

بررسی اثر پرتوهای لیزر هلیوم-نئون بر فرآیند ساخت کلازن در سلولهای فیبروبلاست (تنوسیت) توسط میکروسکوپ الکترونی

محمد تقی قربانیان M.Sc*, افسانه آذری M.Sc*, احمد حسینی Ph.D, مجتبی رضازاده Ph.D*

دانشگاه علم راه دامغان

جهاد دانشگاهی، علوم پزشکی ایران، گروه پژوهشی فیزیوتراپی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی

* جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران، پژوهشکده روان

آدرس مکاتبد: تهران، صندوق پستی ۱۶۳۱۵-۴۴۲، گروه پژوهشی فیزیوتراپی حباد دانشگاهی علوم پزشکی ایران

جگہ

* هدف: بررسی اثر لیزر کم توان هلیوم نئون بر ساخت رشته‌های کلاژن تو مس ط سلولهای فیبروبلاست در خلال ترمیم

تاونل

* مواد و روشها: تاندون آشیل پای راست ۱۲ سر خرگوش نر نژاد Dutch پس از بیهوشی از ۱/۵ سانتیمتری محل اتصال به استخوان کالکانثوس قطع شد. میس تاندون فقط شده توسط نخ بخیه نایلون مونوفیلامن ۴ صفر به روش زده Modified Kessler بخیه زده شد. حیوانات به صورت تصادفی در دو گروه آزمایش و کنترل قرار داده شدند. در گروه کنترل درمان معمولی انجام شد و در گروه آزمایش علاوه بر درمان مذکور، محل مذکور، محل زخم نیز روزانه در معرض تا مش برتوهای لیزر کم ترازن هلیوم - نئون با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و انرژی 10 mJ/cm^2 قرار گرفت.

پس از کشتن حیوانات در روزهای ۱۴ و ۲۱ نمونه ها برای مطالعه و بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی پردازش شدند.

* **یافته‌ها:** انرژی فوتونهای نور لیزر می‌تواند حالت ارتعاشی و شکل مولکولها را تغییر داده متجر به پاسخهای بیولوژیک گوناگون شوند. پرتوهای لیزر کم توان هلبوم نئون با داشتن آثار تحریکی فوتوبیولوزیک بر واکنشات بیوشیمیابی مؤثر در فرآیند ساخت کلارن موجب توسعه و گسترش قابل ملاحظه RER (Rough Endoplasmic Reticulum) می‌شود.

*نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این بررسی می‌توان گفت که پرتوهای لیزر کم توان موجب تسریع فرآیند ساخت کلارز و همچنین افزایش قطره‌فیری‌لها می‌شود ($P=0.043$).

گا، هانگام سه کلاسی، آن، فرسایل است، تانده، ن

مقدمه

تائدونها که نبروی کشی عضلات را به استخوانها منتقل می‌نمایند جزء بافت همبند متراکم منظم محسوب می‌شوند. بعلت برتری رشته‌های همبندی (کلاژن) بر جزء سلولی و ماده زینه، تائدون به عنوان متراکم‌ترین بافت همبند رشته‌ای شناخته می‌شود (۱، ۲).

رشته‌های کلاژن یا دسته‌های تائدونی اولیه از تعداد فراوان فیریل ساخته می‌شوند. در برشهای عرضی فیریلهای کلاژن از نظر قطر به دو با مه‌گروه با قطر $60\text{ }\mu\text{m}$ ناتومتر یا $175\text{ }\mu\text{m}$ تاتومتر و بیشتر تقسیم می‌شوند. فراواترین سلول موجود، فیروبلاست با سلولی تائدونی (تسوپیت) است که در برشهای طولی به صورت موازی مابین نوارهای کلاژن فرار گرفته‌اند. هر یک از دستجات تائدونی اولیه توسط مقدار کمی بافت همبند است به نام آندوتندیوم^۱ پوشیده می‌شود. سپس چندین دسته تائدونی اولیه به همراه سلولهای فیروبلاست با بافت همبند متراکمتری به نام پری‌تندیوم^۲ پوشیده می‌شود که اصطلاحاً به آن دستجات ثانویه یا فاسیکل^۳ می‌گویند. تائدونی که از چندین دسته ثانویه با فاسیکل شکل شده از پرون توسط بافت همبند ضخیمی به نام اپس‌تندیوم^۴ احاطه می‌شود (۱، ۲، ۳، ۴، ۵).

