مقاله پژوهشی

لیزرپزشکی؛ ۱۳۸۹، دوره ۷، شماره ۴، صفحات: ۲۳-۱۹.

اثر تابش ناهمدوس فرابنفش برروی بافت کپسول کلیوی با استفاده از آزمون کششی دینامیکی و طیف‌سنجی FTIR

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

[۱] کارشناس ارشد فیزیک، دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی امیرکبیر
[۲] استاد فیزیک، دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی امیرکبیر
[۳] دانشیار فیزیک، دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتِ شریف

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: امروزه، برای بهبود خواص مکانیکی بافت‌های کلاژنی از روش‌های فیزیکی نظیر تابش فرابنفش برای ایجاد اتصالات عرضی استفاده می‌شود. کلاژن به‌عنوان اصلی‌ترین پروتئین ساختاری بافت‌ها، نور فرابنفش دور را جذب می‌کند. دو روش برای ایجاد اتصالات عرضی و تخریب نوری رشته‌های کلاژنی در طول تابش با هم رقابت دارند به‌طوری‌که رویداد هر یک از آن‌ها به دوز تابش بستگی پیدا می‌کند.

روش بررسی: در این مقاله اثر تابش نور فرابنفش ناهمدوس در خط ۲۵۴ نانومتر بر روی بافت کلاژنی کپسول کلیوی بررسی شده است. برای تخمین آثار القاء شده در بافت، آزمون مکانیکی کششی دینامیکی به همراه آزمون شیمیایی طیف‌سنجی فروسرخ صورت گرفته‌اند.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: نمونه‌های تابش‌شده تا زمان ۳۰دقیقه (معادل دوز تابشی $۱۳.۸۶ \frac{J}{cm^2}$)، بیشترین سفتی را دارا هستند که نشان‌دهندهٔ غلبهٔ فرآیند ایجاد اتصالات عرضی است. بالا رفتن دوز تابش سبب تخریب کل بافت می‌شود. آزمون طیف سنجی فروسرخ جابه‌جایی فرکانسی باند آمید I و II را که بیانگر تخریب باندهای پپتیدی در مدت زمان‌های پرتودهی طولانی است، نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اتصال عرضی، تخریب نوری، طیف‌سنجی مادون قرمز، کلاژن، مدول، نور فرابنفش

مقدمه

بافت کپسول کلیوی به‌دلیل درصد بالای کلاژن در ماتریکس برون‌سلولی خود و همچنین جداسازی راحت آن از بافت اصلی کلیه از جمله بافت‌های بیولوژیکی است که با ازبین‌بردن سلول‌های آن می‌توان داربستی کلاژنی تهیه نمود که کاربردهای زیادی در پزشکی دارد و به‌عنوان بافتی برای پیوند مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱]. از آنجایی‌که جداسازی بافت‌های بیولوژیکی نظیر کپسول کلیوی از بدن بر روی خواص مکانیکی آن‌ها اثر می‌گذارد، برای آماده‌سازی آن‌ها در عمل پیوندزنی به روش‌های بهبود خواص مکانیکی نیاز است [۲].

امروزه، برای بهبود خواص مکانیکی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای ایجاد اتصالات عرضی استفاده می‌شود [۲و۳]. روش‌های شیمیایی به دلیل آثار جانبی مانند ایجاد سمیت در بافت کنار گذاشته شده و روش‌های فیزیکی کاربرد گسترده‌تری یافته‌اند. یکی از روش-های فیزیکی، استفاده از تابش نور فرابنفش است. تابش فرابنفش بر روی پارامترهای مکانیکی بافت از قبیل مدول الاستیسیته و مدول ویسکوزیته اثر می‌گذارد بنابراین آزمون کششی می‌تواند تعیین‌کنندهٔ اثر تابش فرابنفش بر روی بافت باشد [۳و۴]. از طرفی تغییرات ایجاد شده در ساختار مولکولی بافت به‌وسیلهٔ آزمون‌های طیف‌سنجی قابل بررسی است. در این مقاله جهت تخمین اثر تابش فرابنفش ناهمدوس با قلهٔ $\lambda = 254nm$ برروی بافت بیولوژیکی کپسول کلیوی از آزمون‌های فیزیکی همچون آزمون کششی دینامیکی و آزمون طیف‌سنجی فروسرخ استفاده نموده‌ایم تا شرایط نور ناهمدوس فرابنفش را جهت مشاهدهٔ اثر اتصالات عرضی (سفتی) و اثر گسست مولکولی (سستی) بیابیم. از آزمون مقدار P ($P<۰/۰۱$) برای بررسی اهمیت آماری داده‌های تجربی استفاده شده است. نتایج خوانده شدهٔ تجربی به شکل نقاط پراکنده حول منحنی رگراسیون قرار می‌گیرند. روش آماری جهت تعیین اهمیت آماری داده‌ها به روش «آنالیز رگراسیون دو جمعیت از طریق آزمون t دانشجویی و دو دامنه» می‌باشد. معنی‌دار بودن خطوط و نقاط تجربی نسبت به یکدیگر تابعی از میزان پراکندگی نقاط حول خط رگراسیون و به معنای دیگر میزان انحراف معیار حول میانگین می‌باشد.

