان منبع نوری (فوتونی) به‌شـدت متمرکز و تکفام معروف هسـتند و ۲- طبیعت همدوسی بالای لیزر باعث کاربردهای قابل توجه آن‌ها می‌باشد[۸]. در میان فن‌آوری‌های توسـعه‌یافته، درمان با لیزر کم‌توان روش نسـبتاً جدیدی می‌باشـد. لیزر کم‌توان در سـطح سـلولی عمل می‌کند و نتایج آن شـامل کاهش درد، کاهش التهاب و بهبود بخشیدن به ترمیم بافت است[۹].

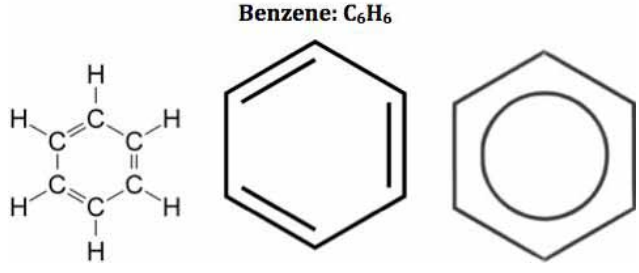
لیزر کم‌توان درمانـی دارای توان کمتر از ۲۵۰ میلی‌وات بوده و معمولاً طیـف باریکی از محـدودهٔ قرمز یا نزدیک به مـادون قرمز (۱۱۰۰-۶۰۰ نانومتـر)، بـا چگالی توان (تابش) کمتـر از (۱۰۰ mW/cm^2) و چگالی انـرژی بیـن (۵۰-۰/۰۴ J/cm^2) دارد[۱۰]. مکانیسـم سـلولی لیزر کم توان با جـذب نور قرمز و مادون قرمز به‌وسـیلهٔ کروموفور یا گیرنده‌های نـوری موجود در میتوکنـدری، تولید گونه‌های فعال اکسـیژن (ROS)، نیتریک اکسـید (NO) و درنهایت افزایش ATP و فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسـیدان نظیر کاتالاز، پراکسیداز و .. همراه می‌باشد[۱۱]. مطالعات نشـان داده اسـت که سـیتوکروم سی‌اکسـیداز یک کروموفور اصلی در پاسـخ به نور لیزر کم‌توان است[۱۲]. جذب فوتون‌ها به‌وسیله سیتوکروم سی‌اکسـیداز منجربـه برانگیختگـی الکترونـی کروموفور می‌شـود و در نتیجه واکنش انتقال الکترون تسـریع می‌یابد. انتقال الکترون لزوماً باعث افزایش تولید ATP می‌شـود. بنابراین فعال‌شدن فوتون‌ها به‌وسیلهٔ آنزیم سیتوکروم سی‌اکسیداز، نقش حیاتی در فعال شدن آبشارهای بیولوژیکی متنوع پس از تابش لیزر ایفا می‌کند[۱۳و۱۴]. یکی دیگر از مکانیسم‌های اثر لیزر، اثر مهاری NO می‌باشـد بدین‌صورت که NO به میزان زیادی توسـط فرآیند التهابی در میتوکنـدری ایجاد می‌گردد و به سـیتوکروم سی‌اکسـیداز متصل و مانع از اتصال اکسـیژن به سیتوکروم سی‌اکسیداز می‌شـود که این فرآیند به‌ویژه در شـرایط استرسـی و یا در مواردی‌که سلول در شرایط هیپوکسـیک 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 به‌وسیلهٔ NO را وارونـه کند، به این صورت که NO را به‌وسـیلهٔ برهمکنش‌های نوری از محل‌های اتصال آن جدا می‌کند. اتصال NO به سـیتوکروم سی اکسیداز نسـبت به پیوندهای کووالانسـی ضعیف‌تر می‌باشد این جدایی ممکن اسـت به‌وسـیلهٔ نـور مرئی یا مـادون قرمز که انـرژی کافی برای شکسـتن پیوندهای کووالانسی را دارا نمی‌باشـند، انجام پذیرد. درنتیجه جدایی NO از سـیتوکروم سی‌اکسیداز تنفس سـلولی و ATP افزایش می‌یابـد[۱۴]. درنتیجه لیزر کم‌توان باعث افزایش متابولیسـم سـلولی، سـیگنالینگ سـلولی، تنظیم رشـد و نمو سلولی، سـنتز پروتئین، اسید نوکلئیک و فعال‌سـازی آنزیم‌ها می‌شـود. نقش لیـزر کم‌توان در افزایش تولید ATP محدود نمی‌شـود، بلکه از راه‌های دیگر مانند تکثیر سلولی، مهاجرت سـلولی، تولید فاکتور رشد، تولید سـایتوکین‌ها و ازطریق فعال کردن فاکتور رونویسی هم تأثیرگذار است[۱۲و۱۷-۱۵].

