

***Effect of low – level helium-neon laser irradiation on the release of Interleukin 6 and basic fibroblast growth factor from cultured human fibroblasts in high glucose medium***

***Esmaeelinejad M., Bayat M., Ph.D.\*, Dadpay M., M.D.***

*\*P.O.Box: 198571-7443, Cell and Molecular Biology Research Centret, Medical Faculty of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: Oct 2011

Accepted: Dec 2011

***Abstract***

**Purpose:** Low level laser therapy is suggested as a new therapeutic method in diabetic wound healing. This survey aimed to evaluate the effects of low level laser on human fibroblasts cultured in high glucose cultures.

**Materials and Methods:** The human skin fibroblasts were cultured under standard condition. The cells were cultured in high glucose culture medium (15mM/L) for a week and two weeks before laser irradiation. The irradiation was carried out with Helium-Neon (He-Ne) laser unit on the case groups. Control cells did not receive laser. The cells were irradiated with three doses of 0.5, 1 and 2 J/cm<sup>2</sup> on three consecutive days. The releasing rates of Interleukin 6 and Fibroblast growth factor were evaluated by ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay). Data were analyzed by student t test or Mann-Whitney-U test.

**Results:** All three doses of 0.5 (p=0.049), 1 J/cm<sup>2</sup> (p=0.027) had a stimulatory effect on releasing rate of IL-6 of the fibroblasts cultured in culture medium with high glucose concentration in comparison with hyper glycemc non irradiated cells. Low level laser therapy (LLLT) with energy density of 2 J/cm<sup>2</sup> induced the release of bFGF of the fibroblasts cultured in culture medium with high glucose concentration for one and two weeks (p=0.047 and p=0.04 respectively).

**Conclusion:** This study showed that LLLT has stimulatory effects on the release of Interleukin 6 and basic fibroblast growth factor from cultured human fibroblasts in high glucose medium in one week and two-week tests.

**Key words:** Basic fibroblast growth factor, Human skin fibroblasts, Interleukin 6, Low level laser therapy

## اثر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر میزان آزادسازی فاکتورهای رشد IL-6 و bFGF فیبروبلاست‌های انسانی کشت داده شده در محیط کشت محتوی غلظت زیاد گلوکز

محمد اسمعیلی نژاد\*، محمد بیات Ph.D.\*\*، معصومه دادبی M.D.\*\*\*

\* دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\*\* مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\*\*\* گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: دی ماه ۹۰

### چکیده

**هدف:** بررسی اثر تابش لیزر کم توان بر میزان آزادسازی فاکتورهای رشد از فیبروبلاست‌های انسانی کشت داده شده در محیط کشت محتوی غلظت زیاد گلوکز

**مواد و روش‌ها:** فیبروبلاست‌های پوست انسانی تحت شرایط استاندارد کشت داده شدند تا به تراکم مناسب برسند. سپس سلول‌ها به مدت یک و دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز (۱۵ میلی مولار بر لیتر) تیمار شدند. لیزر کم توان هلیوم-نئون بر چاهک‌های گروه تجربی تابانده شد، در حالی که گروه شاهد لیزر دریافت نکردند. سلول‌ها با سه دوز ۰/۵، ۱ و ۲ ژول بر سانتی متر مربع طی سه روز متوالی تحت تابش قرار گرفتند. میزان آزادسازی فاکتورهای اینترلوکین ۶ و فاکتور رشد فیبروبلاست بازی به وسیله آزمون الایزا ارزیابی شدند. توزیع داده‌های زیر گروه‌های شاهد و تجربی هر گروه با Student t test یا Mann-Whitney-U آزمون شد.

**یافته‌ها:** تابش با هر یک از دوزهای ۰/۵ ( $p=0.049$ ) و ۱ ژول بر سانتی متر مربع ( $p=0.027$ ) باعث افزایش آزادسازی فاکتور اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست‌هایی شد که به مدت یک هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده بودند. تابش لیزر با دوز ۲ ژول بر سانتی متر مربع ۱ باعث افزایش معنی داری در میزان آزادسازی فاکتور bFGF از فیبروبلاست‌های انسانی شد که هم به مدت یک هفته ( $p=0.047$ ) و هم دو هفته ( $p=0.04$ ) در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده بودند.

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که تابش لیزر کم توان هلیوم-نئون می تواند بر آزادسازی فاکتورهای رشد از فیبروبلاست‌هایی که درون محیط با غلظت طبیعی گلوکز و فیبروبلاست‌هایی که در دو آزمایش مجزا به مدت یک و دو هفته درون محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده بودند در چگالی انرژی‌های پایین اثر تحریکی مثبت داشته باشد.