[Downloaded from icml.ir on 2025-12-16]

روش بررسی

کپسول کلیوی، بافت همبندی است که سطح کلیه را احاطه می‌کند و به‌طور عمده از فیبرهای کلاژن (۷۶درصد کلاژن نوع اول و ۲۴درصد کلاژن نوع سوم) در میان فیبرهای الاستین تشکیل شده است. ازآنجایی‌که ضخامت این بافت تقریباً در طول نمونه ثابت می‌باشد و برش و آماده‌سازی راحت‌تری نسبت به سایر بافت‌های کلاژنی دارد، در این مقاله مورد استفاده قرار گرفته است[۵].

کلیه‌های گوسفند پس از تهیه، در یخ منتقل و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و در سرم فیزیولوژی نگهداری شدند و نمونه‌هایی مستطیل شکل و با ابعاد یکسان با استفاده از تیغ طراحی شده از یک سمت کلیه تهیه شدند. طول و عرض نمونه‌ها به ترتیب ۲۵ و ۸ میلی‌متر و ضخامت آن با میانگین‌گیری در سه نقطهٔ نمونه ۰/۰۶ میلی‌متر به‌دست آمد. برای جداسازی بافت کپسول از کاغذ مستطیل شکل مرطوب استفاده شد به‌طوری‌که با قرار دادن آن برروی بافت برش‌خورده بتوان به‌راحتی کپسول کلیوی را از بافت اصلی جدا نمود. برای انجام آزمایش در فاز خشک، نمونه‌ها به‌مدت ۱۲ ساعت در معرض هوا و دمای اتاق قرار گرفتند. نمونه‌های تهیه شده به سلول پرتودهی که مجهز به سه لامپ ۱۵ وات UVC با طول موج قلهٔ ۲۵۴نانومتر است، منتقل شدند. فاصلهٔ قرارگیری نمونه‌ها از لامپ‌ها ۱۲ سانتی‌متر است. این فاصله طوری انتخاب شده است که نمونه‌ها در طول تابش دچار افزایش دما نشوند. بنابراین از تأثیر تغییر ماهیت‌های گرمایی ایجاد شدهٔ ممکن توسط لامپ جلوگیری می‌شود. چگالی توان در این فاصله $۷/۷ \frac{mw}{cm^2}$ و مدت زمان پرتودهی ۳۰ دقیقه ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت بوده است.

آزمون کششی دینامیکی:

برای انجام آزمون‌های کششی دینامیکی، نمونه‌ها به دستگاه DMTA-Triton منتقل شدند. برای تعیین ناحیهٔ ویسکوالاستیک خطی ابتدا از آزمون جاروب کرنش استفاده گردید. پس از محاسبهٔ دامنهٔ تغییر طول اعمالی به نمونه‌ها برای بررسی پاسخ فرکانسی بافت و همچنین تغییرات مدول ذخیره و اتلاف با توجه به مدت زمان پرتودهی، آزمون جاروب فرکانس انجام شد.