مطالعات نشان‌داده‌است که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ویران‌کننده می‌باشـد و می‌توانند به آنزیم‌ها، لیپیدهای غشایی و اسیدهای نوکلوئیک آسـیب برسـانند. در شـرایطی که میتوکندری‌ها (به‌دلیل کمبود ADP یـا O_2) تولیـد ATP نکنند (به همین دلیـل دارای یک نیروی حرکتی پروتونی بزرگ هسـتند)و همچنین نسـبت بالای $NADH/NAD^+$ در ماتریکس وجود داشته باشد.

میتوکندری در شـرایط استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرد و تولید ROS افزایـش می‌یابد[۱۸]. مکانیسـم‌های دفاعی در برابر آسـیب‌های ROS بسـیار مهم هستند و باعث کاهش آسـیب‌های ثانویه در عدم تعادل بین تولیـد ROS و فعالیـت آنزیم‌های آنتی‌اکسـیدان ازجمله سوپراکسـید دیسـموتاز، گلوتاتیون پراکسـیداز، کاتالاز و هم‌اکسیژناز می‌شوند. بیشتر مطالعات نشـان می‌دهد که لیزر کم‌توان اثرات مفیدی بر سـطح استرس اکسیداتیو دارد که به عمل خود لیزر و عوامل آنتی‌اکسیدان بستگی دارد.

لیزردرمانی 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 مطالعهٔ حاضر، اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزرکم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر بر پتانسیل سمیت سلولی بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی در تاریکی و در معرض تابش لیزر مورد بررسی قرار گرفت.



شکل۱: ساختار مولکولی بنزن

روش بررسی

کشت سلول

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

سلول‌ها در محیط DMEM به‌همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در شرایط ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، CO_2 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 هرچاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۱×۱۰^{۴} سلول فیبروبلاست کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور(۳۷ درجهٔ 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 میگروگرم 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 ۱×۱۰^{۴} سلول درچاهک‌های پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌ها با مقادیر مشخصی از بنزن شامل ۰، ۱۰، ۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ میگروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به‌مدت دو ساعت انکوبه شدند. پس از طی شدن زمان مورد نظر، سلول‌ها در معرض تابش لیزر (دستگاه لیزر LX2 Thor) با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر به‌مدث ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی J/cm^2 ۳ قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، مرگ و میر سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی و درصد توان زیستی باقیماندهٔ سلول‌ها در مقایسه با کنترل منفی تعیین شد. گروه کنترل منفی به‌عنوان سلول‌های فقط در معرض تابش لیزر کم‌توان تعریف شدند.

در غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن، زمان تابش لیزر در بازه‌های زمانی متفاوت و با انرژی مختلف تابش، ($۱J/cm^2$) ۳۰s، ($۲J/cm^2$) ۶۰s و ($۶J/cm^2$) ۱۸۰s انجام شد. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار گردید.

بررسی توان زیستی سلول‌ها به‌روش MTT

در این مطالعه به‌منظور بررسی توان زیستی سلول‌ها از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. در روش MTT، آنزیم‌های دهیدروژناز در سلول‌های زنده با فعالیت آنزیمی خود منجربه تبدیل‌شدن 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 طی‌شدن زمان انکوباسیون به‌مدت 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 ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر MTT اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور برای مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. پس از طی‌شدن زمان مورد نظر چاهک‌ها تخلیه شدند و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی‌متیل سولفاکساید (DMSO) اضافه شد. DMSO به‌عنوان حلال بلورهای فورمازان عمل می‌کند و باعث ایجاد رنگ بنفش با شدت‌های مختلف بسته‌به زنده بودن یا مردن سلول می‌شود.

