

# بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی بافت کلاژن قبل و بعد از تابش لیزر اگزایمر فرابینفس آرگون-فلوراید در خط ۱۹۳ نانومتر

## خلاصه

**مقدمه:** تابش لیزر اگزایمر ArF با توجه به دور تابش منجر به ایجاد دو فرآیند اتصال عرضی و تخریب نوری رشته‌های کلاژن در بافت خواهد شد. برای مشاهده و تخمین تغییرات پس از تابش لیزر از آزمون کششی استاتیک و طیف سنجی فروسرخ بهره گرفته شد.

**روش بررسی:** نمونه‌های تهیه شده از کپسول کلیوی گوسفند، توسط لیزر اگزایمر با طول موج ۱۹۳ نانومتر تابش شده است. در آزمون کششی استاتیک، پارامترهایی چون مدول یانگ برای تخمین اثر تابش محاسبه شده‌اند. از آزمون مقدار P ( $P < 0.01$ ) و t دانشجویی برای بررسی اهمیت آماری داده‌های تجربی استفاده گردید. آزمون طیفسنجی FTIR نیز جهت

مشاهده تغییرات ایجاد شده در ساختار شیمیایی و مولکولی بافت به کار رفته است.

**یافته‌ها و نتیجه‌گیری:** کاهش مدول یانگ تا زمان پرتودهی ۱۰ ثانیه نشان دهنده این است که فاکتور جذب نور فرابینفس در باندهای پیتیدی منجر به انقطاع‌های جزئی در کلاژن و کاهش سفتی بافت می‌شود. در حالی که از زمان پرتودهی ۳۰ تا ۳۰ ثانیه پدیده جذب در اسیدهای آروماتیک غالب می‌باشد و سفتی بافت را افزایش می‌دهد. با افزایش دوز تابش، گستالت پیوندها در بیشتر باندهای پیتیدی سفتی بافت را کاهش می‌دهد و شکسته شدن باندهای پیتیدی نیز منجر به کاهش فرکانس باند آمید II می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** کلاژن، لیزر اگزایمر آرگون فلوراید، مدول، طیفسنجی مادون قرمز

سوسن مختاری<sup>۱</sup>

شقایق بقاپور<sup>۱</sup>

پرویز پروین<sup>۲</sup>

احمد امجدی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد فیزیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر  
استاد فیزیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر  
<sup>۲</sup> دانشیار فیزیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی شریف

نویسنده مستول: پرویز پروین، تهران، خیابان انقلاب، بین خیابان حافظ و ولی‌صر<sup>(۴)</sup>. خیابان سعید، کوچه نانی، بلاک ۱۰، طبقه اول، تلفن: ۰۶۴۹۲۴۴۹۰۶۶۶۶، پست الکترونیک: parvin@aut.ac.ir

## مقدمه

بافت کپسول کلیوی گوسفند (به دلیل وجود درصد بالای کلاژن نوع اول (۷۶ درصد) [۱] استفاده شده است. از سوی دیگر برای مشاهده تغییرات پس از تابش لیزر از آزمون کششی استاتیک و طیفسنجی مادون قرمز بهره گیری شده است.