آزمون طیف سنجی فروسرخ (FTIR):

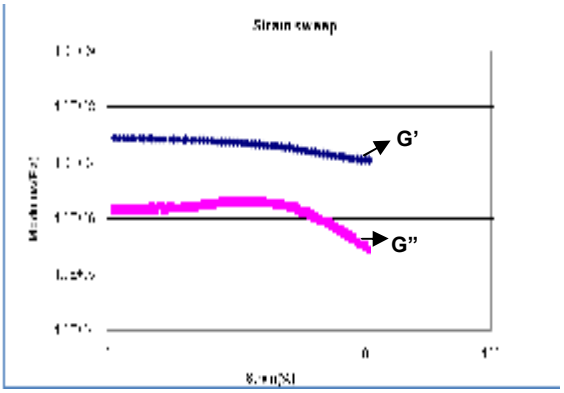
برای مشاهدهٔ تغییرات ایجادشده در ساختار مولکولی بافت کپسول کلیوی از آزمون طیف سنجی FTIR بهره گرفته شده است [۶]. در این آزمون نور فروسرخ در بازهٔ فرکانسی ۵۰۰ تا $۴۵۰۰\ cm^{-1}$ به نمونه تابانده شد و طیف جذب آن به‌دست آمد. هر یک از پیک‌های جذب در طیف فروسرخ از یک نوع باند ارتعاشی در بافت نتیجه می‌شود بنابراین، با مطالعهٔ تغییرات قله‌های جذب نمونه در اثر تابش فرابنفش هم از نظر شدت و هم از نظر فرکانس، می‌توان به تغییرات شیمیایی و ساختاری ایجاد شده در بافت پی برد.

یافته ها

آزمون کششی دینامیکی:

در آزمون جاروب کرنش، نیرویی نوسانی با فرکانس ثابت ۱ هرتز و دامنهٔ جابه‌جایی در بازهٔ ۰/۰۰۱- ۰/۷میلی‌متر به نمونه‌ها اعمال شد و تغییرات مدول ذخیره و اتلاف بر حسب درصد کرنش به‌دست آمد (شکل ۱). تغییرات مدول ذخیره تا میزان درصد کرنش ۰/۳۶۱۶ که معادل با میزان دامنهٔ جابه‌جایی ۰/۰۲۲ میلی‌متر است ثابت می‌ماند و سپس کاهش می‌یابد. به همین دلیل اگر بخواهیم در محدودهٔ ویسکوالاستیسیتهٔ خطی کار کنیم باید تغییر طولی با دامنهٔ ۰/۰۲۲ میلی‌متر به نمونه‌ها اعمال کنیم.

در آزمون جاروب فرکانس، تغییر طول نوسانی با دامنهٔ ۰/۰۲۲ میلی‌متر و در بازهٔ فرکانسی ۰/۱ تا ۷۰ هرتز به نمونه‌ها اعمال می‌شود و پاسخ بافت به فرکانس نوسانات به‌دست می‌آید. همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود، مدول ذخیره با افزایش فرکانس از ۰/۱ هرتز تا حدود ۱۰ هرتز افزایش و سپس کاهش می‌یابد. ازآن‌جایی‌که مدول ذخیره بر خاصیت الاستیسیته و مدول اتلاف بر خاصیت ویسکوزیتهٔ بافت دلالت دارد، انتظار داریم روند تغییرات آن‌ها عکس هم باشد.

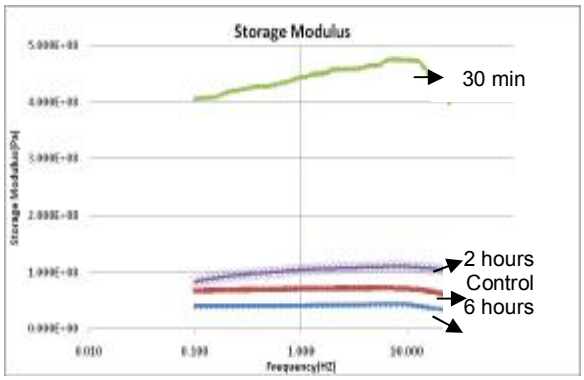


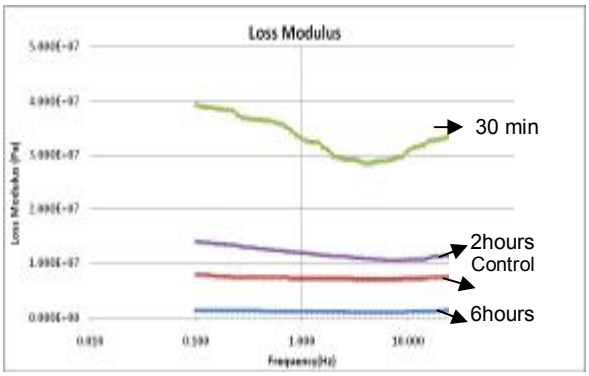
شکل۱: تغییرات مدول ذخیره و اتلاف بر حسب درصد کرنش

