

ارزیابی تاثیر تابش لیزر کم توان بر بقا و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های بنیادی فولیکول موی انسانی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۱۱ ویرایش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۰/۰۱/۰۱

زمینه و هدف: امروزه از لیزرهای کم توان برای درمان ریزش مو به دلیل افزایش تکثیر سلولی استفاده می‌شود. سلول‌درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی می‌تواند رویکرد جدیدی در زمینه کاشت مو باشد. در این مطالعه اثر تابش لیزر کم توان بر بقا و همچنین میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن سلول‌های بنیادی فولیکول موی انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: مطالعه آزمایشگاهی، مداخله‌ای و در محیط *In vitro* آزمایشگاه کشت سلولی سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۸ (خرداد ۱۳۹۸ تا بهمن ۱۳۹۸) انجام شد. ابتدا فولیکول مو از ناحیه پس سری (SDA) جدا شد. جداسازی ناحیه بالب هر فولیکول پس از جداسازی واحدهای فولیکولار انجام شد. پس از رشد سلول‌های بنیادی فولیکول مو در فلاسک کشت سلولی، بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی با استفاده از روش فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. میزان بقا و همچنین میزان ROS تحت تابش دوزهای مختلف لیزر کم توان با طول موج ۶۸۵ nm سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج تیمار سلول‌های بنیادی فولیکول مو با دوزهای مختلف لیزر کم توان (صفر تا 20 J/cm^2) نشان داد که لیزر کم توان با دوز پنج J/cm^2 بالاترین میزان بقا را نشان داد. نتایج سنجش میزان ROS تحت تاثیر لیزر کم توان نیز حاکی از افزایش میزان ROS در دوز انرژی پنج J/cm^2 بود.

نتیجه‌گیری: افزایش بقا و تکثیر بیشتر سلول‌های بنیادی فولیکول مو تحت تاثیر لیزر کم توان می‌تواند رویکرد جدیدی را در سلول‌درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی فولیکول مو و همچنین کاشت مو ایجاد کند.

کلمات کلیدی: فولیکول مو، لیزر کم توان، سلول‌های بنیادی، بقا.

مینا سادات نادری^{۱،۲}، سیدمهدی طبایی^{۱*}، محمد حسن سهیلی^۱، مجید پرنور^۳

۱- گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده بار، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۳- گروه پژوهشی ترمیم نوری، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده بار، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، پژوهشکده بار، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، گروه پژوهشی لیزر پزشکی.

تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۰۲۰۲۰
E-mail: smtabaie@yahoo.com

مقدمه

تلاش‌های بسیاری در جهت درمان این مشکل صورت گرفته که در برخی از موارد موفقیت‌هایی نیز دربرداشته است. در برخی مطالعات جهت درمان آلوپسی آندروژنیک (Androgenic alopecia) اثر لیزر کم توان مورد بررسی قرار گرفته است.^{۱،۲} لیزرهای کم توان، لیزرهایی

ریزش مو و طاسی از شایع‌ترین مشکلات جوامع امروزی بوده و اثرات بسیار اقتصادی و روانی برجای می‌گذارد. در سال‌های اخیر

بررسی کرد حاکی از بهبود تکثیر بود. به طوری که تابش نور لیزر با انرژی‌های نیم و یک باعث افزایش تکثیر نسبت به نمونه کنترل شده بود.^{۱۲} همچنین مطالعه‌ای بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی که توسط Naderi انجام شده بود نشان داد که نور لیزر کم‌توان با انرژی پنج J/cm^2 باعث افزایش تکثیر و کاهش زمان دو برابر شدن سلول می‌شود.^{۱۳} تاثیر لیزر کم‌توان بر سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی در سال ۲۰۱۳ نشان دهنده افزایش چشمگیری در مارکرهای سلول‌های بنیادی در اثر مجاورت با نور لیزر بود.^{۱۴}