**کلید واژه‌ها:** درمان با لیزر کم توان، فیبروبلاست‌های انسانی، اینترلوکین ۶، فاکتور رشد فیبروبلاست بازی

### مقدمه

[۲]، تنظیم سیستم ایمنی [۳] و کاهش التهاب [۴] مطرح شده است. مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است

استفاده از لیزر کم توان چندین سال است که به عنوان یک روش درمانی جدید و مؤثر در ترمیم زخم‌ها [۱]، کاهش درد

تهران، ولنجک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات

بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی صندوق پستی: ۱۹۸۵۷۱-۷۴۴۳

Email: mohbayat@sbmu.ac.ir

نشان داده‌اند که لیزر کم توان باعث افزایش توان تکثیری فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها در محیط کشت [۵-۷] و افزایش تولید کلاژن در این محیط‌ها می‌شود [۶]. اهمیت این موضوع زمانی بارزتر شد که نتایج بررسی‌ها نشان دادند زمان ترمیم زخم در بیماران دیابتی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [۸ و ۹]. شیوع دیابت شیرین در سراسر جهان رو به افزایش است و عوارض ناشی از آن به یک بحث جدی و مهم برای سلامت عمومی تبدیل شده است [۱۰ و ۱۱].

یکی از تأثیرات سوء دیابت که در اثر غلظت بالای گلوکز خون ایجاد می‌شود تغییر میزان بیان و آزادسازی فاکتورهای رشد متعددی از جمله اینترلوکین-۶ (IL-6) و فاکتور رشد فیبروبلاست بازی (bFGF) از سلول‌های پوستی است [۱۲ و ۱۳]. دو فاکتور رشدی IL-6 و bFGF در روند التهابی و ترمیم زخم‌ها نقش مهمی بر عهده دارد [۱۴]. غلظت بالای گلوکز خون با تأثیر بر سلول‌های پوستی از جمله فیبروبلاست‌ها روند آزادسازی این فاکتورها را کاهش داده و موجب تأخیر در روند ترمیم زخم می‌شود [۱۵].

یکی از مدل‌های رایج تحقیقاتی در خصوص بررسی عوارض دیابت روی پوست، مطالعه اثر محیط کشت محتوی گلوکز با غلظت بالا بر سلول‌های مختلف پوست است. در این تحقیقات همچنین اثر عوامل مختلف به منظور کاهش عوارض سوء دیابت در این شرایط بر سلول‌های مورد مطالعه بررسی شده است [۱۶-۱۸]. در مطالعات محدودی اثر لیزر کم توان هلیوم-نئون بر روند آزادسازی فاکتورهای التهابی در محیط کشت با غلظت بالای گلوکز بررسی شده است. در این باره می‌توان به تحقیقات هارولد و آبراهام (Hourel and Abrahame) [۱۹-۲۲] اشاره نمود. در تحقیقات Hourel and Abrahame فیبروبلاست‌هایی که در اثر چندین بار جابه‌جایی در پیپت به‌طور مصنوعی زخمی شده بودند، فقط در مرحله

پاساژ به منظور رسیدن به تعداد مورد نظر درون محیط کشت حاوی گلوکز با غلظت ۲۲/۶ میلی‌مول بر لیتر نگهداری شدند. آن‌ها در نتایج تحقیقاتشان اعلام کردند که تابش لیزر هلیوم نئون به‌وسیله دوز ۱۶ ژول بر سانتی‌متر مربع در مقایسه با تابش با دوز ژول بر سانتی‌متر مربع ۵ باعث بیان IL-6 کمتر و مهار التیام زخم درون محیط کشت [۲۱] و کاهش بیان bFGF [۲۲] شد. این در حالی است که در این تحقیقات سلول‌های فیبروبلاست حداکثر ۲۴ ساعت در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده بودند. در عین حال در این مطالعه از فیبروبلاست‌های سالم انسانی تازه استخراج شده (primary culture) و برای تابش از beam expander استفاده شد تا همه مساحت هر چاهک پرتو لیزر را با شرایط نوری یکسان دریافت کند و بنابراین دقت آزمایش‌ها افزایش پیدا کند.

هدف تحقیق حاضر بررسی اثر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون با دوزهای ۰/۵، ۱ و ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع بر فیبروبلاست‌های انسانی سالم است که ابتدا درون محیط کشت با غلظت طبیعی گلوکز به تراکم مناسب رسیده، سپس به مدت یک یا دو هفته درون محیط کشت محتوی غلظت بالای گلوکز نگهداری شده‌اند [۲۳]. روش ارزیابی این تحقیق بررسی میزان آزادسازی فاکتورهای رشدی IL-6 و bFGF از طریق آزمون الایزا در نظر گرفته شد.

