مقاله پژوهشی

لیزرپزشکی؛ ۱۳۹۰، دورهٔ ۸، شمارهٔ ۱، صفحات: ۲۸-۲۵.

بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی بافت کلاژنی قبل و بعد از تابش لیزر اگزایمر فرابنفش آرگون- فلوراید در خط ۱۹۳ نانومتر

سوسن مختاری [۱]
شقایق بقاپور [۱]
پرویز پروین [۲]
احمد امجدی [۳]

[۱] کارشناس ارشد فیزیک، دانشکدهٔ فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر
[۲]استاد فیزیک، دانشکدهٔ فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر
[۳]دانشیار فیزیک، دانشکدهٔ فیزیک، دانشگاه صنعتی‌شریف

نویسندهٔ مسئول: پرویز پروین، تهران، خیابان انقلاب، بین خیابان حافظ و ولیعصر (عج)، خیابان سعید، کوچهٔ نائینی، پلاک ۱۰، طبقه اول، تلفن: ۶۶۴۹۲۴۴۹، پست الکترونیک: parvin@aut.ac.ir

خلاصه

مقدمه: تابش لیزر اگزایمر ArF با توجه به دوز 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 تهیه‌شده از کپسول کلیوی گوسفند، توسط لیزر اگزایمر با طول موج ۱۹۳نانومتر تابش شده است. در آزمون کششی استاتیک، پارامترهایی چون مدول یانگ برای تخمین اثر تابش محاسبه شده‌اند. از آزمون مقدار P ($P <۰/۰۱$) و t دانشجویی برای بررسی اهمیت آماری داده‌های تجربی استفاده گردید. آزمون طیف‌سنجی FTIR نیز جهت مشاهدهٔ تغییرات ایجاد شده در ساختار شیمیایی و مولکولی بافت به‌کار رفته است.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: کاهش مدول یانگ تا زمان پرتودهی ۱۰ ثانیه نشان‌دهندهٔ این است که فاکتور جذب نور فرابنفش در باندهای پپتیدی منجر به انقطاع‌های جزئی در کلاژن و کاهش سفتی بافت می‌شود. درحالی‌که از زمان پرتودهی ۱۰ تا ۳۰ ثانیه پدیدهٔ جذب در اسیدهای آروماتیک غالب می‌باشد و سفتی بافت را افزایش می‌دهد. با افزایش دوز تابش، گسست پیوندها در بیشتر باندهای پپتیدی سفتی بافت را کاهش می‌دهد و شکسته‌شدن باندهای پپتیدی نیز منجر به کاهش فرکانس باند آمید II می‌گردد.

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

مقدمه

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

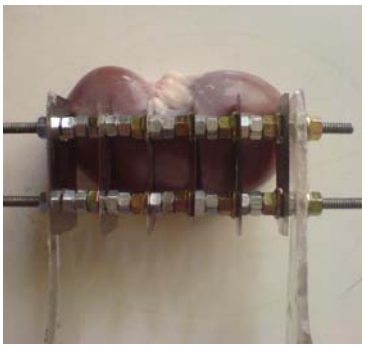
ضریب جذب اسیدهای آروماتیک در رشته‌های کلاژن در طول موج ۱۹۳نانومتر از یک مرتبهٔ بزرگی نسبت به مقدار ضریب جذب باندهای پپتیدی برخوردار است. جذب فوتون UV در اسیدهای آروماتیک متناظر با هر آمینواسید روی می‌دهد، درحالی‌که در هر ماکرومولکول کلاژن تعداد بسیار زیادی پیوند پپتیدی وجود دارد [۹-۷]. درنتیجه با توجه 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 بافت کپسول کلیوی گوسفند (به‌دلیل وجود درصد بالای کلاژن نوع اول (۷۶درصد) [۱۰] استفاده شده است. از سوی دیگر برای مشاهدهٔ تغییرات پس از تابش لیزر از آزمون کششی استاتیک و طیف‌سنجی مادون قرمز بهره‌گیری شده است.