مقاله‌ای در سال ۲۰۲۰ نشان داد که لیزر درمانی منجر به افزایش بقا و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست می‌شود که این امر بستگی به توان لیزر دارد به طوری که بیشترین تکثیر در گروه یک وات و دو وات بود.^{۱۵}

با توجه به موارد ذکر شده در مورد پاپیلای فولیکول مو و با توجه به اینکه افزایش بقا سلول‌های بنیادی فولیکول مو در کاربردهای مربوط به سلول درمانی و کاشت مو بسیار دارای اهمیت می‌باشد و همچنین اثرات لیزر کم‌توان اطلاعات کمی در دسترس است، بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثر لیزر کم‌توان بر بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی فولیکول موی انسانی و همچنین میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن طراحی گردید.

روش بررسی

ابتدا پس از انتخاب داوطلب مورد نظر توسط متخصص پوست از محل (Safe Donor Area, SDA) که حاوی فولیکول‌های سالم و مقاوم در مردان است، دو نمونه پانچ بیوپسی به ابعاد ۴ mm برداشته شد، سپس به منظور کاهش ریسک اسکار توسط نایلون ۳-۰ بخیه گردید. نمونه بیوپسی اخذ شده با بافر فسفات و الکل ۷۰٪ شستشو داده شد و سپس در فالتون حاوی محیط کشت سلولی قرار داده شد و با سرعت به آزمایشگاه کشت سلولی انتقال داده شد. برای استخراج سلول‌های بنیادی چندان توان فولیکول مو از دو روش مکانیکی و آنزیمی استفاده گردید. 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 (Collagenase

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 زیست‌نوری (Optical biostimulation) می‌گویند.^۱ تحریک زیستی با نور به وسیله لیزرهای کم‌توان دیرزمانی است که در جوامع پزشکی مطرح شده و تاکنون تاثیر لیزر کم‌توان در درمان بسیاری از بیماری‌ها، به ویژه بیماری‌های مربوط به پوست و مو مورد بررسی قرار گرفته است.^۳

مطالعات نشان داده است 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. لیزر کم‌توان می‌تواند باعث افزایش در عملکرد مکانیسم‌های تنفس سلولی، افزایش فسفریلاسیون ADP و تولید ATP، سنتز DNA و RNA، تکثیر سلولی، سنتز کلاژن گردد و همین امر می‌تواند توجیه‌گر افزایش مقاومت سلول‌ها به عوامل آسیب‌رسان باشد.^{۶،۷}

مطالعه پاپیلای فولیکول مو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، از سلول پاپیلای فولیکول مو به عنوان مدل سیستم سلول‌های پاپیلای پوستی اولیه استفاده می‌شود.^۷ سلول‌های پاپیلای پوستی به عنوان سلول‌های بنیادی پرتوان (Multipotent) هستند که قابلیت القای تشکیل فولیکول مو را دارا می‌باشند.^{۱۰،۸} سلول‌های پاپیلای در انتهای فولیکول و در لامینین و کلاژن چهار غنی از ماتریکس خارج سلولی جای گرفته و برای القای 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.^۸ فولیکول مو در پستانداران سیستم ترمیم‌شونده‌ی دینامیک و بی نظیری است که در سرتاسر حیاتش چرخه‌های تکراری متشکل از فاز رشد (Anagen)، فاز پسرفت (Catagen) و فاز استراحت (Telogen) را پشت‌سر می‌گذارند.^{۱۱}

مطالعات مختلفی در مورد اثرات لیزر بر روی سلول‌های بنیادی انجام شده است به طوری که مقاله‌ای در سال ۲۰۱۷ تاثیر نور لیزر کم‌توان را در سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی موشی