## مواد و روش‌ها

### نحوه کشت سلول

سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول‌ها از پوست یک زن سالم ۳۰ ساله سفید پوست و از نژاد قفقازی تهیه شده بودند (ردۀ HSF-PI 18، کد C194) همه روش‌های به‌کاررفته در تحقیق حاضر مورد تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه متبوع قرار گرفته است. سلول‌ها در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت سلول کشت

دستگاه لنزهای محدب الطرفین (biconvex) به قطر ۷/۵ میلی متر، فاصله کانونی ۶/۵ میلی متر و شیشه BKD است. در این حالت توان خروجی دستگاه برابر با ۱/۵ میلی وات بود. تابش لیزر با سه چگالی انرژی ۰/۵ (به مدت ۷۵۷ ثانیه)، ۱ (به مدت ۱۵۱۲ ثانیه) و ۲ ژول بر سانتی متر مربع (به مدت ۳۰۲۴ ثانیه) صورت گرفت. به منظور یکسان سازی شرایط محیطی که طی بیرون بودن سلول های تحت تابش از انکوباتور اتفاق می افتد، سلول های گروه شاهد در همان شرایط خارج از انکوباتور نگهداری شدند بدون آنکه تحت تابش لیزر قرار بگیرند. تابش لیزر یک روز پس از پاساژ سلول ها، طی سه روز متوالی و هربار یک مرتبه (در کل سه تابش) انجام شد. در مجموع چهار گروه تحت تابش لیزر قرار گرفتند:

۱- سلول های فیروبلاست که در محیط کشت با غلظت طبیعی گلوکز (۵/۵ میلی مول بر لیتر) کشت داده شده بودند و گروهی از این سلول ها که لیزر دریافت نکردند شاهد محسوب شدند.

۲- سلول های فیروبلاست که به مدت یک هفته در محیط کشت با غلظت بالای گلوکز (۱۵ میلی مول بر لیتر) کشت داده شده بودند ولی طی تابش در محیط با غلظت طبیعی قرار داشتند و گروهی از این سلول ها که لیزر دریافت نکردند شاهد محسوب شدند.

۳- سلول های فیروبلاست که به مدت یک هفته در محیط کشت با غلظت بالای گلوکز (۱۵ میلی مول بر لیتر) کشت داده شده بودند و طی تابش نیز در محیط با غلظت بالای گلوکز قرار داشتند و گروهی از این سلول ها که لیزر دریافت نکردند شاهد محسوب شدند.

۴- سلول های فیروبلاست که به مدت دو هفته در محیط کشت با غلظت بالای گلوکز (۱۵ میلی مول بر لیتر) کشت داده شده بودند ولی طی تابش در محیط با غلظت طبیعی قرار داشتند و گروهی از این سلول ها که لیزر دریافت نکردند شاهد محسوب شدند.

هدف از قرار ندادن سلول ها در محیط با غلظت بالای

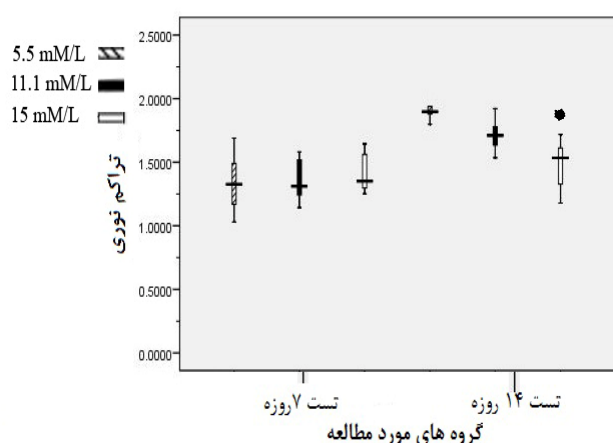
داده شدند. برای کشت سلول ها از محیط کشت DMEM (Gibco, Dulbecco's modified Eagle's medium) دارای ۱/۱۶ گرم بر لیتر L-گلوتامین و تقویت شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین استفاده شد. فلاسک های کشت سلول در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، فشار ۵ CO<sub>2</sub> درصد و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند. پس از آن که سلول ها به تراکم مناسب رسیدند از آن ها ساب کالچر تهیه شد. سلول ها پس از شمارش روی لام نئوبار و انجام آزمون حیات با تریپان بلو ۰/۰۴ درصد به چاهک های پلیت ۲۴ خانه ای انتقال داده شدند. تعداد سلول های هر چاهک ۵۰۰۰۰ سلول بود. ۶ چاهک در گروه شاهد و ۶ چاهک در گروه تجربی قرار گرفت [۲۴]. آزمایش برای هر گروه یک مرتبه انجام شد.

برای تعیین غلظت گلوکز و زمان مناسب برای تغییرات سلولی، سلول ها در دو نوبت یک هفته و دو هفته و در سه غلظت ۵/۵ میلی مولار بر لیتر، ۱۱/۱ میلی مولار بر لیتر (۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر) و ۱۵ میلی مولار بر لیتر (۲۷۰ میلی گرم بر دسی لیتر) کشت داده شدند و سپس برای ارزیابی میزان آزادسازی فاکتور IL-6 تحت آزمون الایزا قرار گرفتند. برای دیابتی نمودن فیروبلاست ها، سلول ها به مدت یک و دو هفته در محیط کشت با غلظت معادل ۲۷۰ میلی گرم بر دسی لیتر (۱۵ میلی مولار بر لیتر) D-Glucose نگهداری شدند. محیط کشت سلول ها هر سه روز یک بار تعویض شد. سلول های مورد بررسی در محیط کشت با غلظت گلوکز بالا مربوط به پاساژهای ۳ تا ۹ قرار داشتند.