تائدونها به دنبال وارد آمدن خدمات و ضربات مختلف به اندامهای حرکتی دچار آسیب می‌شوند. از عواملی که باعث آمیب به تائدون می‌شوند، می‌توان به نبرهای مکانیکی، خدمات خفیف و متوالی و اختلالات خونرسانی و تغذیه‌ای اشاره کرد. بعلت فعالیت متایولیکی ناچیز در تائدون و همچنین کم بودن عروق تغذیه کننده، اثیام جراحات در این ساختمان به کلندی پیش می‌رود. انتخاب تکنیک درمانی باستنی بر مبنای آگاهی کامل از اصول اساسی مراحل اثیام و نیز شرایط بیومکانیکی خاص این بافت باشد (۳، ۷، ۸).

۱۴۸

Kana, Enwemeka, Yamada, Abergel Mester در خصوص تأثیر بیوسیمولاوری و فوتوسیمولاوری پرتوهای لیزر بر روی ترمیم پوست، تائدون و شکنگی استخوان انجام داده‌اند. مطالعات در *In vitro* و *In vivo* ایشان داده است که تأثیر پرتوهای لیزر بر ترمیم بافت همبند به موجب افزایش فیروبلازیا و ساخت کلاژن، نکشیر سلولهای کاهش پاسخهای ایمنی با دخالت پروستاگلاندین‌تها، نوزایی عروق و افزایش جریان خون و افزایش فعالیت سلولها در جهت ساخت ATP صورت پذیرفته است (۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵).

Enwemeka از محققینی است که در مورد ترمیم تائدون به صورت طبیعی و همچنین با استفاده از روش‌های درمانی بیوفیزیک، سلسله پژوهش‌های متوالی را انجام داده است. این محقق در سال ۱۹۹۲ پرتوهای لیزر هلیوم – نئون با طول موج $632/8\text{ }\mu\text{m}$ ناتومتر و دانسیته 5 mJ/cm^2 و 1 mJ/cm^2 بر وضعیت فراساختاری سلولهای فیروبلاست تائدون در حال ترمیم آزمایش نمود (۹). این تحقیق در نظر دارد با توجه به سرعت کند اثیام تائدون و نقش لیزر در پدیده ترمیم، تأثیر این روش را از نظر سلولی مورد بررسی قرار دهد.

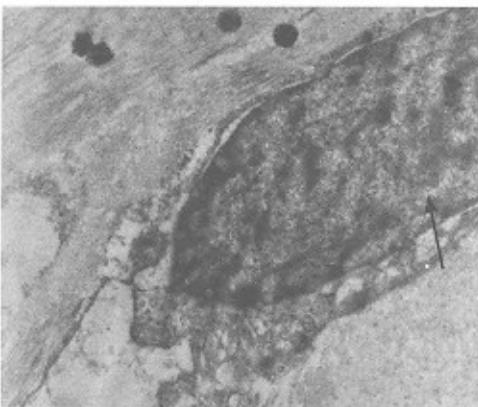
مواد و روشها

در تحقیق حاضر از ۱۲ سر خرگوش نر نژاد Dutch سفید که در

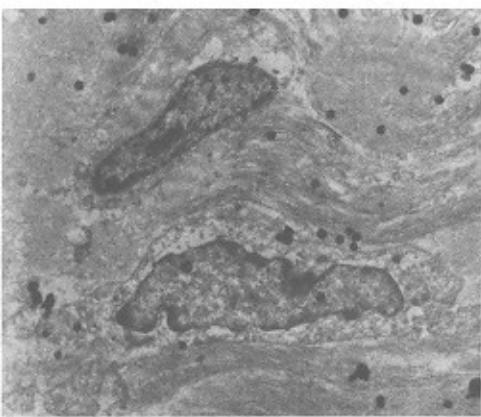
1. Endotendineum
2. Pretendineum
3. Facicle
4. Epithendineum