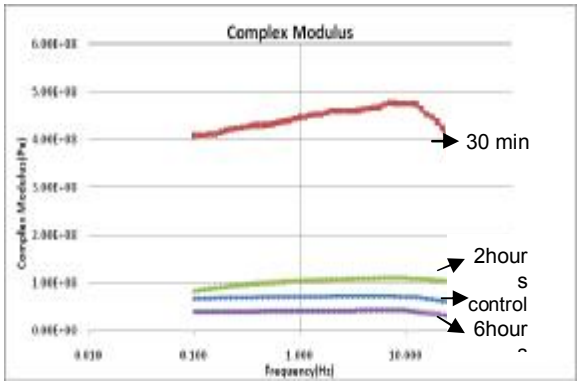
طبق نتایج حاصل‌شده مدول ذخیره یک مرتبهٔ بزرگی از مدول اتلاف بیشتر است، بنابراین روند تغییرات مدول مختلط مانند مدول ذخیره به‌دست آمده است.

همانطورکه در شکل ۲ به‌چشم می‌خورد مدول ذخیره، اتلاف و سفتی دینامیکی در مدت زمان پرتودهی نیم ساعت بیشینه می‌باشد و با افزایش دوز تابش کاهش می‌یابد به طوری‌که نمونه‌های تغییر ماهیت‌یافته دارای مدولی کمتر از مدول نمونهٔ تابش نیافته هستند.

[Downloaded from icml.ir on 2025-12-16]



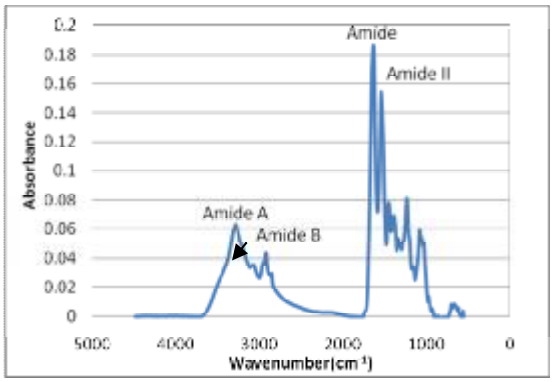




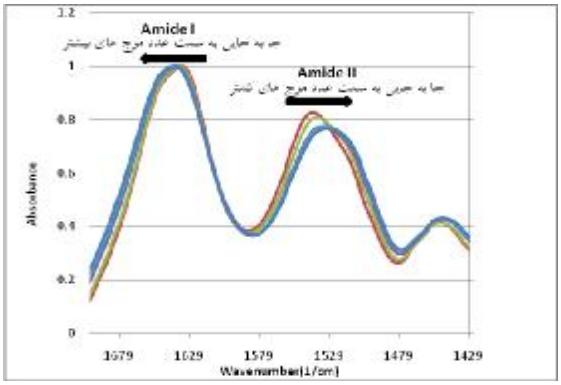
شکل۲: تغییرات مدول ذخیره، اتلاف و سفتی دینامیکی برحسب فرکانس و مدت زمان پرتودهی

آزمون طیف سنجی فروسرخ:

طیف FTIR بافت کپسول کلیوی شامل ۴ پیک اصلی آمید A (کشیدگی N-H)، آمید B (کشیدگی C-H)، آمید I (کشیدگی C=O) و آمید II (خمیدگی C-N) است [۹-۶]. طیف فروسرخ بافت کپسول کلیوی در حالت تابش نیافته در شکل ۳ نشان داده شده است. عدد موج این باندها به‌ترتیب در حدود ۳۲۸۴، ۳۰۷۲، ۱۶۳۵ و ۱۵۴۱m^{-1} واقع شده‌اند. در اثر تابش نور فرابنفش، باند آمید I و II به ترتیب به سمت عدد موج‌های بیشتر و کمتر جابجا شده و باند آمید A و B تغییر چندانی نداشته‌اند (شکل۴).



