



بررسی زمانی تاثیر نوردرمانی کم توان با نور سبز بر روی سلول های گلیوما

مرضیه اسماعیلی^۱، مهشید جلال کمالی^۲، میثم احمدی^۳، حسین اسکندری^۲ و محمد شجاعی^۲

^۱دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

^۲مؤسسه تحقیقات افضل

^۳مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

گلیوبلاستوما تومور مغزی بسیار مهاجم با امید به بهبود بسیار کم است. از طرفی تاثیر نور کم توان بر روی چرخه و تکثیر سلولی در سلول های مختلف گزارش شده است. در این تحقیق تاثیر نوردرمانی کم توان در طول موج ۵۳۰nm بر حیات سلولی رده سلولی U87 بررسی گردید. در پژوهش پیش رو سلول ها به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از دیود گسیلنده نور و با توان میانگین ۱.۱۲ mW/cm² تحت تابش قرار گرفتند و پس از گذشت زمان های مختلف طی ۲۴ ساعت، به کمک سنجش MTT توانایی حیات سلولی آن ها بررسی شد. نتایج نشان دهنده کاهش وابسته به زمان در فعالیت حیاتی سلول هاست.

کلمات کلیدی: گلیوبلاستوما، نوردرمانی کم توان، رده سلولی U87، فعالیت حیاتی سلولی، نور سبز.

Investigation of Temporal Response of Glioma Cells to Low Level Light Therapy using Green Light

Marzie Esmaeeli¹, Mahshid Jalalkamali², Meysam Ahmadi³, Hossein Eskandari^{2,3}, Mohammad Shojaei²

¹Graduate University of Advanced Technology, Kerman

²Afzal Research Institute

³Neuroscience Research Center, Kerman Medical University

Glioblastoma is an extremely aggressive brain tumor with barely minimal chances of treatment. The effect of low level light on cell cycle and proliferation of different cell lines have already been reported. In the present work, the effect of low level light therapy using light with wavelength of 530nm on the U87 cell line viability is being investigated. In this study, the cells were treated with 15 minutes irradiation from green LEDs with an average power of 1.12mW/cm². The cell viability during a 24 hours period was measured using colorimetric (MTT) assay at different time laps. The results indicate a time dependent decrease in the cells activities.

Keywords: Glioblastoma, Low level light therapy (LLLT), U87 Cell line, Cell viability, Green light.

۱- معرفی

که بهینه نبودن آن‌ها علاوه بر کاهش اثربخشی برهم‌کنش، می‌تواند به نتایج معکوسی نیز منجر شود [5].

مطالعات محدودی به بررسی اثر تابش کم‌توان بر سلول‌های سرطانی، به خصوص سرطان مغز پرداخته‌اند. سروکا (Sroka) و همکارانش مشاهده کردند که تابش نور 805nm باعث اندکی کاهش در نرخ میتوز سلول‌های گلیوبلاستوما (U373MG) می‌شود [9]. موریاما (Murayama) و همکارانش تاثیر نور کم‌توان با استفاده از لیزر دیودی با مشخصات 808nm ، 15mW/cm^2 و به مدت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه را بر روی سلول‌های گلیوبلاستوما انسانی (A172) بررسی کرده و کاهش معنی‌داری در نرخ تکثیر این سلول‌ها مشاهده کردند [10]. در مطالعه‌ای دیگر، این گروه تاثیر نور کم‌توان با طول موج 405nm و توان 27mW را بر همین رده سلولی در زمان ۴۸ ساعت پس از تابش‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه‌ای بررسی کردند و مشاهده کردند که اولاً تابش نور به طور معنی‌داری از تکثیر سلولی ممانعت می‌کند [11] و در ثانی آثار کشنده دو طول موج 808nm و 405nm منشاء متفاوتی دارد. کار دیگر این گروه بررسی تاثیر نوردرمانی کم‌توان با نور لیزر ND:YVO_4 در طول موج 532nm ، با توان 60mW و به مدت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه بر همین رده سلولی بود. در این پژوهش که توانایی حیات و تعداد سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت بررسی شده بود، افزایش معنی‌داری در تکثیر سلولی مشاهده شد [12].