چاهک‌های پلیت الایزا منتقل و جذب آن در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از دستگاه (Elisa reader Metertech Inc. M965/965+, version 1.11) با فیلتر رفرانس ۶۲۰ خوانده شد و درصد سلول‌های زنده در هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش میزان ROS: در مرحله اول پس از جداسازی سلول‌ها از فلاسک، با اضافه کردن ۲ ml از محلول PBS در ۱۵۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتیفریوژ و سپس شستشو داده شد. پس از شستشو رسوب سلولی به وسیله PBS به حجم ۴۰۰ µl رسانده شد. به دلیل اینکه رنگ DCFH-DA و PI با یکدیگر همپوشانی دارند، برای تصحیح و تنظیم، نمونه در چهار لوله تقسیم گردید. (یک لوله بدون رنگ، یک لوله حاوی رنگ DCFH-DA، یک لوله حاوی رنگ PI و لوله آخر حاوی هر دو رنگ DCFH-DA و PI) لوله اول که همان سلول بدون رنگ است به همراه لوله سوم در چهار درجه قرار داده شد.

به لوله دوم و چهارم ۵µl DCFH-DA اضافه کرده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوباتور قرار داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون به لوله‌ها ۱ ml از محلول PBS اضافه و در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتیفریوژ شد سپس به رسوب سلولی مجدداً ۵۰۰ µl PBS اضافه گردید. در هنگام خوانش نمونه‌ها، به لوله سوم و چهارم ۳ µl رنگ PI اضافه شد.

یافته‌ها

فولیکول مو پس از کسب رضایت از داوطلب از بافت پوست سر جدا شد. سلول‌ها پس از جداسازی به فلاسک حاوی محیط کشت و آنتی‌بیوتیک منتقل و داخل انکوباتور قرار داده شد. این سلول‌ها شبیه فیبروبلاست در محیط آزمایشگاهی تکثیر و رشد پیدا می‌کنند. شکل ۱ نشان دهنده سلول‌های بنیادی جدا شده است.

در روز اول و بلافاصله بعد از استخراج ناخالصی‌های زیادی همراه با این سلول‌ها بود. بعد از تعویض محیط کشت و حذف سلول‌های شناور، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک قابل مشاهده بود. تصاویر مربوط به سلول‌های بنیادی در روز سوم و همچنین بعد از پاساژ در زیر نشان داده شده است.

(and Dispare) به مدت زمان نیم ساعت و در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید.

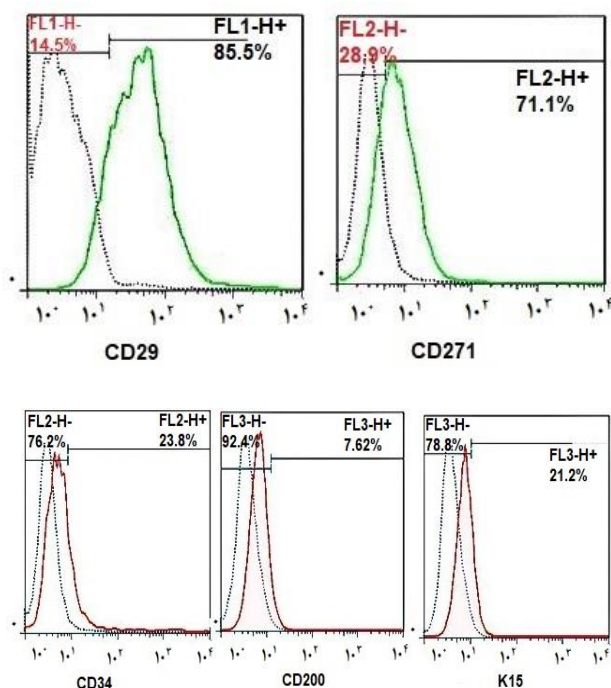
جهت اثبات سلول‌های بنیادی چندتوان، از مارکرهای سطحی استفاده شد که این سنجش از طریق فلوسایتومتری (BD FACS Calibur (BD biosciences, San Jose, CA, USA) انجام شد.^{۱۶} به منظور آماده‌سازی سلول‌های مزانشیمی جهت انجام ایمنوفنوتایپ در مرحله اول پس از جداسازی سلول‌ها از فلاسک، با اضافه کردن ۲ µl از محلول PBS در ۱۵۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتیفریوژ کرده و شستشو داده شد.