بیکروماین آن در وسط به صورت وزیکولر دیده می شود و نواحی هتروگروماین پیشتر در زیر پوشش هسته متصرکر شده است. شبکه آندوپلاسمیک خشن در حال توسعه و تشکیل یک شبکه لوله مانند بوده و با غشای هسته در ارتباط است و میتوکندریها به صورت کروی در داخل سیتوپلاسم پراکنده است. فیبریلهای کلائز به وضوح به شکل‌های عرضی و طولی به اندازه‌های مختلف و همچنین با جهت‌گیری نامشخص و پراکنده مشاهده می شوند (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: نمونه کنترل روز ۴؛ میکروگراف الکترونی از هسته سلول فیبروبلاست (بیکار) به همراه سیتوپلاسم و فیبریلهای کلائز به صورت عرضی و طولی در ماده زمینه خارج سلولی (بزرگنمایی $1000\times$)



شکل ۲: نمونه لبزر روز ۲۱؛ میکروگراف الکترونی از هسته دو سلول فیبروبلاست (بیکار) به همراه سیتوپلاسم و فیبریلهای کلائز به صورت عرضی و طولی در ماده زمینه خارج سلولی (بزرگنمایی $1000\times$)

مشاهدات روز بیست و یکم گروه کنترل نشان می دهد که هسته فیبروبلاستها با نمای بیکروماین و هسته بزرگ مشاهده می شود و بخش هتروگروماین پیشتر در ناحیه زیر غشا قرار دارد. استطاله‌های سلول به وضوح در تقسیم‌بندی نوارهای فیبریل کلائز شرکت می کند و سیتوپلاسم با شبکه آندوپلاسمیک خشن، دستگاه گلزاری، میتوکندری به همراه واکوئولهای ترشحی که در حال ترشح به خارج سلول هستند دیده می شود (شکل‌های ۳ و ۴).

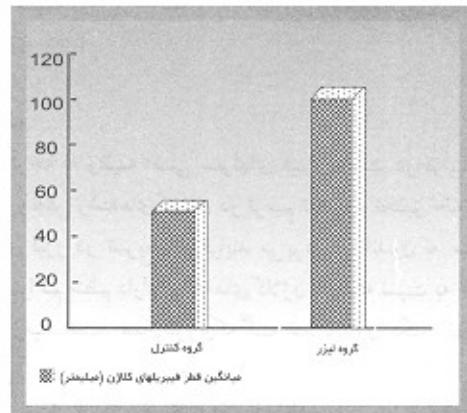
توسط روزین پر شد و به مدت ۹۶ ساعت در آون 60° سانتی‌گراد قرار داده شد. سهیس مقاطع ضخیم ($5/\mu$) و متعاقب آن مقاطع نازک $40\text{ }\mu$ تا $50\text{ }\mu$ آنگسترومی تهیه شد. برشهای مناسب پس از قرار گرفتن بر روی گردید می برای رنگ آمیزی به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در معرض یورانیل استات و مدت ۱۰ دقیقه در معرض سیترات سرب قرار گرفتند. مقاطع توسط میکروسکوپ الکترونی استقایی فلیپس مدل $400\text{ }\times$ در $100\text{ }\text{nm}$ کیلو ولت مطالعه شدند. برای اندازه گیری قطر فیبریلهای کلائز در میکروگرافهای الکترونی از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{قطر فیبریل} = \frac{\text{میلی متر}}{\text{بزرگنمایی میکروگراف}} \times 1000000$$

برای تجزیه تحلیل اطلاعات و رسم نمودارها از نرم افزار آماری SPSS و FOXGRAPH نسخه ۵ و از آزمونهای آماری Mann Whitney U test, student t-test استفاده شد.