جذب نوری سلول‌ها در هر چاهک جهت بررسی درصد توان زیستی سلول‌ها به‌وسیلهٔ دستگاه الایزاریدر در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر درمقایسه با جذب نوری گروه کنترل منفی (سلول‌های بدون بنزن) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به‌دست‌آمده تحلیل گردیدند و برروی نمودار آورده‌شدند.

بررسی مورفولوژی با میکروسکوپ اینورت نوری

به‌منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست انسانی درمعرض بنزن و تابش لیزر کم‌توان، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از بنزن (۰، ۱۰و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت دو ساعت انکوبه شدند. پس از طی شدن زمان مورد نظر، سلول‌ها درمعرض تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی تابشی J/cm^2 ۳ قرار گرفتند سپس سلول‌ها با

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 طوری‌که در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میگروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن درصد بقاء سلول‌ها به‌ترتیب ۸۰، ۶۰، ۵۵ و ۵۲ درصد کاهش می یابد (شکل ۱).

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

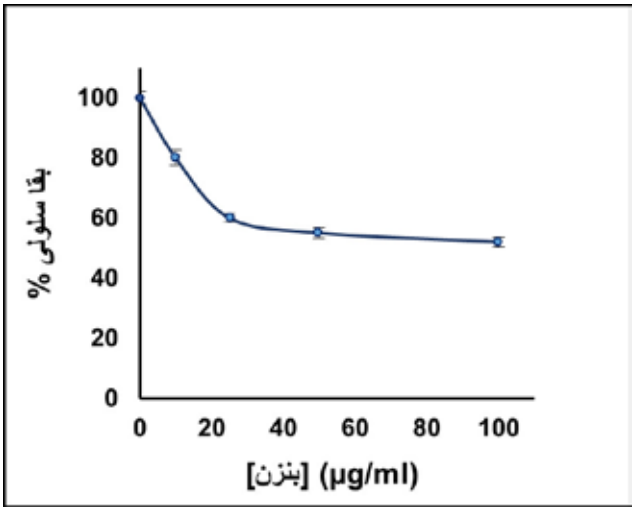
نتایج آزمایش مربوط به بررسی اثر بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی در حضور تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی $3\ J/cm^2$ نشان داد که اثر لیزر کم‌توان در غلظت ۱۰میکروگرم بر میلی لیتر مثبت بوده و به‌عبارتی بقاء سلولی را حفظ کرده است. در غلظت‌های بالاتر(۲۵ ، ۵۰ و۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) 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 درمعرض بنزن

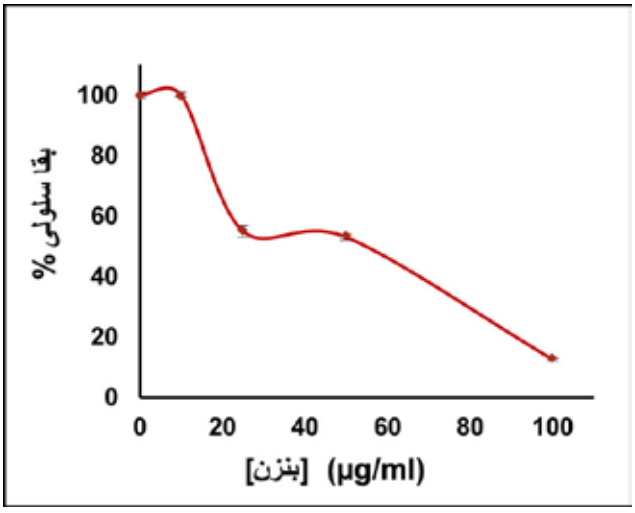
درادامهٔ مطالعات، اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر در غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بررسی شد. همان‌طورکه در شکل ۴ نشان داده شده است، در غلظت ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن، انرژی‌های مختلف بر روی بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی اثری ندارد و فقط در دوز انرژی بالاتر ($6\ J/cm^2$)، 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 کم-توان 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 $3\ J/cm^2$ میزان بقاء سلولی نسبت‌به حالت کنترل(تاریکی) افزایش داشت که این افزایش در انرژی بالاتر ($6\ J/cm^2$)، نسبت به انرژی‌های دیگر کمتر بوده است اما، نسبت‌به حالت کنترل (تاریکی) کمی افزایش داشته است (شکل۵).