روش بررسی

کلیه‌های گوسفندِ 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 انتقال یابد. همهٔ نمونه‌ها در طول ۴۸ ساعت پس از کشتار، آزمایش شدند. با استفاده از تیغ میکروتوم به شمارهٔ ۴ به‌طور 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 به‌دست آمد و برای برداشتن نمونه‌ها از روی بافت اصلی از کاغذ مرطوبی استفاده شد. این عمل به انتقال نمونه‌ها کمک کرده و از چروکیدگی آن جلوگیری می‌کند. نمونه‌ها به مدت ۱۲

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]

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.

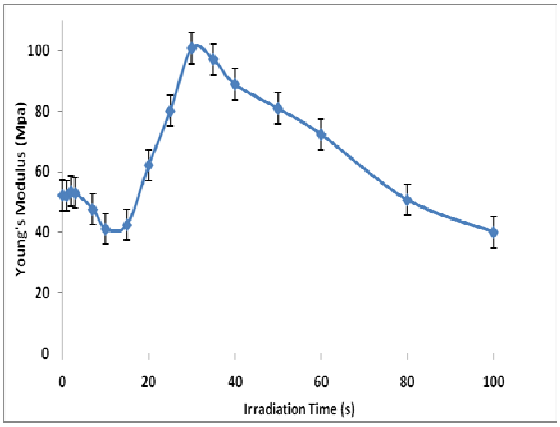


شکل ۱: برش نمونه‌ها توسط دستهٔ تیغ طراحی شده

تابش توسط لیزر اگزایمر ArF با مشخصات طول پالس ۱۰nsec، طول موج ۱۹۳نانومتر، انرژی ۵۰mj/pulse، شار ۰/۰۲ j/cm^2 و نرخ تکرار ۱Hz صورت گرفته است. نمونه‌ها در فاصلهٔ ۳۷سانتی‌متر از لیزر قرار گرفتند و زمان‌های پرتودهی شامل ۵، 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 ۱میلی‌متر بر دقیقه و تا مرز پارگی کشیده شدند. داده‌های نیرو (نیوتن)– جابجایی (میلی‌متر) به‌وسیلهٔ دستگاه ثبت شد و باتوجه به اندازه‌گیری‌های طول، عرض و ضخامت نمونه‌ها نمودارهای تنش- کرنش آن‌ها رسم گردید. مدول یانگ نیز از روی شیب نمودارهای تنش- کرنش به‌دست آمد. از آزمون مقدار P ($P<0/01$)، برای بررسی اهمیت آماری داده‌های تجربی استفاده گردید. نتایج خوانده شدهٔ تجربی به شکل نقاط پراکنده حول منحنی رگرسیون قرار می‌گیرند. روش آماری جهت تعیین اهمیت آماری داده‌ها به روش آنالیز رگرسیون دو جمعیت از طریق آزمون t دانشجویی و دودامنه می‌باشد. معنی دار بودن خطوط و نقاط تجربی نسبت به یکدیگر تابعی از میزان پراکندگی 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 ۵۰۰ تا ۴۵۰۰cm-1 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 تخریب نوری بافت پرداخت.

یافته ها

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



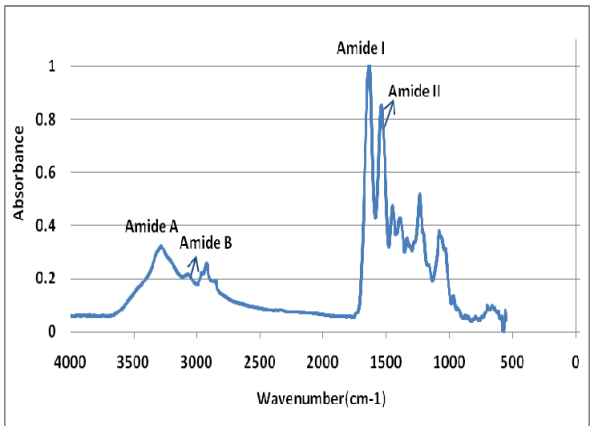
شکل۲: تغییرات مدول یانگ در زمان‌های متفاوت تابش لیزر اگزایمر ۱۹۳نانومتر با نرخ تکرار ۱ هرتز و طول پالس ۱۰ nsec و انرژی تپ ۵۰mj/pulse

در طیف فروسرخ بافت کپسول کلیوی، باندهای آمید یافت‌شده عبارت‌اند از: باندهای آمید A، B، I و II که عدد موج آن‌ها به ترتیب در حدود ۳۲۸۴ cm-1، ۳۰۷۲ cm-1، ۱۶۳۵ cm-1 و ۱۵۴۱ cm-1قرار 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 به‌ترتیب به کشیدگی پیوندهای N-H، C-H و C=O مربوط است، عمدتاً در اثر تابش، تغییر چشمگیری نداشته است [۱۶-۱۳]. درحالی‌که عدد موج باند آمید II (خمیدگی باند C-N) [۱۶-۱۳] تا زمان ۳۵ ثانیه جابه‌جایی اندکی داشت و از این زمان به بعد جابه‌جایی آن افزایش یافت (شکل ۴).