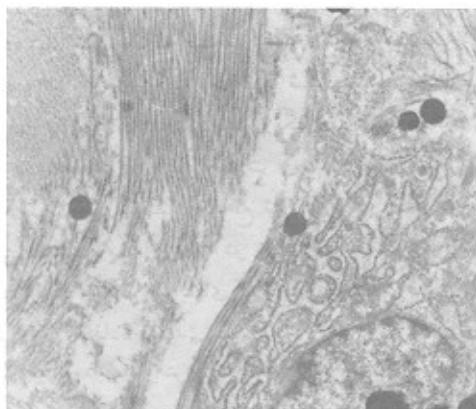
یافته‌ها

مشاهدات روز چهاردهم گروه کنترل نشان می دهد که سلولهای فیبروبلاست تکثیر یافته و به همراه فیبریلهای کلائز در بافت ناحیه زخم پراکنده هستند. سلولهای فیبروبلاست دارای سیتوپلاسمی وسیع حاوی میتوکندری، شبکه آندوپلاسمیک خشن پراکنده به همراه واکوئولهای ترشحی و دستگاه گلزاری است. فیبریلهای کلائز به صورت رشته‌های طولی و مقاطع عرضی در اندازه‌های کوچک و بزرگ به صورت پراکنده در جهات مختلف دیده می شوند (نمودار ۱).



نمودار ۱: میانگین قطر فیبریلهای کلائز روز ۲۱ در گروه کنترل و آزمایش

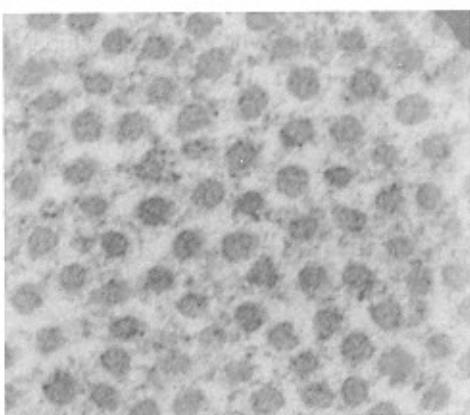
مشاهدات روز چهاردهم گروه لبزر نشان می دهد که سلولهای فیبروبلاست ناحیه زخم، ضمن اینکه از لحاظ تعداد نسبت به گروه کنترل بزرگی دارد، سورفولژی سلولها حاکمی از فعالیت زیاد و سنتز ماتریکس خارج سلولی است. در میکروگرافهای الکترونی، سلولهای فیبروبلاست به صورت سلول دوکی کشیده با سیتوپلاسم وسیع استطاله‌های سلولی مشخص تر از گروه کنترل با هسته میله‌ای شکل دیده می شود. هسته فیبروبلاست اندازه‌ای بزرگ داشته و بخش



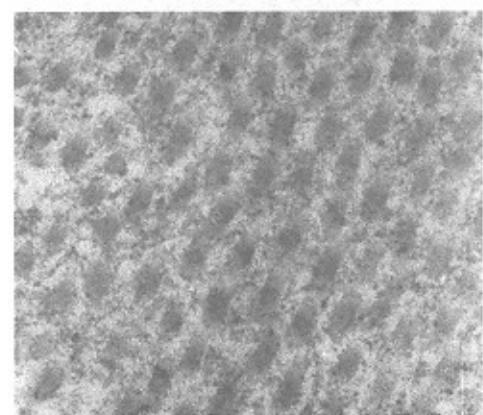
شکل ۵: نمونه لیزر روز ۲۱، میکروگراف اختراعی از دسته سلول فیبروپلاست در کوشش مشتل ما سیتوپلاسم سرشار از شبکه آندوپلاسیک خشن (بزرگنمایی: ×۴۰۰)



شکل ۶: نمونه کنترل روز ۲۱؛ میکروگراف اختراعی از سیتوپلاسم سلول فیبروپلاست با داکوتنهای ترشحی و فیبریلهای کلازن (بزرگنمایی: ×۱۶۰۰)