شکل۳: طیف مادون قرمز بافت کپسول قبل از تابش فرابنفش



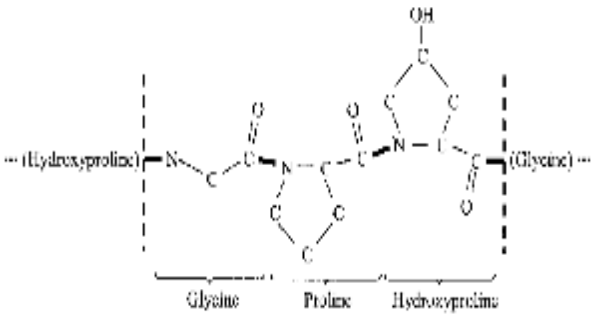
شکل۴: جابه‌جایی فرکانسی و شدت جذب باندهای آمید I و II با مدت زمان پرتودهی

بحث و نتیجه‌گیری

کروموفورهای اصلی کلاژن، تیروزین و فنیل آلانین، جذبی در ناحیهٔ ۲۸۰-۲۵۰ نانومتر دارند [۱۲-۱۰]. به همین دلیل از لامپ‌های UVC که طول موج اصلی آن‌ها ۲۵۴ نانومتر است، استفاده می‌شود. تابش محدود نور UVC با ایجاد رادیکال‌های آزاد در هستهٔ اسیدهای آمینهٔ آروماتیک باعث اتصالات عرضی کووالانسی درون و بین مولکولی می‌شود. اتصالات عرضی مانع از سُرخوردن مولکول‌های کلاژن برروی یکدیگر می‌شوند و سفتی بافت را افزایش می‌دهند [۲، ۳ و ۸]. این اثر را می‌توان در مدت زمان تابش ۳۰ دقیقه مشاهده کرد. همانطورکه از آزمون‌های کششی دینامیکی پیداست، مدول (سفتی) بافت در این مدت زمان تابش بیشترین مقدار را نسبت به حالت تابش نیافته دارد. البته به موازات این فرآیند، تولید رادیکال‌های آزاد می‌توانند قطع‌شدگی‌هایی نیز در طول زنجیره‌ها (باندهای پپتیدی) ایجاد کنند. این قطع‌شدگی‌ها به علت محدودیت‌های حاکم بر زنجیره‌های کلاژن لزوماً باعث تغییر ماهیت‌های مقطعی نمی‌شوند [۳ و ۱۴-۱۲]. این فرآیند را می‌توان در زمان تابش ۲ ساعت مشاهده کرد زیرا با وجود آن‌که سفتی بافت در این زمان بالاتر از نمونهٔ تابش نشده است اما، روند رو به کاهشی را می‌پیماید. با بالا رفتن دوز تابش، باندهای

[Downloaded from icml.ir on 2025-12-16]

پپتیدی در طول زنجیره‌ها پاره می‌شوند [۹ و ۱۴]. قطعه قطعه شدن زنجیره‌های کلاژن سبب از بین رفتن تمامیت مکانیکی بافت می‌شود و بنابراین در زمان‌های تابش ۴ و ۶ ساعت بافت تخریب خواهد شد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمون طیف‌سنجی فروسرخ، اثر دیده‌شده در آزمون‌های مکانیکی را تا حدودی تأیید می‌کند. جابه‌جایی فرکانسی باندهای آمید به سمت فرکانس‌های کمتر ناشی از سست شدن پیوند و جابه‌جایی آن‌ها به سمت فرکانس‌های بالاتر نشان‌دهندهٔ قوی‌تر شدن پیوند است. باند آمید II به کشیدگی ارتعاشی باند C-N مربوط است و این باند پپتیدی اتصال میان اسیدهای آمینهٔ موجود در مولکول‌های کلاژن را مشخص می‌کند. شکل ۵ حضور باندهای پپتیدی را در مولکول کلاژن نشان می‌دهد.



شکل۵: فرمول کلاژن. سه اسید آمینهٔ اصلی کلاژن شامل پرولین، گلیسین و هیدروکسی پرولین می‌باشد و باندهای پپتیدی C-N بین اسیدهای آمینه برقرار است.