پس از شستشو حجم نهایی رسوب سلولی به وسیله PBS به ml ۱ رسانده شد. تعداد ۱۰ لوله فلوسایتومتری انتخاب کرده و به هر کدام ۱۰۰ µl از سوسپانسیون سلولی اضافه شد. به طور جداگانه به لوله‌ها آنتی‌بادی منوکلونال اضافه گردید. پس از مخلوط کردن لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ °C انکوبه می‌کنیم. سپس جهت شستشو ۵۰۰ µl از محلول PBS به لوله‌ها اضافه کرده و در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتیفریوژ شد. به رسوب سلولی ۲۵۰ µl محلول PBS اضافه شد و نمونه در دستگاه فلوسایتومتری خوانش گردید.

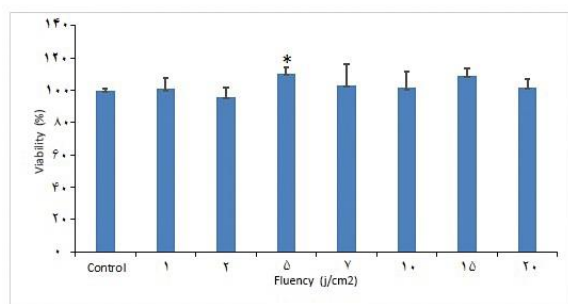
بررسی اثر لیزر بر سلول‌های بنیادی فولیکول مو: جهت بررسی اثر لیزر کم توان، سلول‌های بنیادی کشت داده شده، در معرض لیزر با طول موج ۶۸۵ nm و با انرژی‌های یک تا ۲۰ J/cm² قرار گرفتند.

بررسی تکثیر و بقای سلول‌ها: برای بررسی اثر لیزر کم توان بر روی تکثیر و توان زیستی سلول‌ها از تست Dimethylthiazol-2-yl 2-5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) که یک تست رنگ‌سنجی به شمار می‌آید استفاده شد. براساس اطلاعات به دست آمده از MTT می‌توان میزان تکثیر و بقای سلول‌ها را پیش و پس از تابش لیزر کم توان بررسی کرد. به این ترتیب که بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تابش لیزر کم توان، پلیت سلول‌ها از انکوباتور خارج کرده و میزان یک‌دهم محیط رویی سلول‌ها به هر چاهک محلول MTT اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد.

پس از سپری شدن چهار ساعت، با خارج کردن محیط رویی به چاهک‌ها محلول DMSO اضافه گردید تا کریستال‌های بنفش (فورمازان) (Formazan) ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده‌اند، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. این مایع رنگی به

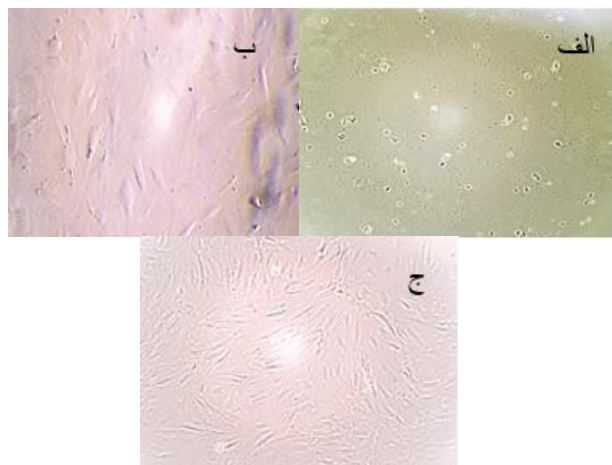


نمودار ۲: بررسی بیومارکهای سطحی سلولهای بنیادی استخراج شده با فلوسایتومتری



نمودار ۳: میزان بقا سلولها بعد از تابش لیزر در دوزهای یک تا 20 J/cm^2 . در دوز پنج بالاترین میزان بقا نسبت به کنترل مشاهده گردید.