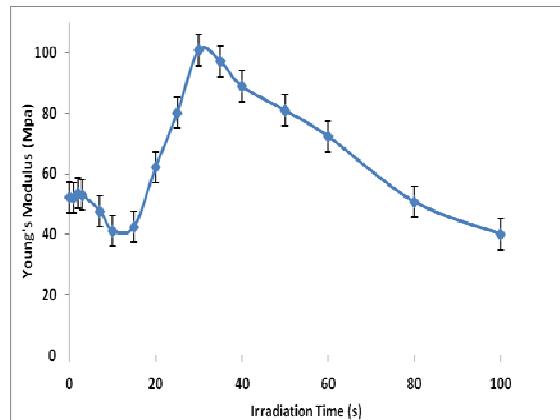
## روش بررسی

کلیه‌های گوسفند تهیه شده از کشتارگاه تهران در جعبهٔ عایق مناسب حاوی یخ خشک و سرم فیزیولوژیکی در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد تا به محل آزمایش منتقال یابد. همه نمونه‌ها در طول ۴۸ ساعت پس از کشتار، آزمایش شدند. با استفاده از تیغ میکروتوم به شماره ۴ به طور همزمان نمونه‌های مستطیل شکل و با ابعاد ۸ و ۲۵ میلی‌متر از یک سمت کلیه برش داده شد (شکل ۱). ضخامت کپسول کلیوی در سه مکان مختلف اندازه‌گیری گردید و میانگین آن حدود ۰.۰۵ میلی‌متر به دست آمد و برای برداشتن نمونه‌ها از روی بافت اصلی از کاغذ مرنبوی استفاده شد. این عمل به انتقال نمونه‌ها کمک کرده و از چروکیدگی آن جلوگیری می‌کند. نمونه‌ها به مدت ۱۲

بافت‌های بیولوژیکی به‌طور عمده جاذب نور فرابینفس دور هستند و کلاژن‌ها به عنوان عمدۀ‌ترین پروتئین ساختاری ماتریکس برون سلولی بافت‌های همبند، نور فرابینفس را در طول موج ۱۹۳ نانومتر جذب می‌کنند. دو کروموفور اصلی موجود در کلاژن‌ها در این طول موج، زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه آروماتیک و باندهای پیتیدی بین اسیدهای آمینه می‌باشد [۱]. ایجاد اتصالات عرضی و تخریب نوری رشته‌های کلاژن به ترتیب از طریق اتصالات کووالانسی اسیدهای آروماتیک و شکست باندهای پیتیدی صورت می‌گیرد [۲-۶].

ضریب جذب اسیدهای آروماتیک در رشته‌های کلاژن در طول موج ۱۹۳ نانومتر از یک مرتبهٔ بزرگی نسبت به مقدار ضریب جذب باندهای پیتیدی برخوردار است. جذب فوتون UV در اسیدهای آروماتیک متناظر با هر آمینواسید روى می‌دهد، در حالی که در هر ماکرومولکول کلاژن تعداد بسیار زیادی پیوند پیتیدی وجود دارد [۹-۷]. درنتیجه با توجه به دوز تابش، دو فرآیند اتصال عرضی و تخریب نوری در رشته‌های کلاژن با هم رقابت خواهند کرد. در این مقاله جهت بررسی اثر لیزر اگزایمر آرگون فلوراید در کمتر از آستانهٔ کندگی از

در آزمون کششی استاتیک، روند منحنی‌ها به گونه‌ای است که تا زمان ۱۰ ثانیه به دلیل شکسته شدن برخی باندها، شیب و نیروی قله نمودارهای تنش-کرنش کاهش یابد درحالی که با بالا رفتن زمان تابش تا ۳۰ ثانیه این پارامترها افزایش می‌یابند. شیب تا حدیّ خطی، نمودار تنش-کرنش، مدول یانگ یا سفتی بافت را می‌دهد. سفتی بافت در زمان تابش ۳۰ ثانیه بیشینه است و با افزایش دوز تابش کاهش می‌یابد (شکل ۲). روند منحنی قدرت کششی نهایی که از تقسیم تنش بر کرنش در نقطه شکست به دست می‌آید، بر حسب زمان تابش همانند روند مدول یانگ بر حسب زمان تابش می‌باشد.



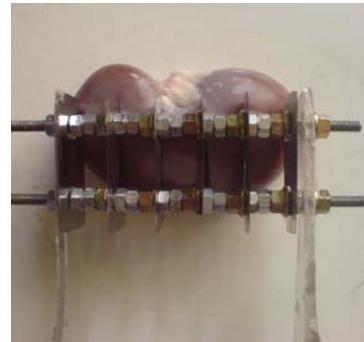
شکل ۲: تغییرات مدول یانگ در زمان‌های متفاوت تابش لیزر اگزایمر ۱۹۳ نانومتر با نرخ تکرار ۱ هرتز و طول پالس ۱۰ nsec و انرژی تپ ۵۰mj/pulse