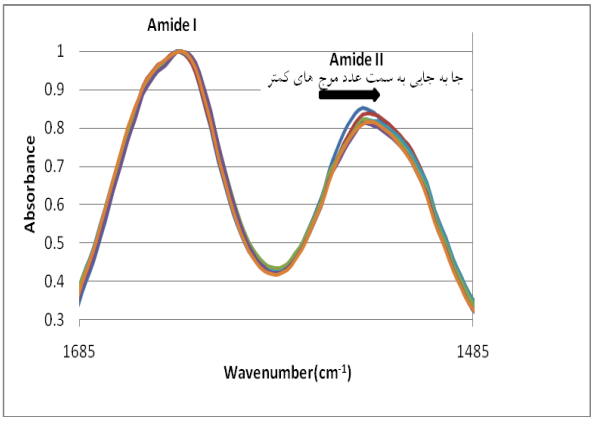
بحث و نتیجه‌گیری

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

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]

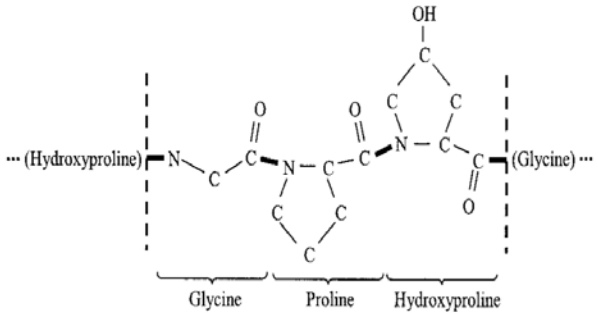


شکل ۳: طیف کلی FTIR نمونهٔ تابش نشده



شکل ۴: پیک باند آمید I تحت تابش تغییری ندارد درحالی‌که پیک باند آمید II با بالا رفتن زمان تابش به سمت عدد موج های کمتر جابه‌جا 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 ۹۶درصد جذب است و ۴درصد باقی‌ماندهٔ آن ناشی از جذب نور در آمینواسیدها می‌باشد [۱۷]. از طرفی ضریب جذب اسیدهای آروماتیک تیروزین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان در طول موج ۱۹۳نانومتر یک مرتبهٔ بزرگی بیشتر از ضریب جذب باندهای پپتیدی است. اما، تعداد باندهای پپتیدی در هر مولکول کلاژن بسیار بیشتر از اسیدهای آمینهٔ آروماتیک است [۷]. درنتیجه در طول تابش، دو پدیدهٔ جذب اسیدهای آروماتیک 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 آمینهٔ 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 ثانیهٔ 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 ۳۰ثانیه، 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 فوتوشیمیایی افزایش می‌یابد و گسست پیوندها در بیشتر باندهای پپتیدی باعث می‌شود که سفتی بافت کاهش یابد.

آزمون طیف‌سنجی فروسرخ نیز تأییدکنندهٔ آزمون فیزیکی است. به‌گونه‌ای 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 گسست پیوندها در این باند موجب جابه‌جایی طیفی قابل توجهی می‌گردد.

References

1. Waynant RW. Laser in Medicine. USA: CRC press, 2002; 86(96): 109-15.
2. 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.
3. Wang k, Zheng X, Liu J, Qin Sh, Tang K. Influence of UV Irradiation on the Properties of Goatskin Collagen Matrices 2009.
4. Sionkowska A, Wess T. Mechanical Properties of UV Irradiated Rat Tail Tendon (RTT) Collagen. J Biol Macromol 2004; 43: 9-12.

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]

5. Ohan MP, Weadock 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.

[Downloaded from icml.ir on 2026-10-31]