تخریب رشته‌های کلاژن و درنتیجه تخریب کل بافت در اثر تابش فرابنفش با شکسته‌شدن این پیوند و گذار از حالت مارپیچی به حالت کاتوره‌ای روی می‌دهد [۹]. هر گسستگی در پیوند سبب ایجاد پیوندهای دیگر و در نتیجه تقویت کلی پیوندها می‌شود، بنابراین انتظار داریم باند آمیدی در بافت با انتقال به سمت فرکانس‌های بالاتر این تقویت را نشان دهد. همان‌طور که از طیف جذب بافت پیداست، باند آمید I به سمت فرکانس‌های بالاتر میل کرده است درنتیجه مشاهده می‌شود که شکست باند C-N منجر به شکل‌گیری باند C=O شده است.

بافت کپسول کلیوی به تابش ناهمدوس فرابنفش پاسخ نشان می‌دهد و در شرایط ویژهٔ تابش (مدت زمان پرتودهی ۳۰ دقیقه معادل دوز تابشی $13.86\frac{J}{cm^2}$) می‌توان سطح بافت را بدون آسیب ساختاری به داربست کلاژنی و به کمک فرآیند اتصال عرضی (Cross-linking) مستحکم نمود. ازآنجایی‌که این بافت عمدتاً از کلاژن نوع I تشکیل شده است، می‌توان نتایج آن را به سایر بافت‌های کلاژنی و همچنین بیومواد‌ی که در آزمایشگاه و از کلاژن نوع I تهیه می‌شوند و کاربردهای فراوان پزشکی دارند، تعمیم داد. عملاً محدودیت تابش وجود ندارد زیرا شدت نور بالا نیست و زمان پرتودهی تعیین‌کننده است و این روش می‌تواند در آینده در فرآیندهای مربوط به پیوند یا ترمیم پوست به‌کار گرفته شود.

References

1. Patel UH, Hiles MC, Hodde JP. Graft Prosthesis Devices Containing Renal Capsule Collagen. US Patent Aplication Publication 2006.
2. Suh H, Lee WK, Park, JC, Cho BK. Evaluation of the Degree of Cross-linking in UV Irradiated Porcine Valves. J Yonsei Med 1999; 40(2): 159-65.
3. Sionkowska A, Wess T. Mechanical Properties of UV Irradiated Rat Tail Tendon (RTT) Collagen. J Int Biol Macromol 2004; 34(1-2): 9-12.
4. 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(3): 307-16.
5. Fleischmajer R, Jacobs L, Perlish JS, Katchen B, Schwartz E, Timpl R. Immunochemical Analysis of Human Kidney Reticulin. J Pathol 1992; 140(5): 1225-35.
6. Kamiska A, Sionkowska A. Effect of UV Radiation on the Infrared Spectra of Collagen. J Polymer Degradation and Stability 1996; 51(1): 19-26.
7. Camacho NP, West P, Torzilli PA, Mendelsohn R. FTIR Microscopic Imaging of Collagen and Proteoglycan in Bovine Cartilage. J Biopolymers 2001; 62(1): 1-8.
8. Metreveli NO, Jariashvili KK, Namicheishvili LO, Svintradze DV, Chikvaidze EN, Sionkowska A, Skopinska J. UV-Vis and FT-IR Spectra of Ultraviolet Irradiated Collagen in the Presence of Antioxidant Ascorbic Acid. J Ecotoxicol Environ Saf 2010; 73(3): 448-55.
9. Rabotyagova OS, Cebe P, L.Kaplan D. Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation. J Materials Sci and Eng C 2008; 28(8): 1420-9.

[Downloaded from icml.ir on 2025-12-16]

10. Sionkowska A. The Influence of UV Light on Collagen/Poly (ethylene glycol) Blends. J Polymer Degradation and Stability 2006; 91(2): 305-12.

11. Sionkowska A. Modification of Collagen Films by Ultraviolet Irradiation. J Polymer Degradation and Stability 2000; 68(2): 147-51.

12. Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska J, Kennedy CJ, Wess TJ. The Photochemical Stability of Collagen–Chitosan Blends. J Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 2004; 162(2-3): 545-54.

13. Sionkowska A, Wiśniewski M, Skopińska J, Mantovani D. Effects of Solar Radiation on Collagen-based Biomaterials. J Photoenergy 2006; 1-6.

14. Wang K, Zheng X, Liu J, Qin S, Tang K. Influence of UV Irradiation on the Properties of Goatskin Collagen Matrices 2009.

15. 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(29): 5443-51.

[Downloaded from icml.ir on 2025-12-16]