## نحوه تابش لیزر

تابش لیزر با مولد لیزر هلیم-نئون IR-2000 ساخت سازمان انرژی اتمی ایران با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر، قطر خروجی ۲ میلی متر و توان خروجی ۱۰ میلی وات صورت گرفت. قطر لیزر پرتو خروجی با استفاده از دستگاه Beam Expander به قطر ۱۷ میلی متر در فاصله ۱۵ سانتی متری از چاهک افزایش یافت. این

سلولی سلول‌ها در دو نوبت یک هفته و دو هفته و در سه غلظت ۵/۵ میلی‌مولار بر لیتر، ۱۱/۱ میلی‌مولار بر لیتر (۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و ۱۵ میلی‌مولار بر لیتر (۲۷۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) کشت داده و سپس برای ارزیابی میزان آزادسازی فاکتور IL-6 تحت آزمون الایزا قرار گرفتند (شکل ۱). نتایج نشان داد که بیشترین میزان آزادسازی فاکتور رشد در غلظت ۵/۵ میلی‌مول بر لیتر طی دو هفته بود که نسبت به سایر غلظت‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ).



شکل ۱. میزان آزادسازی اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست‌های انسانی کشت داده شده در محیط با غلظت‌های مختلف گلوکز در بازه‌های زمانی ۷ و ۱۴ روزه \* نسبت به دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

نتایج حاصل از آزمون الایزا برای ارزیابی میزان آزادسازی فاکتور bFGF از فیبروبلاست‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. بر این اساس تابش لیزر با دوز ۱ ژول بر سانتی‌متر مربع پس از سه روز باعث افزایش معنی‌داری در میزان آزادسازی فاکتور bFGF از فیبروبلاست‌های انسانی می‌شود که هم به مدت یک هفته ( $p = 0.047$ ) و هم به مدت دو هفته ( $p = 0.04$ ) در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده باشند.

نتایج حاصل از آزمون الایزا برای ارزیابی میزان آزادسازی فاکتور IL-6 از فیبروبلاست‌ها در جدول‌های ۲ تا ۵ نشان داده شده است.

گلوکز طی تابش در گروه دو و چهار، بازسازی شرایط آزمایشگاهی مشابه بیماران دیابتی است که قند خون آن‌ها تحت کنترل قرار گرفته است، در حالی که گروه سه مشابه بیماران دیابتی کنترل نشده است.

## روش انجام آزمون الایزا

مایع رویی چاهک‌ها (supernatant) پس از سه روز تابش در روز چهارم جمع‌آوری و طبق دستورالعمل شرکت U-Cytech biosciences, Utrecht, Netherland تحت آزمون الایزا برای ارزیابی میزان آزادسازی فاکتور اینترلوکین ۶ و طبق دستورالعمل شرکت (RayBiotech, GA, USA) تحت آزمون الایزا برای ارزیابی میزان آزادسازی فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی (bFGF) از فیبروبلاست‌ها قرار گرفتند. نمونه‌ها شامل گروه شاهد و مورد برای تابش ۰/۵ ژول بر سانتی‌متر مربع مطالعه پایلوت، ۱ ژول بر سانتی‌متر مربع مطالعه یک هفته دیابتی و ۱ ژول بر سانتی‌متر مربع مطالعه دو هفته دیابتی بودند. این چگالی انرژی‌های انتخاب شده دوزهای بودند که در مطالعه قبلی ثابت شده بود بیشترین اثر را بر تکثیر فیبروبلاست‌های دیابتی شده دارند [۲۴].

## تحلیل آماری

توزیع طبیعی داده‌های مربوط به مطالعه‌های الایزا آزمون شد. در نمونه‌های با توزیع طبیعی داده‌های زیر گروه‌های شاهد و تجربی هر گروه با Student t test آزمون و کل داده‌ها با ANOVA با هم مقایسه شدند. در نمونه‌های بدون توزیع طبیعی داده‌های زیر گروه‌های هر گروه با Mann-Whitney-U test آزمون شدند. P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

## یافته‌ها

ابتدا برای تعیین غلظت گلوکز و زمان مناسب برای تغییرات

**جدول ۱.** میزان آزادسازی فاکتور bFGF انسانی از فیبروبلاست‌های سالم پوست انسان که طی سه روز تحت تابش لیزر قرار گرفتند

| توضیحات                                                                           | توان خروجی دستگاه (وات) | زمان (ثانیه) | انرژی کل (ژول) | چگالی انرژی (ژول بر سانتی‌متر مربع) | bFGF (pg/ml) | گروه شاهد | گروه مورد |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| فیبروبلاست‌های سالم                                                               | ۱/۵                     | ۷۵۷          | ۱/۱۳۵          | ۰/۵                                 | ۴۷۵۷/۷۶      | ۴۷۲۴/۶۴   | ۴۷۵۷/۷۶   |
| فیبروبلاست‌های انسانی که به مدت یک هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شدند | ۱/۵                     | ۱۵۱۲         | ۲/۲۷           | *۱                                  | ۳۵۷۶/۴۸      | ۱۶۱۶/۸۸   | ۳۵۷۶/۴۸   |
| فیبروبلاست‌های انسانی که به مدت دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شدند | ۱/۵                     | ۱۵۱۲         | ۲/۲۷           | *۱                                  | ۴۸۲۶/۷۶      | ۲۸۴۲/۳۲   | ۴۸۲۶/۷۶   |

\* نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ).