شکل ۷: نمونه لیزر روز ۲۱؛ میکروگراف اختراعی از مقاطع عرضی فیبریلهای کلازن (بزرگنمایی: ×۴۰۰)



شکل ۸: نمونه کنترل روز ۲۱؛ میکروگراف اختراعی از مقاطع عرضی فیبریلهای کلازن (بزرگنمایی: ×۴۰۰)

۵۰

بحث

با توجه به وظیفه اصلی سلولهای فیبروپلاست در فرایند ساخت کلازن و نقش رشته‌های کلازن در ترمیم تاندون، تحقیق حاضر به تأثیر پرتوهای لیزر در تسریع این فرایند می‌پردازد. تاندون به عنوان بافت همبند مترآکم منظم دارای رشته‌های کلازن بر جسته نسبت به جزء سلولی و ماده زمینه است. همان‌طوری که گفته شد تاندون یک بافت نسبتاً کم خون بوده و از طرفی رشته‌های کلازن موجود در آن به کندی تجدید و نوسازی می‌شوند (۱، ۲، ۳). بدین لحاظ و با توجه به روند کند ایام چراحت در این ساختهای بروای ایام تاندون آشیل جراحی شده، ۸ تا ۱۰ هفته‌ی بی‌حرکتی توصیه می‌شود. با این طلاقی شدن بی‌حرکتی به علت مرعut کند ایام مرجب شد که اسکان استفاده از عوارض فیزیکی (الماج اولتراسوند، جریان الکتریسیته و پرتوی لیزر) و روشهای درمانی بروای افزایش سرعت ترمیم تاندون فراهم شود (۷).

اثر پرتوهای لیزر به طول موج، دوز و شدت اثری پرتوهاست که دارد (۱۰، ۱۶، ۱۷). پیامون آثار لیزر های کم توان بر ترمیم تاندون تحقیقات محدودی انجام شده است؛ Enwemeka

مشاهدات روز بیست و یکم در گروه لیزر نشان می‌دهد که سیتوپلاسم سلولهای فیبروپلاست با استطلاوهای فراوان، مشتب و حجم وسیع نر نسبت به گروه کنترل در دسته‌بندی توارهای کلازن ادخالت می‌کنند. سیتوپلاسم وسیع فیبروپلاست کاملاً توسط شبکه لوله مانند آندوپلاسیک خشن با ریبورزومهای فراوان و مشخص به همراه وزیکولهای ترشحی بسیار فراگرفته شده است. شبکه آندوپلاسیک خشن که قسم اعظم سیتوپلاسم را اشغال می‌کند، دارای سیسترنای بین است که محتویات آن در زیر میکروскоп به صورت گرانولر دیده می‌شود. هسته سلول بیزرسک و کشیده که در برخی موارد دارای حاشیه کنگره دار است، به صورت کاملاً بیزرسک و مانین دیده می‌شود. مبدانهای خارج سلولی حاوی فیبریلهای کلازن بیش از گروه کنترل مشاهده می‌شود.

فیبریلهای با نواریندی تیره و روش متابوب مشخص در هر یاندی یا دسته دارای قطر و تراکم بیشتری نسبت به گروه کنترل هستند (شکل‌های ۵ و ۶).

استطاله‌های طوبیل فراوان در دسته‌بندی توارهای کلاژن ترشح شده، فعالیت بیشتری را از خرد شان می‌دهد. آنچه به خوبی فعالیت بیشتر ساخت و ترشح فیریلهای کلاژن را در گروه لیزر نسبت به کنترل بروز می‌دهد، فراوانی شبکه لوله‌ای به هم پیوسته RER با سیستمی وسیع و فراوان موجود در سیتوپلاسم سلولهای فیروبلاست گروه لیزر است.