در کار حاضر روند زمانی تاثیرات نور کم‌توان بر رده خاصی از سلول‌های گلیوما، یعنی U87 در ناحیه طول موجی سبز بررسی شده است و نور تابشی حاصل از دیودهای گسیلنده نور مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت حیاتی سلول‌ها در زمان‌های مختلف پس از نوردهی بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

کشت سلولی: سلول‌های گلیوما، رده سلولی U87 خریداری شده از انستیتو پاستور در فلاسک 25cm^2 با محیط کشت کامل (FBS + DMEM) ۱۰٪ کشت داده شد و در محیط با دمای 37°C با ۵٪ CO_2 و رطوبت مناسب انکوبه گردید. برای هر آزمایش $10^3 \times 12$ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه نشاند. هر گروه نوردهی و کنترل (گروهی که تحت تابش نور قرار نگرفته است) شامل چهار چاهک بود.

گلیوبلاستوما شایع‌ترین نوع تومورهای اولیه بدخیم مغزی است که همه کوشش‌ها برای معالجه و درمان آن تقریباً ناموفق بوده است [1]. ساختار پیچیده تومور مغزی و توانایی هجوم سلول‌های توموری به بافت سالم مجاورشان [2] سبب شده حتی با پیشرفت روش‌های جراحی و انجام رادیوتراپی پس از جراحی، عمر این بیماران پس از درمان از یک سال تجاوز نکند [1]. اکثر داروهای شیمی‌درمانی متعارف نیز نمی‌توانند زمان حیات را طولانی‌تر کنند [3]. گلیوماها یک گروه از نئوپلاسم‌های ناهمگن سیستم عصبی مرکزی (CNS) هستند که با توجه به منشاء سلول گلیال خود (استروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های اپن‌دیمال و...) طبقه‌بندی می‌شوند [4].

از سوی دیگر نوردرمانی یکی از قدیمی‌ترین روش‌های درمانی است که برای کاهش درد و تورم، افزایش احیاء و ترمیم بافت و ... کاربرد داشته است. در سال‌های اخیر تحقیق در مورد علل و مکانیزم‌های اثربخشی نور در ناحیه طول موجی مرئی و مادون قرمز مورد توجه قرار گرفته است [5].

نوردرمانی کم‌توان (Low level Light Therapy) که باختصار LLLT نامیده می‌شود، یکی از شاخه‌های فوتوبیولوژی است که برهم‌کنش غیرگرمایی نور (ناحیه مرئی و مادون قرمز نزدیک) با ازگانیسم زنده را بیان می‌کند. ویژگی کم‌توان بیان‌کننده استفاده از نور با انرژی یا چگالی توانی کم (کم‌تر از 100mW)، در مقایسه با دیگر اقسام نوردرمانی مانند نورکندگی، برش و انعقاد گرمایی است [5]. این تابش در سلول‌های مختلف با تحریک متابولیسم ذاتی سلول از طریق فوتوبیومدولاسیون بر چرخه سلولی و تکثیر تاثیرگذار است [6]. در واقع مولکول‌های مشخصی در سیستم‌های زنده قادر به جذب نور و راه‌اندازی مسیرهای سیگنال‌دهی در پاسخ به نور هستند [7]. اما مکانیزم دقیق این برهم‌کنش‌ها، هنوز کاملاً مشخص نشده است [8].