**جدول ۲.** میزان آزادسازی فاکتور IL-6 انسانی از فیبروبلاست‌های سالم پوست انسان که طی سه روز تحت تابش لیزر قرار گرفتند

| توان خروجی دستگاه (وات) | زمان (ثانیه) | انرژی کل (ژول) | چگالی انرژی (ژول بر سانتی‌متر مربع) | IL-6 (پیکو گرم بر میلی‌لیتر) | گروه شاهد | گروه مورد |
|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| ۱/۵                     | ۷۵۷          | ۱/۱۳۵          | ۰/۵                                 | ۵۹/۰۴                        | ۶۲/۵۶     | ۶۲/۵۶     |
| ۱/۵                     | ۱۵۱۲         | ۲/۲۷           | ۱                                   | ۷۲/۲۶                        | ۷۸/۹۳     | ۷۸/۹۳     |
| ۱/۵                     | ۳۰۲۴         | ۴/۵۴           | *۲                                  | ۷۹/۵۸                        | ۸۳/۳      | ۸۳/۳      |

\* نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ).

**جدول ۳.** میزان آزادسازی فاکتور IL-6 انسانی از فیبروبلاست‌های پوست انسان که به مدت یک هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز قرار گرفته و سپس ضمن نگهداری در محیط با غلظت طبیعی گلوکز طی سه روز تحت تابش لیزر قرار گرفتند.

| توان خروجی دستگاه (وات) | زمان (ثانیه) | انرژی کل (ژول) | چگالی انرژی (ژول بر سانتی‌متر مربع) | IL-6 (پیکو گرم بر میلی‌لیتر) | گروه شاهد | گروه مورد |
|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| ۱/۵                     | ۷۵۷          | ۱/۱۳۵          | *۰/۵                                | ۶۸/۱۲                        | ۸۱/۴۲     | ۸۱/۴۲     |
| ۱/۵                     | ۱۵۱۲         | ۲/۲۷           | *۱                                  | ۴۰/۹۸                        | ۶۱/۰۹     | ۶۱/۰۹     |
| ۱/۵                     | ۳۰۲۴         | ۴/۵۴           | ۲                                   | ۳۸/۱۷                        | ۴۹/۴      | ۴۹/۴      |

\* نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ).

**جدول ۴.** میزان آزادسازی فاکتور IL-6 انسانی از فیبروبلاست‌های پوست انسان که به مدت یک هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز قرار گرفته و سپس ضمن نگهداری در محیط با غلظت بالای گلوکز طی سه روز تحت تابش لیزر قرار گرفتند.

| توان خروجی دستگاه (وات) | زمان (ثانیه) | انرژی کل (ژول) | چگالی انرژی (ژول بر سانتی‌متر مربع) | IL-6 (پیکو گرم بر میلی‌لیتر) | گروه شاهد | گروه مورد |
|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| ۱/۵                     | ۷۵۷          | ۱/۱۳۵          | ۰/۵                                 | ۷۰/۲۶                        | ۵۵/۱۷     | ۵۵/۱۷     |
| ۱/۵                     | ۱۵۱۲         | ۲/۲۷           | ۱                                   | ۷۱/۹۵                        | ۶۶/۸۹     | ۶۶/۸۹     |
| ۱/۵                     | ۳۰۲۴         | ۴/۵۴           | *۲                                  | ۱۸/۱۴                        | ۷۵/۲۴     | ۷۵/۲۴     |

\* نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ).

**جدول ۵.** میزان آزادسازی فاکتور IL-6 انسانی از فیبروبلاست‌های پوست انسان که به مدت دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز قرار گرفته و سپس ضمن نگهداری در محیط با غلظت طبیعی گلوکز طی سه روز تحت تابش لیزر قرار گرفتند.

| توان خروجی دستگاه (وات) | زمان (ثانیه) | انرژی کل (ژول) | چگالی انرژی (ژول بر سانتی‌متر مربع) | IL-6 (پیکو گرم بر میلی‌لیتر) | گروه شاهد | گروه مورد |
|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| ۱/۵                     | ۷۵۷          | ۱/۱۳۵          | ۰/۵                                 | ۴۲/۳۷                        | ۵۰/۷۷     | ۵۰/۷۷     |
| ۱/۵                     | ۱۵۱۲         | ۲/۲۷           | ۱                                   | ۳۹/۷۱                        | ۳۹/۸۹     | ۳۹/۸۹     |
| ۱/۵                     | ۳۰۲۴         | ۴/۵۴           | *۲                                  | ۷۰/۱۲                        | ۱۸۵/۲۲    | ۱۸۵/۲۲    |

\* نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ).