در تحقیق حاضر تأثیر مثبت پرتوهای لیزر کم توان هلیوم - نئون با طول موج $632/8$ نانومتر و دانسیته انرژی 10mJ/cm^2 بر تکثیر سلولهای فیروبلاست و ساخت کلاژن و افزایش قطر فیریلهای شان داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و چگونگی فرآیند ساخت کلاژن دخالت شبکه آندوپلاسمیک خشن (RER) در RER تولید پروکلاژن ثابت شده است. توسعه و گسترش قابل ملاحظه در میکروگرافی‌های الکترونی گروه تحت درمان با لیزر چگونگی بلا رفتگی ساخت فیریلهای کلاژن و همچنین افزایش قطر آنها را که از لحظه آماری معنی‌دار بوده است را توجه می‌کند (۱۸، ۱۹، ۲۰).

همان طرزی که قبل اشاره شد اثرهای فوتوبیولوژیک پرتوهای لیزر کم توان در سطح سلولی با جذب فوتونها توسط مولکولها آغاز می‌شود، انرژی فوتونهای نور لیزر می‌تواند حالت ارتعاشی و شکل مولکولها را تغییر داده منجر به پاسخهای بیولوژیک گوناگون شود (۲۱). بدین ترتیب می‌توان نتیجه گیری کرد که پرتوهای لیزر کم توان هلیوم - نئون با داشتن آثار تحریکی فوتوبیولوژیکی بر واکنشاتی بیوشیمیای مؤثر در فرآیند ساخت کلاژن موجب توسعه و گسترش قابل ملاحظه RER و همچنین افزایش قطر فیریلهای کلاژن می‌شوند.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر، طرح تحقیقاتی مصوب گروه پژوهشی فیزیوتراپی جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران به شماره ۳۸۰-۱۱ است؛ لذا تویستگان بدبونی مبلغه مراتب تقدیر و تشکر خود را از این مركز بهدلیل در اختیار قرار دادن بودجه و فضای آزمایشگاهی، همکاریهای دانشگاه علوم پایه دامغان، گروه علوم تربیت دانشکده پزشکی تربیت مدرس و مدیریت و کارشناسان محترم یخش میکروسکوپ الکترونی مراسته و اکسن و سرم سازی رازی بهدلیل راهنمایی در انجام مطالعات میکروسکوپی ابراز می‌دانند.

در باره روند طبیعی ترمیم تاندون و عوامل فیزیکی مؤثر بر آن تحقیقات دنباله‌داری را انجام داده است. این داشتمد در سال ۱۹۹۲ اثر پرتوهای لیزر هلیوم - نئون با طول موج $632/8$ نانومتر و دانسیته انرژی 2mJ/cm^2 را بر وضعیت فراساختاری تاندونهای تنوتوسی شده بررسی کرد. وی معتقد است ساخت کلاژن مستلزم دو دسته وقایع است: ۱- ساخت مولکولهای پروکلاژن در داخل سلول. ۲- پلیمریزاسیون مولکولهای پروکلاژن به فیریلهای در خارج سلول. این محقق حضور فیریلهای کلاژن در داخل وزیکرهای غشادر فیروبلاستهای تاندونهای تنوتوسی شده‌ای که تحت تابش لیزر قرار داشته‌اند را مربوط به افزایش ساخت کلاژن می‌داند و اظهار داشت که افزایش ساخت پروکلاژن نسبت به انتقال آن به فضای خارج سلولی موجب حضور این فیریلهای می‌شود (۹).

الیام تاندون برخلاف سایر بافت‌های نرم که از طریق برولیفرازیون و شکلی بافت دانه‌دار است، وابسته به سه فرایند مجزا ولی مرتبط به هم می‌باشد. این سه فرایند شامل تکثیر و ازدیاد سلولی، ساخت رشته‌های کلاژن و آرایش رشته‌ها به موازات هم و در امتداد محور طولی تاندون است (۷).

در تحقیق حاضر به اثر پرتوهای لیزر کم توان هلیوم - نئون بر وضعیت فراساختاری سلول فیروبلاست و میزان ساخت کلاژن پرداخته شده است.