منابع نوری متعارف مورد استفاده در LLLT لیزرها و دیودهای گسیلنده نور (LED) هستند [5]. عوامل مختلفی مانند طول موج، توان و شدت تابش، فواصل بین تابش، پیوسته یا منقطع بودن نوردهی، فاصله زمانی بین تابش و اندازه‌گیری در نتیجه حاصل از برهم‌کنش موثر است [8]. انتخاب بهینه این متغیرها بسیار حائز اهمیت است به طوری

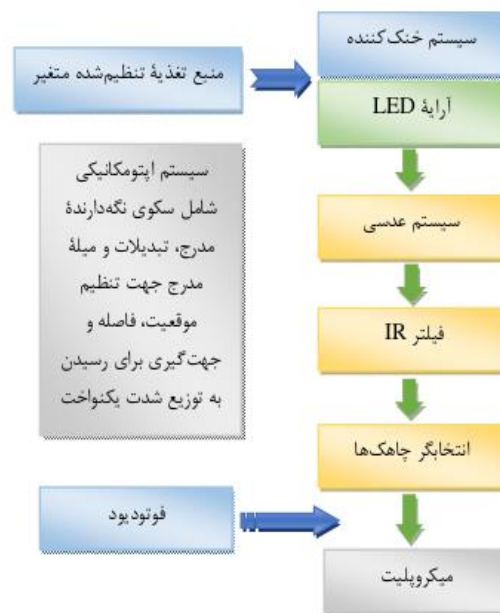
سلول‌ها در نظر گرفته شد.

برای بررسی تاثیر تابش نور بر روند تکثیر و فعالیت حیاتی سلول‌ها، دو روش مختلف به کار گرفته شد تا اثرات ناشی از استرس‌های مربوط به مراحل سنجش سلولی و نیز تاثیر احتمالی فاز سلول در زمان تابش لحاظ شده باشد. در هر روش به طور متوسط بیش از سه بار آزمایش‌ها تکرار شد. در روش اول شش گروه ۴ تایی از سلول‌ها پی‌درپی تحت تابش نور قرار گرفتند و در زمان‌های ۵، ۸، ۱۱، ۱۷، ۲۰ و ۲۴ ساعت پس از نوردهی مورد سنجش MTT قرار گرفتند. هر گروه به همراه شاهد خود در زمانی مجزا نسبت به سایر گروه‌ها سنجیده شد. در روش دوم هشت گروه ۴ تایی با فواصل زمانی مختلف طوری نوردهی شدند که وقتی سنجش MTT همزمان برای آن‌ها انجام می‌شد فاصله زمانی بین نوردهی و سنجش به ترتیب ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ ساعت باشد.

۳- نتایج و نتیجه‌گیری

نمودار درصد حیات سلولی نسبت به گروه کنترل (بصورت خارج قسمت چگالی اپتیکی گروه مورد نظر بر چگالی اپتیکی گروه کنترل) بر حسب زمان انکوباسیون پس از نوردهی با روش اول در شکل ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در اثر تابش نور توانایی حیات سلولی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است، کاهشی که بنظر می‌رسد با گذشت زمان توسط سلول جبران می‌گردد. به گونه‌ای که پس از گذشت ۸ ساعت از نوردهی شاهد بیش‌ترین کاهش در فعالیت میتوکندری (در حدود ۱۲٪) هستیم و پس از آن با گذشت زمان تاثیر نوردهی کم شده و ۲۴ ساعت بعد از نوردهی تقریباً از بین می‌رود.

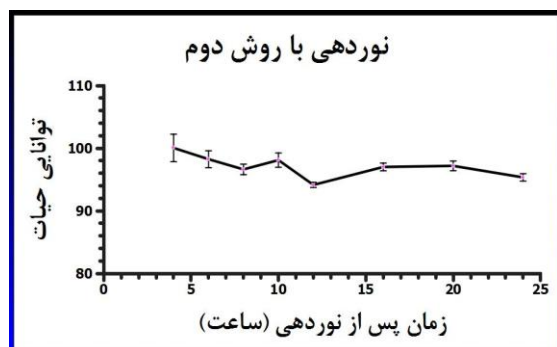
نتایج روش دوم نیز مطابق شکل ۳ کاهش توانایی حیات سلول در گروه‌های نوردهی شده در مقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد، با این تفاوت که بیش‌ترین تاثیر نوردهی به میزانی کمتر (حدود ۶٪) و ۱۲ ساعت پس از آن رخ می‌دهد. نتایج این روش نیز کاهش تاثیر نور با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد.