نانومتر و توان ۰/۲ میلی وات بر سانتی مترمربع به مدت ۵، ۸۰ و ۱۸۰ ثانیه روی آزادسازی اینترلوکین ۶ از ماکروفاژها و لنفوسیت های موش های سالم بررسی شد. این مطالعه نشان داد که تابش لیزر در زمان های کمتر و در نتیجه انرژی دانسیته های پایین تر اثر تحریکی مثبت داشته در حالی که با افزایش زمان تابش میزان آزادسازی این فاکتور التهابی کاهش و سیستم ایمنی سرکوب شد [۲۵].

در ادامه مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر غلظت بالای گلوکز روی فیبروبلاست ها و یافتن غلظت مناسب برای مرحله بعدی بررسی سلول ها به مدت یک و دو هفته در دو محیط با غلظت بالای گلوکز (۲۰۰ و ۲۷۰ میلی گرم بر دسی لیتر) کشت داده شدند. نتایج حاصل نشان داد که حضور مقادیر بالای گلوکز به مدت دو هفته باعث آسیب و کاهش فعالیت آزادسازی فاکتور التهابی اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست های پوست انسان می شود. بررسی حاضر نشان داد که غلظت بالای گلوکز به مدت دو هفته باعث کاهش توان آزادسازی اینترلوکین ۶ شده و این کاهش در غلظت ۱۵ میلی مول بر لیتر نسبت به غلظت طبیعی (۵/۵ میلی مولار بر لیتر) معنی دار بود. در حقیقت تأثیر مقدار زیاد گلوکز بر کاهش فعالیت فیبروبلاست ها یکی از علل تأخیر در ترمیم زخم در بیماران دیابتی است [۹] که در این بررسی به طور آزمایشگاهی (in vitro) این کاهش مشاهده شد.

در قسمت دوم این بررسی فیبروبلاست ها ابتدا به مدت یک و دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز (۱۵ میلی مولار بر لیتر) نگهداری شده و سپس تحت تابش لیزر کم توان قرار گرفتند. سلول ها به مدت سه روز و هر بار یک مرتبه تحت تابش قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمون الایزا نشان داد که تابش لیزر با انرژی دانسیته های ۰/۵ و ۱ ژول بر سانتی متر مربع در گروه دو مطالعه که سلول ها پس از یک هفته کشت در محیط با غلظت بالای گلوکز طی تابش لیزر در محیط با غلظت طبیعی قرار داشتند، موجب افزایش معنی دار آزادسازی

این مطالعه نشان داد که تابش لیزر کم توان با چگالی انرژی ۲ ژول بر سانتی متر مربع به مدت سه روز به طور معنی داری موجب افزایش آزادسازی فاکتور اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست های می شود که در محیط با غلظت طبیعی گلوکز کشت داده شده بودند ( $p=0.01$ ). در بررسی گروه دوم که سلول ها یک هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده بودند، تابش لیزر با چگالی انرژی های ۰/۵ ( $p=0.049$ ) و ۱ ژول بر سانتی متر مربع ( $p=0.027$ ) به مدت سه روز به طور معنی داری باعث افزایش آزادسازی فاکتور اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست های گروه مورد نسبت به گروه شاهد شده بود. در گروه سوم که سلول ها پس از یک هفته کشت در محیط با غلظت بالای گلوکز طی تابش نیز در محیط با غلظت بالای گلوکز قرار داشتند و همچنین در گروه چهارم که سلول ها به مدت دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده بودند، تابش لیزر با چگالی انرژی ۲ ژول بر سانتی متر مربع به مدت سه روز به طور معنی داری موجب افزایش آزادسازی فاکتور اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست ها نسبت به گروه شاهد شده بود (به ترتیب  $p=0.004$  و  $p=0.00$ ).

## بحث

در ابتدای اجرای این مطالعه به منظور انجام یک بررسی مقدماتی (pilot study) سلول ها پس از کشت در محیط با غلظت طبیعی گلوکز به منظور ارزیابی میزان آزادسازی فاکتور اینترلوکین ۶ تحت آزمون الایزا قرار گرفتند. اینترلوکین ۶ یک فاکتور التهابی محسوب شده و حضور آن در التیام زخم بسیار موثر است [۱۴]. این مطالعه نشان داد که تابش لیزر کم توان با هر سه انرژی دانسیته ۰/۵، ۱ و ۲ ژول بر سانتی متر مربع باعث افزایش میزان آزادسازی این فاکتور التهابی می شود اما این افزایش تنها در انرژی دانسیته ۲ ژول بر سانتی متر مربع نسبت به گروه شاهد معنی دار بود. در مطالعه ای که توسط نووسلووا (Novoselova) و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد اثر لیزر هلیوم نئون با طول موج ۶۳۲/۸

بررسی کردند [۳۱]. این مطالعه نشان داد که تابش لیزر کم‌توان هلیوم نئون با دوز ۴ ژول بر سانتی‌متر مربع باعث افزایش توان تکثیری سلول‌های فیبروبلاست می‌شود.