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



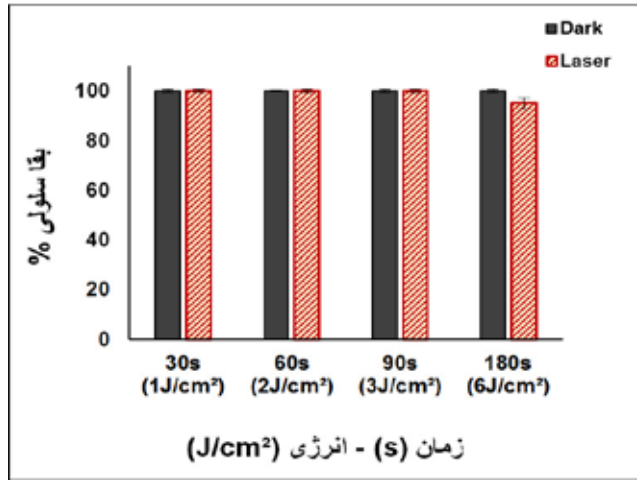
شکل۲: اثر غلظت‌های مختلف بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با بنزن در تاریکی



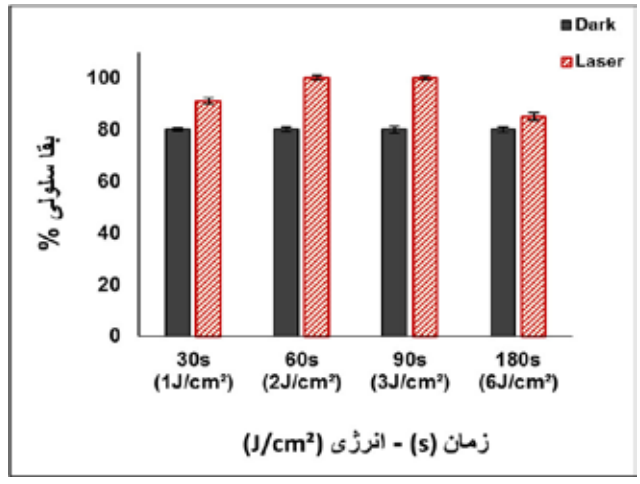
شکل۳: اثر غلظت‌های مختلف بنزن بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با بنزن و تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی $3\ J/cm^2$

میزان ۶۴ درصد مشاهده می‌گردد. این کاهش بقاء در حضور انرژی تابش لیزر $1\ J/cm^2$، به مقدار کمی تا ۶۹ درصد نسبت‌به آزمایش تاریکی افزایش یافت. در انرژی تابش $2\ J/cm^2$، میزان بقاء سلولی بدون تغییر و در انرژی تابش $3\ J/cm^2$، کاهش بقاء سلولی به ۵۱ درصد و در انرژی تابش $6\ J/cm^2$، کاهش بقاء سلولی به‌میزان ۴۸ درصد مشاهده شد. نتایج نشان داد که تابش لیزر کم‌توان در انرژی‌های بالاتر منجربه کاهش بقاء سلول‌ها و در انرژی‌های کمتر، از مرگ و میر سلول‌ها نسبت‌به حالت کنترل جلوگیری نموده است.

باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده به‌منظور مشاهدهٔ اثر لیزر کم‌توان بر سمیت سلولی ناشی از بنزن بر مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست انسانی، سلول‌ها

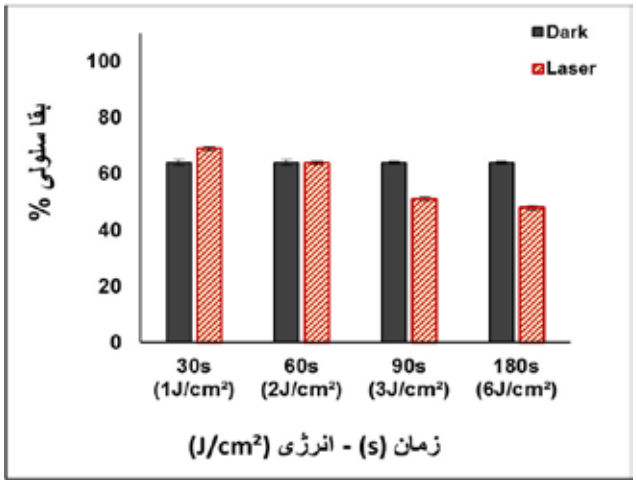


شکل۴: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر بقای سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی درمعرض غلظت ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به‌مدت ۲ ساعت در تاریکی و تابش لیزر کم‌توان با انرژی‌های ۱ J/cm²، ۲ J/cm²، ۳ J/cm² و ۶ J/cm²



شکل۵: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر بقای سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی درمعرض غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به‌مدت ۲ ساعت در محیط تاریک و تابش لیزر کم‌توان با انرژی‌های ۱ J/cm²، ۲ J/cm²، ۳ J/cm² و ۶ J/cm²

با غلظت‌های متفاوت از بنزن (۰، ۱۰و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت دو ساعت انکوبه شدند. پس از طی‌شدن زمان مورد نظر، سلول‌ها درمعرض تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰نانومتر با انرژی تابشی ۳ J/cm^2 قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت نوری و بزرگ‌نمایی X ۴۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. همان‌طورکه در شکل ۷ مشاهده می‌شود، قسمت A وB و D به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ سلول‌های فیبروبلاست انسانی در محیط تاریکی و لیزر با غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن، C و D به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ سلول‌های فیبروبلاست انسانی در محیط تاریکی و لیزر با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن و E وF نشان دهندهٔ سلول‌های فیبروبلاست انسانی در محیط تاریکی و لیزر با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بنزن می‌باشد (شکل ۷). همان‌طورکه مشاهده