شکل ۱: طرحواره چیدمان اپتیکی مورد استفاده

نوردهی و چیدمان نوری: به منظور نوردهی عمودی به گروه مشخصی از سلول‌ها، چیدمان نوری از ترکیب قطعات اپتیکی و اپتومکانیکی، مطابق شکل ۱ طراحی و ساخته شد. دیودهای گسیلنده نور توان بالا به عنوان منبع انتخاب گردید. طیف LEDها به کمک طیف سنج اندازه‌گیری شد که قله تابشی آن‌ها ۵۳۰nm بود. برای رسیدن به شدت مناسب و یکنواخت بدون ایجاد گرما، سه LED با لنز ۹۰° بر روی خنک‌کننده نصب شدند. در این سیستم نوردهی عمودی و غیرسینماتیک، منابع در ارتفاع ۹cm از سطح نوردهی قرار گرفتند و سنجش شدت با استفاده از دیود نوری سیلیکونی کالیبره شده انجام شد. متوسط تابش اعمال شده 1.12 mW/cm^2 بود. نوردهی پس از گذشت ۲۴ ساعت از نشانیدن سلول‌ها آغاز و در هر بار نوردهی چهار چاهک به طور همزمان و به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش قرار گرفتند.

سنجش سلولی: توانایی حیات سلولی با استفاده از رنگ‌سنجی کمی MTT در زمان‌های مختلف پس از نوردهی برای گروه‌های نوردهی و کنترل اندازه‌گیری شد. در این سنجش، چگالی اپتیکی محلول بنفش رنگ فرمازان حاصل از شکافت محلول زرد رنگ نمک تترازولیوم (MTT) توسط میتوکندری سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود [13]. در هر آزمایش میانگین چگالی اپتیکی چهار چاهک هر گروه نوردهی و کنترل محاسبه و نسبت آن دو به عنوان فعالیت حیاتی

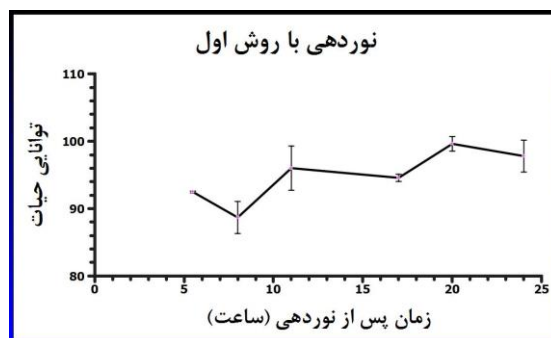


شکل ۳: نمودار درصد حیات سلولی گروه‌های نوردهی شده نسبت به گروه کنترل بر حسب زمان انکوباسیون پس از نوردهی در روش دوم.

با توجه به اهمیت سایر پارامترهای نور نظیر مقدار تابش، طول موج و رژیم نوردهی در اثربخشی نور بر عملکردهای سلولی، تاثیر این کمیت‌ها نیز در حال بررسی است.