پرابهو (Prabhu) و همکاران اثر لیزر کم‌توان هلیوم نئون را با دوزهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۸ ژول بر سانتی‌متر مربع را بر ترمیم زخم ایجاد شده روی موش بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که تمامی این دوزها باعث افزایش سرعت در ترمیم زخم می‌شود اما دوز ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع بیشترین اثر را در انقباض زخم دارد [۳۳]. این نتایج [۵ و ۳۲] و نتایج حاصل از این مطالعه مشخص می‌کند که چگالی انرژی لیزر تابشی نسبت به نوع لیزر مورد استفاده اثر بیشتری در تحریک یا مهار فعالیت‌های زیستی سلول‌ها دارد. اما دوز تابشی مورد استفاده که بیشترین تأثیر مثبت را داشته باشد همچنان یک مطلب مورد بحث در این زمینه است. بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری با شرایط مشابه روی سلول‌های دیابتی به‌منظور تعیین دوز تابشی مناسب صورت پذیرد.

این مطالعه نشان داد که تابش لیزر کم‌توان با دوز ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع می‌تواند بر میزان آزادسازی اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست‌های سالم و فیبروبلاست‌هایی که به مدت یک یا دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز (۱۵ میلی‌مولار بر لیتر) کشت داده شده بودند، اثر تحریکی مثبت داشته باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که دوز ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع ممکن است یک انرژی دانسیته ایده‌آل برای تحریک ترمیم زخم دیابتی باشد. در عین حال تابش لیزر با دوز ۱ ژول بر سانتی‌متر مربع باعث افزایش معنی‌داری در میزان آزادسازی فاکتور bFGF از فیبروبلاست‌های انسانی می‌شود که به مدت یک یا دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده باشند.

## تقدیر و تشکر

از حوزه محترم معاونت پژوهشی دانشگاه متبوع که بودجه این تحقیق را تأمین کردند، سپاسگزاری می‌شود.

اینترلوکین ۶ نسبت به گروه شاهد شد. در گروه سه و چهار مطالعه این افزایش معنی‌دار با تابش لیزر با دوز ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع دیده شد. در مطالعه‌ای که هورلد و آبراهامز (Hourelld and Abrahamse) در سال ۲۰۰۷ روی فیبروبلاست‌های دیابتی انجام دادند، اثر لیزر کم‌توان هلیوم نئون را روی بیان اینترلوکین ۶ بررسی کردند. این بررسی نشان داد که تابش لیزر با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و انرژی دانسیته ۱۶ ژول بر سانتی‌متر مربع نسبت به انرژی دانسیته ۵ ژول بر سانتی‌متر مربع باعث کاهش معنی‌دار در بیان این فاکتور التهابی می‌شود [۲۱]. مطالعات دیگر نشان داد که تابش لیزر با انرژی دانسیته ۵ ژول بر سانتی‌متر مربع باعث افزایش پایدار آزادسازی اینترلوکین ۶ از فیبروبلاست‌های دیابتی می‌شود [۲۶].

در مطالعه حاضر تابش لیزر با انرژی دانسیته ۱ ژول بر سانتی‌متر مربع در فیبروبلاست‌هایی که یک یا دو هفته در محیط با غلظت بالای گلوکز کشت داده شده بودند، باعث افزایش معنی‌داری در آزادسازی bFGF نسبت به گروه شاهد شد. مطالعات متعددی نشان داده‌است که تابش لیزر کم‌توان با انرژی دانسیته‌های پایین موجب افزایش آزادسازی این فاکتور رشدی می‌شود [۲۹-۲۷]. مطالعه سایگان (Saygun) و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که تابش لیزر با انرژی دانسیته ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع روی فیبروبلاست‌های لته انسان موجب افزایش معنی‌داری در آزادسازی bFGF از این سلول‌ها می‌شود [۲۹].

در حالی که این بررسی و سایر مطالعات [۵ و ۳۰] بیان می‌کند که تابش لیزر کم‌توان با چگالی انرژی‌های کمتر برای ایجاد تغییرات زیستی مناسب‌تر همچون افزایش توان تکثیری سلول‌ها بهتر است، اما تحقیقات دیگری وجود دارد که نتایج متفاوتی را گزارش کرده‌اند [۳۱-۳۳]. میرزایی (Mirzaei) و همکاران اثر لیزر کم‌توان را روی فیبروبلاست‌های استخراج شده از موش‌های دیابتی شده به‌وسیله استرپتوزوتوسین