در طیف فروسرخ بافت کپسول کلیوی، باندهای آمید یافت شده عبارت‌اند از: باندهای آمید A، B، I و II که عدد موج آن‌ها به ترتیب در حدود  $1635\text{ cm}^{-1}$ ،  $3072\text{ cm}^{-1}$ ،  $3284\text{ cm}^{-1}$  و  $1541\text{ cm}^{-1}$  قرار دارد [۱۲]. شکل ۳ طیف مادون قرمز بافت کپسول کلیوی را قبل از تابش لیزر اگزایمر نشان می‌دهد. عدد موج باندهای آمید A، B و I که به ترتیب به کشیدگی پیوندهای C-H، N-H و C=O مربوط است، عددتاً در اثر تابش، تغییر چشمگیری نداشته است [۱۳-۱۶]. درحالی که عدد موج باند آمید II (خمیدگی باند C-N) [۱۳-۱۶] تا زمان ۳۵ ثانیه جایه‌جایی اندکی داشت و از این زمان به بعد جایه‌جایی آن افزایش یافت (شکل ۴).

## بحث و نتیجه‌گیری

عمده انرژی فرودی یک تپ لیزر فراینفش توسط کلاژن بافت جذب می‌گردد. کلاژن‌ها پلیمرهای بیولوژیکی هستند که از چندین زیر واحد آمینواسید (گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین) که توسط باندهای پیتیدی به هم متصل می‌باشند، تشکیل شده‌اند (شکل ۵).

ساعت در معرض هوا و دمای اتاق قرار داده شد تا رطوبت آن کاملاً تبخیر شود و سپس در حالت خشک تحت تابش لیزر قرار گیرد.

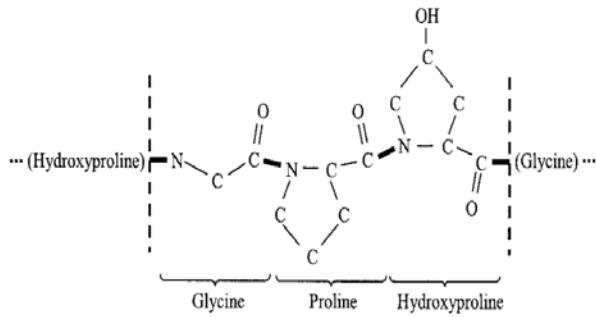


شکل ۱: برش نمونه‌ها توسط دستهٔ تیغ طراحی شده

تابش توسط لیزر اگزایمر ArF با مشخصات طول پالس ۱۰ nsec، طول موج ۱۹۳ نانومتر، انرژی ۵۰mj/pulse، شار  $0.02\text{ J/cm}^2$  و نرخ تکرار ۱Hz صورت گرفته است. نمونه‌ها در فاصلهٔ ۳۷ سانتی‌متر از لیزر قرار گرفتند و زمان‌های پرتودهی شامل ۱، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ ثانیه بود. برای انجام آزمون کششی استاتیک، نمونه‌ها پس از پرتودهی در داخل دستگاه SANTAM STM-20 تابش لیزر اگزایمر با مشخصات طول پالس ۱۰ nsec، طول موج ۱۹۳ نانومتر، انرژی ۵۰mj/pulse، شار  $0.02\text{ J/cm}^2$  و نرخ تکرار ۱Hz صورت گرفته است. نمونه‌ها در فاصلهٔ ۳۷ سانتی‌متر از لیزر قرار گرفتند و زمان‌های پرتودهی شامل ۱، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ ثانیه بود. برای انجام آزمون کششی استاتیک، نمونه‌ها پس از پرتودهی در داخل دستگاه SANTAM STM-20 قرار گرفتند و با سرعت ثابت ۱ میلی‌متر بر دقیقه و تا مرز پارگی کشیده شدند. داده‌های نیرو (نیوتون)- جابجایی (میلی‌متر) به وسیلهٔ دستگاه ثبت شد و با توجه به اندازه‌گیری‌های طول، عرض و ضخامت نمونه‌ها نمودارهای تنش-کرنش آن‌ها رسم گردید. مدول یانگ نیز از روی شیب نمودارهای تنش-کرنش به دست آمد. از آزمون مقدار P ( $P < 0.01$ )، برای بررسی اهمیت آماری داده‌های تجربی استفاده گردید. نتایج خوانده شده تجربی به شکل نقاط پراکنده حول منحنی رگرسیون قرار می‌گیرند. روش آماری جهت تعیین اهمیت آماری داده‌ها به روش آسالیز رگرسیون دو جمعیت از طریق آزمون t داشجویی و دودامنه می‌باشد. معنی دار بودن خطوط و نقاط تجربی نسبت به یکدیگر تابعی از میزان پراکنده‌ی نقاط حول خط رگرسیون و به معنای دیگر میزان انحراف معیار حول میانگین می‌باشد. علاوه بر آزمون فیزیکی کششی استاتیک برای تشخیص اثر تابش نور لیزر اگزایمر از آزمون شیمیایی FTIR نیز استفاده نموده‌ایم. در این آزمون عبور نور مادون قرمز از بافت کپسول کلیوی در ناحیهٔ طیفی ۴۵۰-۵۰۰ cm<sup>-1</sup> باعث برانگیزش ارتعاشی باندهای ویژه می‌شود. پرتودهی نمونه‌ها توسط لیزر اگزایمر ArF تغییراتی را در موقعیت این باندهای آمید و شدت جذب آن‌ها ایجاد خواهد کرد [۱۱]. با بررسی این تغییرات می‌توان به بررسی اثر تابش و یافتن زمان‌های تحریب نوری بافت پرداخت.