مقایسه کیفی میکروگرافی‌های الکترونی گروه لیزر شان دهد، سلولهای فیروبلاست دوکی شکل کشیده با سیتوپلاسم وسیع و استطاله‌های طوبیل مشخص تر از گروه کنترل است، سورفلوژی این سلولها با هسته بزرگ و بیکار و ماتین و سیتوپلاسم سرشار از شبکه آندوپلاسمیک خشن به همراه دستگاه گلزاری وسیع و وزیکرهای ترشحی فراوان‌تر در گروه تحت درمان با لیزر شاهد اوج گیری فیروبلازی است. بررسیهای میکروسکوپ الکترونی مقاطع مربوط به روز ۲۱ نشان می‌دهد که بافت فیروزی تاجه ترمیسی حاوی رشته‌های کلاژن فراوان و موازی با محور طولی تاندون هستند.

مقایسه کیفی سورفلوژی سلولهای فیروبلاست و میدانهای مقاطع عرضی کلاژن (Cross Section Area) (Cross Section Area) با توجه به میکروگرافی‌های الکترونی شان می‌دهد که فیروبلاستهای گروه لیزر با سیتوپلاسم وسیع و

References

1. Barahona JF: Study of the healing process of wounds produced by Nd-YAG laser in oral tissue. J JPN Orthop Assoc 1984; 4: 197
2. Bloom and Fawcett: Textbook of Histology published by W.B. Saunders company London, Twelf, 1995, pp 3-98
3. Cooper RR: Tendon and ligament Insertion. Bon Joint surg 1995; 52A: 1-20
4. Junquira and carneiro: Basic Histology. Appleton & Laneg, 8ed, 1995, pp 5-102
5. Lesson TS, Lesson CR, Paparo AA: Text atlas of histolgy. WB Saunders company, west washington square, sixth Edition 1988
6. Cribb AM, Scott JE: Tendon response to tensile stress and ultrastructural investigation of collagen: Proteoglycan interactions in stressed tendon. J Anat 1995; 187: 423-428
7. Enwemeka CS: Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in Regenerating Tendon: Implication for



- Tendon Rehabilitation. Physical Therapy 1989; 69: 816-825
8. Abergel RP : Biostimulation of wound Healing by Lasers: Experimental Approaches in Animal Models and in fibroblast cultures. Dermatol Surg Oncol 1987; (13): 127-133
 9. Enwemeka GS: Ultrastructural morphometry of membrane bound intracytoplasmic collagen fibrils In tendon fibroblast exposed to He:Ne laser beam. Tissue and cell 1992; 24(4): 511-523
 10. Kana JS: Effect of low-power density laser radiation on Healing of open skin wounds in rats. Arch surg 1984; 116: 293-296
 11. Mester E: Effect of laser Rays on wound healing. The American surg 1971; 122: 532-535
 12. Mester E, Mester AF, Mester A: The biomedical effects of laser application. lasers in surgery and medicine 1985; 5: 31-39
 13. Oryan A, Peyghan R, Emami MJ: The effect of activity on tendon healing. Iranian J Med Science 1993; 18(1): 13-21
 14. Tang XM, Chai BP: Effect of CO₂ laser Irradiation

- on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study. Lasers in surgery and Medicine 1986; 6: 346-352
15. Yamada K: Biological effects of low power laser Irradiation on clonal osteoblastic cells. J Jpn orthop Assoc 1991; 65: 787-799
 16. Kaneps AJ: Laser therapy in the horse: histopathologic response. Am J Vet Res 1984; 45: 581-583
 17. Karu T: Photobiology of low-power laser effects. Health Physics 1989; 56: 691-704
 18. Kreist T, Vale R: Guide book to the extracellular matrix proteins. Oxford University, New York, 1993, pp 1-93
 19. Prockop DJ, Kivirikko KI: Collagens; Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995, 64: 403-434
 20. Trygvason K: Molecular properties and diseases of collagens. Kidney Inter 1995; 47: 24-28
 21. Williams PL, Warwick R, Dayson MM: Gray's Anatomy. Churchill Livingston, 1995, pp 62-69 38ed