دوزهای مختلف یک، پنج و 10 J/cm^2 بررسی شد. نمودار ۴ مقایسه میزان تولید ROS تحت تاثیر دوزهای مختلف لیزر کم توان را نشان می دهد. نتایج حاکی از افزایش چشمگیر میزان تولید ROS تحت تاثیر لیزر کم توان بادوز انرژی 5 J/cm^2 بود.



شکل ۱: تصویر سلولهای بنیادی استخراج شده. الف: در روز اول. ب: در روز سوم. ج: پس از پاساژ.

بررسی بیان مارکهای مولکولی سلولهای بنیادی چندتوان استخراج شده از فولیکول موی انسانی: جهت اثبات سلولهای بنیادی چند توان، از مارکهای سطحی و از طریق فلوسایتومتری انجام شد (نمودار ۲). با توجه به اینکه نتایج فلوسایتومتری و بررسی بیومارکهای سطحی انجام شده در مورد CD34، CD200 و K15 منفی و CD271 و CD29 مثبت بود بنابراین سلولهای بنیادی استخراج شده مربوط به ناحیه Bulb هستند و مرفولوژی شبه فیبروبلاستی نشان داده شده در شکل ۱ حاکی از بنیادی بودن این سلول های استخراج شده است.^{۱۶}

نتایج بررسی تکثیر و بقای سلولها: برای بررسی اثر لیزر کم توان بر روی تکثیر و توان زیستی سلولها از تست MTT که یک تست رنگ سنجی به شمار می آید، استفاده شد. نمودار ۳ میزان تکثیر و بقای سلولها را پیش و پس از تابش لیزر کم توان با دوزهای مختلف از یک تا 20 J/cm^2 نشان می دهد.

با توجه به نمودار مشاهده می شود که میزان بقا سلولها بعد از تابش لیزر افزایش می یابد به طوری که میزان بقا سلولها در دوز پنج J/cm^2 به طور معناداری افزایش یافته است ($P < 0.01$) و به بیشترین حد خود رسیده است. ۳- بررسی میزان ROS سلولی: میزان تولید ROS سلولی در سلولهای بنیادی فولیکول موی انسانی تحت تاثیر لیزر کم توان در

بحث

مقاله ای توسط Ginani نشان داده است که لیزر کم توان در سلول های بنیادی مشتق شده از بافت چربی موشی می تواند منجر به میتوکندری به صورت افزایش سنتز ATP، افزایش گرادیان پروتونی (ΔpH)، تغییر پتانسیل غشای میتوکندری ($\Delta \Psi$) و افزایش میزان ROS می گردد.^۶ بهبود تکثیر شود. به طوری که تابش لیزر با انرژی های نیم و یک J/cm^2 باعث افزایش تکثیر نسبت به نمونه کنترل گردید.^{۱۲} همچنین مطالعه ای بر روی سلول های فیبروبلاست انسانی که توسط Naderi انجام شده بود نشان داد که لیزر کم توان با انرژی $5 J/cm^2$ باعث افزایش تکثیر و کاهش زمان دو برابر شدن سلول می شود.^{۱۳} تاثیر لیزر کم توان بر روی سلول های بنیادی مشتق شده از بافت چربی در سال ۲۰۱۳ نشان دهنده افزایش چشمگیری در مارکهای سلول های بنیادی در اثر مجاورت با نور لیزر بود.