## یافته‌های

آروماتیک است [۷]. درنتیجه در طول تابش، دو پدیده جذب اسیدهای آромاتیک و باندهای پپتیدی باهم رقابت می‌کنند. تعیین دقیق پارامترهای لیزر می‌تواند منجر به اتصال عرضی یا تخریب نوری و کندگی شود.

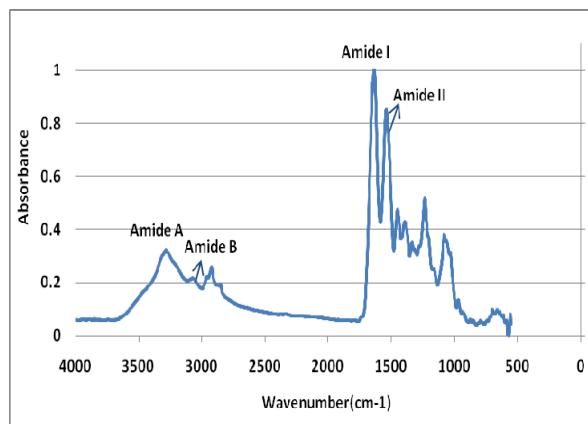


شکل ۵: فرمول کلاژن

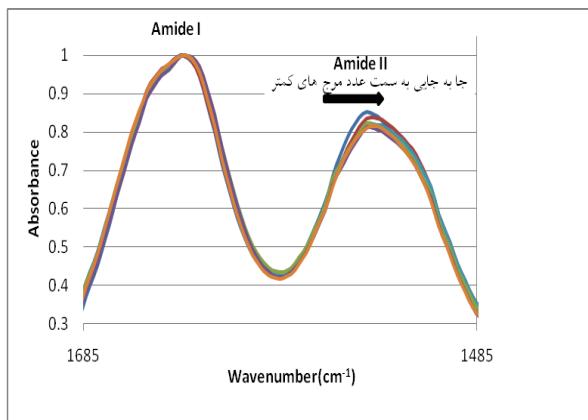
سه اسید آمینه اصلی کلاژن شامل پرولین، گلیسین و هیدروکسی پرولین می‌باشد و باندهای پپتیدی C-N بین اسیدهای آمینه برقرار است [۱۷].

همان طور که مشاهده کردیم در آزمون کششی استاتیک در زمان ۱۰ ثانیه اول پرتودهی، جذب باندهای پپتیدی از اسیدهای آروماتیک سبقت می‌گیرد که موجب انقطاع‌های جزئی در آن و کاهش سفتی ماده می‌شود. با افزایش زمان تابش به ۳۰ ثانیه، فرآیند جذب اسیدهای آروماتیک بر باندهای پپتیدی غلبه می‌یابد و موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد در اسیدهای آمینه می‌گردد که نهایتاً منجر به ایجاد اتصالات عرضی می‌شود. با افزایش دوز تابش، احتمال ایجاد آسیب‌های فوتoshیمیایی افزایش می‌یابد و گستالت پیوندها در بیشتر باندهای پپتیدی باعث می‌شود که سفتی بافت کاهش یابد.