مراجع

- [1] J. M. A. Kuijlen *et al.*, "Review: On TRAIL for malignant glioma therapy?," *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 36, no. 3, pp. 168–182, Apr. 2010.
- [2] S. S. Styli and A. H. Kaye, "Photodynamic therapy of cerebral glioma – A review Part II – Clinical studies," *J. Clin. Neurosci.*, vol. 13, no. 7, pp. 709–717, Aug. 2006.
- [3] H. A. Fine *et al.*, "Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults," *Cancer*, vol. 71, no. 8, pp. 2585–2597, Apr. 1993.
- [4] A. C. Silva *et al.*, "Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 591–603, 2011.
- [5] M. R. Hamblin and Y. Huang, *Handbook of Photomedicine*. Taylor & Francis, 2013.
- [6] T. Karu, "Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation," *Lasers Life Sciences*, vol. 2, pp. 53–74, 1988.
- [7] F. Gonzalez-Lima, "Low-level light therapy of the eye and brain," *MyScienceWork*, Oct. 2011.
- [8] S. Passarella and T. Karu, "Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation," *J. Photochem. Photobio. B: Biology*, vol. 140, pp. 344–358, Nov. 2014.
- [9] R. Sroka *et al.*, "Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 25, no. 3, pp. 263–271, 1999.
- [10] H. Murayama *et al.*, "Low-power 808-nm laser irradiation inhibits cell proliferation of a human-derived glioblastoma cell line in vitro," *Lasers Med. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 87–93, Jan. 2012.
- [11] F. Y. Ang *et al.*, "Immunocytochemical studies on the effect of 405-nm low-power laser irradiation on human-derived A-172 glioblastoma cells," *Lasers Med. Sci.*, vol. 27, no. 5, pp. 935–942, Sep. 2012.
- [12] Y. Fukuzaki *et al.*, "Effects of 532 nm Low-power Laser Irradiation on Cell Proliferation of Human-derived Glioblastoma," *Nippon Laser Igakkaishi*, vol. 32, no. 4, pp. 382–388, 2012.
- [13] D. Hughes and H. Mehmet, *Cell Proliferation and Apoptosis*. Garland Science, 2003.



شکل ۲: نمودار درصد حیات سلولی گروه‌های نوردهی شده نسبت به گروه کنترل بر حسب زمان انکوباسیون پس از نوردهی در روش اول.

در توصیف این اختلاف می‌توان بیان کرد که در روش نخست در زمان نوردهی، عمر سلول‌های گروه‌های مختلف یکسان است در حالیکه در روش دوم سلول‌ها ممکن است شرایط و فاز متفاوتی داشته باشند. بنابراین اگرچه هر دو روش روند یکنواختی را نشان می‌دهند اما اختلاف در مقادیر می‌تواند بیانگر اهمیت فاز سلول در زمان تابش باشد. از طرفی در روش اول، با انجام سنجش در دفعات متعدد، احتمال ایجاد استرس برای سلول‌ها در اثر تغییر دما بیشتر است و این موضوع ممکن است در نتایج مداخله ایجاد کند اما در روش دوم این اختلال وجود ندارد. کمتر بودن خطا (که در نمودارها با خطوط خطا مشخص شده‌اند) در آزمایشات روش دوم نسبت به روش اول، می‌تواند این موضوع را تصدیق کند. و همچنین عدم وارد کردن استرس و سهولت فرآیند نوردهی نسبت به فرآیند سنجش (چون سنجش MTT مربوط به نقطه نهایی است بایستی برای هر یک از زمان‌ها گروه مستقل در نظر گرفته شود) به محقق اجازه می‌دهد با استفاده از روش دوم، اثر نور را در زمان‌های بیشتری بررسی کند.

همان‌طور که بیان شد، تاثیرات ناشی از تابش نور کم‌توان به متغیرهای مختلفی وابسته است و این اثرات با تغییر نوع و رده سلولی، طول موج تابش شده، توان و چگالی انرژی و گذشت زمان پس از نوردهی تغییر می‌کند. اگر چه اثر نوردرمانی کم‌توان بر روی این رده سلولی، پیش از این پژوهش انجام نشده است اما اثرات گزارش شده تابش نور سبز بر تکثیر سلولی رده مشابه A172 که قبلاً به آن اشاره شد، وابستگی به متغیرهای مذکور را تایید می‌کند.