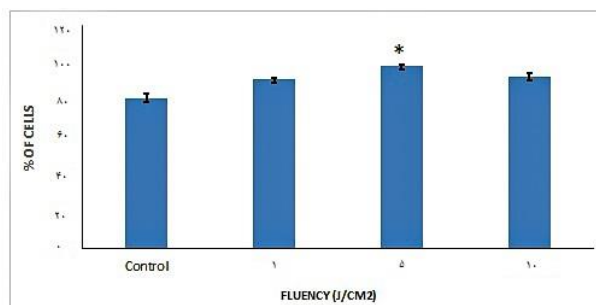
مطالعه ای توسط Kar نشان داد که لیزر درمانی منجر به افزایش القای بقا و تکثیر در سلول های فیبروبلاست می شود که این امر بستگی به توان لیزر دارد به طوری که بیشترین تکثیر در گروه یک وات و دو وات بود.^{۱۵}

مطالعه ای توسط de Villiers در مورد اثر لیزر با طول موج nm ۶۳۹ بر سلول های بنیادی مشتق شده از چربی نشان داد که لیزر منجر به افزایش بقا و تکثیر این سلول ها می شود.^{۱۹} در مطالعه ای دیگری توسط Baharvand در مورد تاثیر لیزر بر روی سلول های بنیادی جنینی انسانی انجام شد. نتیجه نشان دهنده تاثیرات وابسته به دوز لیزر بر روی ویژگی های مورفولوژی و قابلیت تمایزی بود که داده های این مطالعه می تواند کمک موثری در مورد درمان سلولی بعد از پیوند باشد.^{۲۰} همچنین مطالعه دیگری در مورد تاثیرات لیزر کم توان بر تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت مغز استخوان و چربی نشان دهنده رفتار وابسته به دوز بود به طوری که رشد و تکثیر بیشتر مشاهده شده با انرژی های $1 J/cm^2$ مرتبط بود. تحریک زیست نوری سلول های بنیادی مزانشیمی توسط لیزر می تواند ابزاری مهم برای مهندسی بافت و پزشکی بازساختی باشد.^{۲۱}

به طور کلی از سلول های بنیادی فولیکول مو به عنوان مدل سیستم سلول های پاپیلای پوستی اولیه استفاده می شود.^{۱۴} تا زمانی که 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.

امروزه، استخراج، کشت، تکثیر و تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت های مختلف به ویژه بافت چربی و فولیکول مو یکی از موضوعات جالب توجه در زمینه تحقیقات پزشکی و سلول درمانی است.^{۱۷} این مسئله باعث گردیده است که محققان نگاه ویژه ای در ارتباط با به کارگیری این سلول ها در فرآیند درمان بیماری های خاص داشته باشند. سلول درمانی با استفاده از سلول های بنیادی فولیکول موی پوستی می تواند رویکرد جدیدی را در زمینه کاشت مو ایجاد کند. قابل توجه است که سلول های پاپیلای پوستی، سلول های بنیادی پرتوان هستند که می توانند منجر به القای تشکیل فولیکول مو شوند.^{۱۸}

ریزش مو و طاسی از شایع ترین مشکلات جوامع امروزی بوده و اثرات بسیار اقتصادی و روانی برجای می گذارد.^{۲۱} در سال های اخیر تلاش های بسیاری جهت درمان این مشکل صورت گرفته که در برخی از موارد موفقیت هایی نیز دربر داشته است. در برخی مطالعات جهت درمان آلوپسی آندروژنیک اثر لیزر کم توان مورد بررسی قرار گرفته است. تابش لیزر کم توان می تواند باعث تحریک سلول و افزایش تکثیر سلولی در برخی سلول ها گردد به طوری که لیزر کم توان می تواند منجر به افزایش تکثیر سلولی گردد.^۳ مطالعات مختلف نشان داده است که تحریک زیست نوری با استفاده از منابع نوری لیزرهای کم توان در طول موج های قرمز و مادون قرمز موجب افزایش فعالیت