شکل۶: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر بقای سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی در معرض غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن به‌مدت ۲ ساعت، در محیط تاریک و تابش لیزر کم‌توان با انرژی‌های ۱ J/cm²، ۲ J/cm²، ۳ J/cm² و ۶ J/cm²

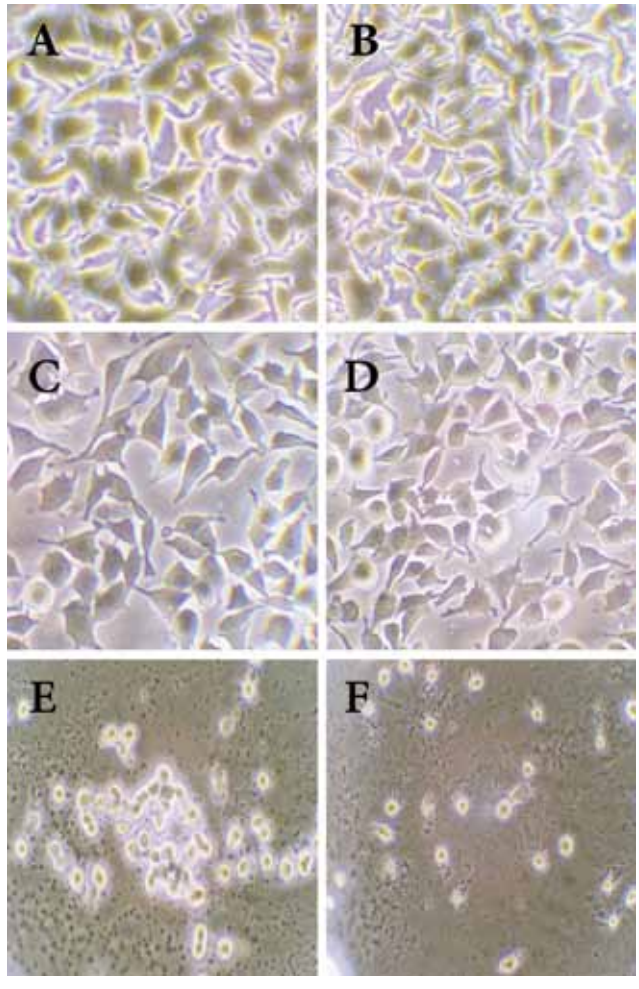
می‌شود، با افزایش غلظت بنزن (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از تعداد سلول‌ها کاسته می‌شود و همچنین مورفولوژی سلول‌ها ازحالت دوکی‌شکل و گرد و کوچک‌شده تغییر شکل می‌یابد.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات مختلف نشان‌داده‌است که تماس طولانی‌مدت با بنزن و متابولیت‌های آن منجربه اثرهای زیان‌بار در سیستم خون‌سازی، ایجاد و توسعهٔ سرطان‌خون در بدن می‌گردد. Zhang و همکاران مکانیسم‌های بالقوهٔ سمیت بنزن را درزمینه‌های نقش متابولیسم بنزن در کبد و انتقال به مغز استخوان برای متابولیسم ثانویه، ایجاد استرس اکسیداتیو توسط گونه‌های فعال اکسیژن توسط چرخهٔ ردوکس، تغییر کروموزومی ازجمله جابه‌جایی، ایجاد آناپلوییدی، 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 ناشی‌از بنزن ایفا می‌کنند[۲۱]. همان‌طورکه مطالعات نشان‌داده است، بنزن می‌تواند ساختار پروتئین و آنزیم‌های مختلف را تغییر و فعالیت آن را کاهش دهد و درنهایت بر عملکرد سلول تأثیر بگذارد. بنزن می‌تواند دیوارهٔ سلولی را تخریب کند و باعث از بین رفتن سلول شود. قرار گرفتن درمعرض 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 می شود[۲۴]. بسیاری از اثرات مخرب بنزن منجربه اختلال در کاهش ایمنی و درنهایت بدخیمی‌های خونی می‌گردد[۲۵].