آزمون طیفسنجی فروسرخ نیز تأییدکننده آزمون فیزیکی است. به گونه‌ای که جابه‌جایی طیفی باند آمید II در ۳۰ ثانیه پرتودهی ناچیز است که مربوط به انقطاع جزئی در باند پپتیدی می‌باشد. بعد از این زمان گستالت پیوندها در این باند موجب جابه‌جایی طیفی قابل توجهی می‌گردد.



شکل ۳: طیف کلی FTIR نمونه تابش نشده



شکل ۴: پیک باند آمید I تحت تابش تغییری ندارد در حالی که پیک باند آمید II با بالا رفتن زمان تابش به سمت عدد موج های کمتر جابه جا می‌شود.

باندهای پپتیدی و آمینواسیدهای گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین هر دو در جذب نور لیزر ArF نقشی تعیین‌کننده دارند. با این وجود که باند پپتیدی بین اسید آمینه‌ها، مسئول ۹۶ درصد جذب است و ۴۴ درصد باقی‌مانده آن ناشی از جذب نور در آمینواسیدهای می‌باشد [۱۷]. از طرفی ضریب جذب اسیدهای آروماتیک تیروزین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان در طول موج ۹۳۱ نانومتر یک مرتبه بزرگی بیشتر از ضریب جذب باندهای پپتیدی است. اما، تعداد باندهای پپتیدی در هر مولکول کلاژن بسیار بیشتر از اسیدهای آمینه

## References

- Waynant RW. Laser in Medicine. USA: CRC press, 2002; 86(96): 109-15.
- Achilli M, Lagueux J, Mantovani D. On The Effects of UV-C and PH on the Mechanical Behavior, Molecular Conformation and Cell Viability of Collagen-Based Scaffold for Vascular Tissue Engineering. J Macromol Biosci 2010; 10: 307-16.
- Wang k, Zheng X, Liu J, Qin Sh, Tang K. Influence of UV Irradiation on the Properties of Goatskin Collagen Matrices 2009.
- Sionkowska A, Wess T. Mechanical Properties of UV Irradiated Rat Tail Tendon (RTT) Collagen. J Biol Macromol 2004; 43: 9-12.

5. Ohan MP, Wedock KS, Dunn MG. Synergistic Effects of Glucose and Ultraviolet Irradiation on the Physical Properties of Collagen. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 384-91.
6. Wang X, Xiaodong Li, Yost MJ. Microtensile Testing of Collagen Fibril for Cardiovascular Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005; 74: 263-8.
7. Nikogosyan DN, Gbmer H. Photolysis of Aromatic Amino Acids in Aqueous Solution by Nanosecond 248 and 193 nm Laser Light. *J Photochem. Photobiol* 1992; 13: 219-34.
8. Nikogosyan DN, Gbmer H. Photolysis (193 nm) of Aliphatic Amino Acids in Aqueous Solution. *J Photochem Photobiol* 1995; 30: 189-93.
9. Khoroahilova EV, Repeyev YA, Nikogosyan DN. UV Photolysis of Aromatic Amino Acids and Related Dipeptides and Tripeptides. *J Photochem. Photobiol* 1990; 7: 159-72.
10. Fleischmajer R. Immunochemical Analysis of Human Kidney Reticulin. *J Pathol* 1992; 140: 1225-35.
11. Pavia DL, Lampman GM. Introduction to spectroscopy. USA: Cengage Learning 2009; 15-26.
12. Gallagher W. FTIR Analysis of Protein Structure.
13. Wisniewski M. Spectroscopic Study of a KrF Excimer Laser Treated Surface of the Thin Collagen Films. *J Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007; 188: 192-9.
14. Tsunoda K. Characterization of Materials by Excimer Laser Ablation of Hydrated Collagen Gel. *J Applied surface science* 2002; 197: 782-5.
15. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. Thermo Nicolet Corporation. CRC Press 2001.
16. Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation. *J Materials Science and Engineering* 2008; 28: 1420-9.
17. Fisher BT, Hahn DW. Measurement of Small-Signal Absorption Coefficient and Absorption Cross Section of Collagen for 193-nm Excimer Laser Light and the Role of Collagen in Tissue Ablation. *J Appl Opt* 2004; 43: 5443-51.