نمودار ۴: میزان ROS سلولی در حالت کنترل و تیمار لیزر یک، پنج و $10 J/cm^2$

نتایج به دست آمده از این مطالعه می تواند گامی موثر در جهت بهبود روش های سلول درمانی محسوب شود. با آگاهی از مکانیسم سلولی و مولکولی تاثیر لیزر کم توان می توان به روش بهتر درمانی به ویژه در کاشت مو و رویش فولیکول مو دست یافت. تدوین پروتکل های درمانی آینده بر مبنای استفاده از لیزرهای کم توان به گونه ای که نیاز به تکرار استفاده از تابش را کم کند یکی از چالش های امروز در درماتولوژی است. با توجه به کاربرد بالینی لیزرهای کم توان در زمینه درماتولوژی برای اندیکاسیون های مختلف شناخت مکانیسم اثر و تغییر شرایط سلول های موجود در بافت پوست اعم از سلول های بنیادی فولیکول مو می تواند نویدبخش تدوین پروتکل های درمانی جدید یا به کار بردن لیزر به عنوان یک درمان مکمل در بیماری های پوست باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان بررسی اثر لیزر کم توان بر ویژگی های Stemnes و تکثیر سلول های بنیادی فولیکول موی انسانی مصوب جهاد دانشگاهی در سال ۱۳۹۶ به کد ۳۰۱۵ می باشد که با حمایت سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی اجرا شده است.

لیزر کم توان برای کاربردهای بسیاری در پزشکی از جمله ترمیم زخم و همچنین درمان ریزش مو استفاده می شود.

در این پژوهش ابتدا سلول های بنیادی فولیکول موی انسانی استخراج شد و پس از تایید بنیادی بودن این سلول ها، اثر لیزر کم توان در دوزهای مختلف انرژی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از افزایش بقا این سلول ها در معرض لیزر با برخی از دوزها بود به طوری که در دوز 5 J/cm^2 افزایش معناداری را نشان می داد. نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعات پیشین که حاکی از افزایش بقا و تکثیر سلولی بود مطابقت داشت.

در مطالعه ای که مربوط به تاثیر لیزر کم توان در میزان ROS سلولی در رده سلولی فیبروبلاست انسانی بود نشان داده شد که لیزر کم توان تاثیر افزایشی بر تولید ROS سلولی دارد و افزایش میزان ROS سلولی می تواند سیگنال های سلولی مختلفی را فعال کند.^{۱۶،۱۷} در این پژوهش سنجش ROS نیز تحت تاثیر لیزر کم توان انجام گرفت که با نتایج حاصل از بررسی بقا سلول مطابقت داشت، به طوری که سلول های بنیادی تحت تابش لیزر 5 J/cm^2 بیشترین میزان ROS را از خود نشان داده بودند.

References

- van Gemert MJ, Welch A. Clinical use of laser-tissue interactions. *IEEE Eng Med Biol Mag* 1989;8(4):10-3.
- ORASAN M, Bolf P, Coneac A, Mitrea D, Moldovan R, Mihu C, et al. stimulation of hair regrowth using low level laser treatment in a rat model of alopecia. *Dig J Nanomater Biostruct* 2013;8(4): 1571-80.
- Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health phys* 1989;56(5):691-704.
- Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 1999;49(1):1-17.
- Baxter G, Bell A, Allen J, Ravey J. Low level laser therapy: Current clinical practice in Northern Ireland. *Physiotherapy* 1991;77(3):171-8.
- Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Therapy* 2005;23(1):3-9.
- Chase HB. Growth of the hair. *Physiol Rev* 1954;34(1):113-26.
- Yoo B-Y, Shin Y-H, Yoon H-H, Seo Y-K, Park J-K. Hair follicular cell/organ culture in tissue engineering and regenerative medicine. *Biochem Eng J* 2010;48(3):323-31.
- Stenn K, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 2001;81(1):450-81.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol* 2009;19(3):R132-R42.
- Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 2006;126(7):1459-68.
- Ginani F, Soares DM, Rocha HAdO, Barboza CAG. Low-level laser irradiation promotes proliferation of cryopreserved adipose-derived stem cells. *Einstein (Sao Paulo)* 2017;15(3):334-8.
- Naderi MS, Razzaghi M, Djavid GE, 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.
- Shen C-C, Yang Y-C, Chiao M-T, Chan S-C, Liu B-S. Low-level laser stimulation on adipose-tissue-derived stem cell treatments for focal cerebral ischemia in rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013.
- Kara N, Selamet H, Benkli YA, Beldüz M, Gökmenoğlu C, Kara C. Laser Therapy Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Fibroblast Cells. *Wounds* 2020;32(3):69-73.
- Inoue K, Aoi N, Sato T, Yamauchi Y, Suga H, Eto H, et al. Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells. *Lab Invest* 2009;89(8):844-56.
- Sohelifar MH, Javeri A, Amini H, Taha MF. Generation of dopamine-secreting cells from human adipose tissue-derived stem cells in vitro. *Rejuvenation Res* 2018;21(4):360-8.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol* 2009;19(3):R132-R42.
- de Villiers JA, Houeild 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.
- Baharvand H, Soleimani M, Gourabi H. The Effect Of Low Level Laser Irradiation On Human Embryonic Stem Cells. *Cell J (Yakhteh)* 2005;7(2):56-125.
- Barboza CA, Ginani F, Soares DM, Henriques AC, Freitas Rde A. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein (Sao Paulo)* 2014;12(1):75-81.