برخی از پژوهشگران در مطالعات جداگانه‌ای اثر لیزرکم‌توان را بر آنزیم



شکل۷: مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان ردهٔ Hu۰۲ درمعرض غلظت ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن درتاریکی(A) با تابش لیزر کم‌توان(B) ، غلظت۱۰ 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 منجربه افزایش اکسیداسیون سیتوکروم سی‌اکسیداز و انتقال الکترون می‌گردد. جذب فوتون در مولکول منجربه ایجاد حالت تحریک‌شده در سلول و تسریع واکنش‌های انتقال الکترون و درنهایت افزایش تولید ATP می‌شود که منجربه افزایش فعالیت پمپ‌های پروتونی ازجمله Na^+/H^+ و Ca^{2+}/Na^+ می‌گردد[۲۶و۲۷].

Karu و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که NO در مکانیسم پاسخ سلولی به لیزرکم‌توان در ناحیهٔ قرمز نقش دارد. سلول‌های سرطانی Hela پس از ۳۰ دقیقه تابش با لیزر در طول‌موج ۶۰۰ تا ۸۶۰ نانومتر و یک لیزر دیود با طول‌موج ۸۲۰ نانومتر شمارش شدند. نیتریک‌اکسید NO، سدیم‌نیتروپروساید SNP، تری‌گلیسیریل GTN و سدیم‌نیتریت $NaNO_2$، به محیط سلول‌ها قبل یا بعد از تابش اضافه شدند. تیمار سلول‌ها با SNP قبل‌از تابش به‌طور قابل توجهی ویژگی سلول‌های متصل‌شده را تغییر می‌دهد. ظاهراً این عمل از طریق اتصال NO به سیتوکروم سی‌اکسیداز انجام می‌شود[۲۸]. همانگونه‌که اشاره شد، شواهد بسیاری در رابطه با تأیید اثرگذاری لیزر کم‌توان بر مسیرهای میتوکندریایی وجود دارد. نقش میتوکندری به عنوان تأمین‌کنندهٔ 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 زنجیرهٔ تنفسی در میتوکندری در بسیاری از مطالعات مورد توجه بوده است. در مطالعهٔ حاضر نشان‌داده‌شد که افزایش غلظت بنزن می‌تواند تأثیرات مشخصی بر کاهش بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی بگذارد که یافته‌های به‌دست‌آمده از مطالعهٔ ما با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. Gaido و همکاران نشان دادند که با افزایش غلظت متابولیت‌های بنزن درصد تشکیل کلونی سلول‌هاکاهش معنی‌داری پیدا می‌کند درصورتی‌که غلظت‌های پایین متابولیت‌های بنزن تأثیر کمتری بر تشکیل کلونی سلول‌های بافت بنیادی داشت[۲۹]. در این مطالعه اثر سمیت بنزن درحضور لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی J/cm^2 ۳ مطالعه شد. در غلظت پایین بنزن (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اثر لیزر کم‌توان درجهت حفظ بقاء سلولی(حدود ۱۰۰ درصد بقاء سلولی درحضور لیزر کم‌توان) در برابر سمیت ایجادشده توسط بنزن (۸۰ درصد بقاء سلولی در تاریکی) می‌باشد. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که لیزر کم توان 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 گلوتاتیون، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز از سلول در برابر عوامل اکسیداتیو محافظت می‌کند. برخی پژوهشگران اظهار داشته‌اند که لیزر کم‌توان از سلول‌های حیوانی به‌واسطهٔ مهار فعالیت NADPH اکسیداز در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند[۱۹و۳۰]. بنابراین یافته‌های حاصل‌از 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 لیزرکم‌توان در جهت کاهش بقاء سلولی است. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بنزن بقای سلولی به ۱۲/۵ درصد نسبت‌به 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 مطالعهٔ حاضر، اثر انرژی‌های متفاوت تابش لیزر بر بقاء سلول‌های فیبروبلاست انسانی درمعرض 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

مختلف لیزر کم‌توان اثر مثبت بر سلول دارد و با قدرت رادیکال‌زایی بنزن مقابله می‌کند و نسبت‌به گروه کنترل (تاریکی) بقاء سلولی را حفظ می کند. 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 تأثیرکاهشی 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 طول‌موج ۶۳۲/۸ نانومتر در دوزهای مختلف انرژی لیزر ($16\ J/cm^2$، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۰/۵) به‌مدت ۲ روز متوالی برروی فیبروبلاست نرمال و زخمی پوست انسان انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که مورفولوژی سلول‌های زخمی که درمعرض تابش انرژی $5\ J/cm^2$ قرار گرفتند، به حاشیهٔ زخم مهاجرت کردند و تکثیر سلولی بدون افزایش میزان آسیب سلولی و مولکولی افزایش یافت. درحالی‌که در دوزهای بالاتر $16-10\ J/cm^2$، کاهش بقاء سلولی، تکثیر سلولی، آسیب به DNA و غشاء سلولی دیده شد. این بررسی نشان داد که دوز $5\ J/cm^2$، با تحریک فعالیت میتوکندری منجر به بهبود عملکرد سلول، تحریک تکثیر سلولی و مهاجرت فیبروبلاست می‌شود و درنهایت به بسته شدن زخم کمک می‌کند[۳۱]. بنابراین تابش لیزر کم‌توان بسته‌به دوز انرژی موردمصرف می‌تواند فرآیندهای سلولی را به شیوه‌های مختلف تحت‌تأثیر قرار دهد.

مشاهدات مورفولوژی سلول‌های تیمارشده با بنزن به‌همراه لیزر کم‌توان در غلظت‌های مختلف بنزن یافته‌های به‌دست‌آمده از مطالعهٔ توان زیستی سلولی را تأییدکرد. میزان مرگ‌ومیر سلولی در سلول‌هایی که درمعرض غلظت‌های بالای بنزن و تابش لیزر کم‌توان قرار گرفتند، نسبت‌به سلول‌هایی که درمعرض بنزن و در تاریکی بودند، بیشتر بود. میزان مرگ‌ومیر سلولی در سلول‌هایی با غلظت پایین و تابش لیزر کم‌توان نسبت‌به سلول‌های قرارگرفته در تاریکی (کنترل)، کمتر و اثر مثبت لیزر کم‌توان در جهت حفظ بقاء و مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست انسانی در غلظت‌های پایین بنزن مشاهده‌شد.

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 Benefical 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 infuential 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, DeidovaTN. 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 Departmant 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.