## References

1. **Schindl A, Schindl M, Schon H, Knobler R, Havelec L, Schindl L.** Low intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* 1998; 21: 580-4.
2. **Eckerdal A, Bastian H.** Can low reactive level laser therapy be used in the treatment of neurogenic facial pain? A double blind placebo controlled investigation of patients with trigeminal neuralgia. *Laser Ther* 1996; 8: 247-52.
3. **Ohshiro T, Fujino T.** Laser applications in plastic and reconstructive surgery. *Keio J Med* 1993; 42:191-5.
4. **Freitas AC, Pinheiro A, Miranda P, Thiers FA, Vieira AL.** Assesment of antiinflammatory effects of 830 nm laser light using C-reactive protein levels. *Braz Dent J* 2001; 12:187-90.
5. **Grossman N, schneid N, Reuveni H, Holery S, Lubart R.** 780 nm low – power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte culture: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med* 1998; 22: 212-8.
6. **Almeida – lopez L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli – Neto J, Jaeger MMM.** Comparison of low – level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001; 29: 179-84.
7. **Hawkin DH, Abrahamse H.** The role of laser fluence a in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium – neon laser irradiation. *Lasers Surg Med* 2006; 36: 74-83.
8. **Goodson WHd , Hunt TK.** Wound healing and the diabetic patient. *Surg Gynerol Obstet* 1979; 19: 600-8.
9. **Greenhalgh DG.** Wound healing and the diabetes mellitus. *Clin Plast Surg* 2003; 30: 37- 45.
10. **Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F, Silink M.** Type 2 diabetes in the young:the evolving epidemic: the International diabetes federation consensus workshop. *Diabetes Care* 2004; 27: 1798-811.
11. **De Fronzo Ra, Bonadonna RC, Ferrannini E.** Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15: 318-68.
12. **Ogata S, Yorioka N, Kohno N.** Glucose and prednisolone alter basic fibroblast growth factor expression in peritoneal mesothelial cells and fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 2787-96.
13. **Solini A, Santini E, Madec S, Cuccato S, Ferrannini E.** Effects of endothelin-1 on fibroblasts from type 2 diabetic patients: Possible role in wound healing and tissue repair.*Growth Factors* 2007;25: 392-9.
14. **Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M.** Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 585-601.
15. **Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R.** PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol* 1990; 136:1235-46.
16. **Benazzoug Y, Borchellini C, Labat – Robert J, Robert L, Kern P.** Effect of high- glucose concentration on the expression collagens ans fibronectin by fibroblasts in culture. *Exp Gerontol* 1998; 33: 445- 55.
17. **Yevdokimova NY.** High glucose – induced alterations of extracellular matrix of human skin fibroblasts are not dependenton TSP-1 – TGF  $\beta$  1 pathway. *J Diabetes Complications* 2003; 17: 355-64.
18. **Deveci M, Gilmont RR, Dunham WR, Mudge BP, Smith DJ, Marcelo CL.** Glutathione enhances fibroblast collagen concentration and protects keratinocytes from apoptosis in

- hyperglycaemic culture. *Bi J Dermatol* 2005; 152: 217-24.
19. **Hourelid NN, Abrahamse H.** In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm<sup>2</sup>. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 78-84.
  20. **Hourelid NN, Abrahamse H.** Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabetic-wounded fibroblast cells. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 474-81.
  21. **Hourelid N, Abrahamse H.** Irradiation with a 632.8 nm helium-neon laser with 5 J/cm2 stimulates proliferation and expression of interleukin-6 in diabetic wounded fibroblast cells. *Diabetes Technol Ther* 2007; 9: 451-9.
  22. **Hourelid NN, Abrahamse H.** Laser light influence cellular viability and proliferation in diabetic – wounded fibroblast cells in a dose – and wavelength dependent manner lasers. *Med Sci* 2008; 23: 11-18.
  23. **Hawkins D, Abrahamse H.** Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2005; 23: 251-9.
  24. **Esmacelinejad M, Bayat M, Darbandi H, Mosaffa N.** Effect of low – level helium - neon laser irradiation on proliferation rate of cultured human fibroblasts in high glucose medium. *J Ir Anat Sci* 2011; 9: 13-24.(Persian)
  25. **Novoselova EG, Cherenkov DA, Glushkova OV, Novoselova TV, Chudnovskii VM, Iusupov VI, et al.** Effect of low-intensity laser radiation (632.8 nm) on immune cells isolated from mice. *Biofizika*. 2006;51:509-18.
  26. **Evans DH, Abrahamse H.** Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008; 24(4):199-210.
  27. **Hawkins D, Abrahamse H.** Influence of broad-spectrum and infrared light in combination with laser irradiation on the proliferation of wounded skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2007; 25:159-69.
  28. **Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM.** Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2009; 24:885-91.
  29. **Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B.** Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2008; 23: 211-5.
  30. **Hu WP, Wang JJ, Yu CL, Lan CC, ChenGS, Yu HS.** Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2048-57.
  31. **Mirzaei M, Bayat M, Mosafa N, Mohsenifar Z, Piryaei A, Farokhi B, et al.** Effect of low – level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocine – diabetic rats. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 519-25.
  31. **do Nascimento RX, Callera F.** Low-level laser therapy at different energy densities (0.1-2.0 J/cm2) and its effects on the capacity of human long-term cryopreserved peripheral blood progenitor cells for the growth of colony-forming units. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 601-4.
  32. **Prabhu V, Rao SB, Rao NB, Aithal KB, Kumar P, Mahato KK.** Development and evaluation of fiber optic probe-based helium-neon low-level laser therapy system for tissue regeneration: an in vivo experimental study. *Photochem Photobiol* 2010; 86: 1364-72.