Evaluation of the effect of low-level laser irradiation on viability and ROS production in human hair follicle stem cells

Mina Sadat Naderi Ph.D.^{1,2}
Seyed Mehdi Tabaie M.D.^{1*}
Mohammad Hasan Soheilifar Ph.D.¹
Majid Pornour Ph.D.³

1- Department of Medical Laser,
Medical Laser Research Center,
Yara Institute, ACECR, Tehran, Iran.

2- Department of Biophysics, Faculty
of Biological Sciences, Islamic Azad
University, Tehran North Branch,
Tehran, Iran.

3- Department of Photo Healing and
Regeneration, Medical Laser
Research Center, Yara Institute,
ACECR, Tehran, Iran.

Abstract

Received: 1 Sep. 2020 Revised: 8 Sep. 2020 Accepted: 13 Mar. 2021 Available online: 21 Mar. 2021

Background: Low-level lasers are used for various medical applications including wound healing and hair loss treatment. Cell Therapy using skin stem cells could be a novel approach to hair transplantation. However, there is no study on the effect of low-level laser on the hair follicle stem cells. So, in this study, we investigated the effect of low level laser irradiation on viability and ROS production in the hair follicle stem cells.

Methods: This study was performed in the cell culture laboratory of Medical Laser Research Center, Yara Institute in 2020 (June 2020 to February 2020). The hair follicle was isolated from the Safe Donor Area (SDA) using the 4mm punch method. In the laboratory, after separating the follicular units, the bulb region of each follicle was isolated via mechanical and enzymatic methods and cultured in FBS+F12-DMEM. Afterward, the stem cells were characterized via flow cytometry. The effect of low-level laser (685 nm) with different doses (1-20 J/cm²) was investigated on cell proliferation, viability and ROS production.

Results: The stem cells were confirmed via flow cytometry and also morphological tests. The results indicated that the viability of the stem cells under laser irradiation was different. comparison of the cell viability before and after laser irradiation showed that the highest viability was related to 5 J/cm² dose energy of laser irradiation. However, the viability of the cells in most dose energy of laser irradiation increased compared with the control group. Moreover, ROS production had a significant increase on 5 J/cm² energy density of laser irradiation. We can be achieved better treatment in hair transplantation and hair follicle growth by knowing the effect of low-level laser irradiation on the viability of the hair follicle stem cells.

Conclusion: The result of this study could be useful in cell therapy and hair transplantation due to the improvement of cell viability and increase in ROS production under the influence of laser irradiation.

Keywords: hair follicle, low level laser, stem cells, viability.

* Corresponding author: Department of
Medical Laser, Medical Laser Research
Center, Yara Institute, ACECR, Tehran,
Iran.
Tel: +98-21-66402020
E-mail: smtabaie@yahoo.com