مقاله تحقیقی

اثر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر ضخامت فیبریلهای کلاژن لیگامان طرفی داخلی برش خورده موش صحرایی

محمد بیات .Ph.D*، علی دلبری .M.Sc*، محمدعلی الماسیه .M.Sc*، محمد رخشان .M.D*

* مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ وصول: آذر ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۲

چکیده

هدف: بررسی اثر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر ضخامت فیبریلهای کلاژن لیگامان طرفی داخلی برش خورده مفصل زانوی موش صحرایی

مواد و روشها: در این تحقیق از ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Sprague Dawley استفاده شد. موشها به‌طور تصادفی به ۴ گروه طبیعی، شاهد، تجربی یک و تجربی دو تقسیم شدند. پس از بیهوشی عمومی و برش عرضی در لیگامان طرفی داخلی، لیزر کم توان هلیوم نئون با دانسیته انرژی $10mJ/cm^2$ به گروه تجربی یک و $1/2J/cm^2$ به گروه تجربی دو، تابانده شد. نمونه‌ها پس از پردازش به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی انتقالی مشاهده و ضخامت فیبریلهای کلاژن اندازه گرفته شد. داده‌ها به روش آنالیزواریانس بررسی آماری شدند. میکروگراف‌ها مطالعه توصیفی نیز شدند.

یافته‌ها: در مطالعه توصیفی مشاهده شد که در روز ۱۲ بررسی در گروه تجربی دو شبکه اندوپلاسما خشن نسبت به گروه شاهد گسترش زیادی دارد. محاسبات نشان داد که در روز ۱۲ بررسی ضخامت فیبریلهای کلاژن گروه تجربی دو افزایش یافته و به گروه طبیعی نزدیک شده است، هر چند اختلاف آن با گروه شاهد و تجربی یک معنی‌دار نبود. در روز ۲۱ بررسی ضخامت فیبریلهای گروه تجربی یک نسبت به گروههای شاهد و تجربی دو افزایش معنی‌داری پیدا کرد. اما اختلاف آن نسبت به گروه طبیعی معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر لیگامان طرفی داخلی برش خورده موش صحرایی موجب افزایش ضخامت فیبریلهای آن در مقایسه با گروههای شاهد و طبیعی گردید ولی اختلاف آنها معنی‌دار نبود.

واژه‌های کلیدی: لیزر کم توان هلیوم نئون، ضخامت فیبریلهای کلاژن، موش صحرایی، لیگامان طرفی داخلی

مقدمه

استفاده از لیزر کم‌توان انتخاب رایجی برای درمان برخی اختلالات عضلانی - اسکلتی است [۷-۱]. در تحقیق دیگری که نویسندگان مقاله حاضر اخیراً منتشر کرده‌اند افزایش قدرت کشش لیگامان طرفی داخلی برش خورده موش صحرایی را در پی تابش لیزر کم توان گزارش کرده‌اند [۸]. به‌منظور شناخت مکانیسم نحوه اثر لیزر کم توان لازم است که تغییرات بافت‌شناسی که در پی تابش لیزر کم توان رخ می‌دهد مشخص شود. اگر چه مطالعاتی در زمینه ارزیابی آثار لیزر کم توان روی فعالیت فیبروبلاست‌ها و کلاژن محتوی آن انجام شده است [۱۱-۹]، اما تحقیقات اندکی روی خصوصیات آناتومیک فیبریلهای کلاژن لیگامان به‌عمل آمده است [۱۲]. تحقیقات قبلی نشان داده است که در بافت اسکار کلاژن نوع یک کاهش و کلاژنهای نوع سه و پنج افزایش می‌یابد و پیوندهای عرضی غیرطبیعی می‌شوند [۱۵-۱۳]. طی ایجاد بافت اسکار، فیبریلهای کلاژن با قطر اندک، جایگزین فیبریلهای با قطر زیاد می‌شود [۱۶]. مطالعات قبلی نشان داده است که حضور فیبریلهای با قطر زیاد در بافتهای طبیعی و اسکار با استحکام آنها ارتباط دارد [۱۶-۱۷]؛ بنابراین تولید فیبریلهای کلاژن با قطر

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۷۱۹ Email:bayat_m@yahoo.com

زیاد در بافت اسکار به‌طور بالقوه می‌تواند استحکام بافت را زیاد کند [۱۸]. در همین خصوص Fung و همکاران آثار مثبت کاربرد تابش یکباره لیزر کم توان را بلافاصله بعد از ایجاد قطع عرضی در لیگامان طرفی داخلی موش صحرایی و در زمان جراحی روی خصوصیات مکانیکی و مورفولوژی اولتراساختار لیگامان در حال ترمیم و افزایش ابعاد فیبریلهای کلاژن آن نشان دادند [۱۹ و ۲۰]. اما از آنجاکه در تحقیقات فوق تابش لیزر مطابق شرایط بالینی یعنی تابش از روی پوست و در فاصله‌های زمانی در دوره بعد از ایجاد جراحت در لیگامان نبوده است، ایشان پیشنهاد کردند که تحقیقات دیگری مطابق شرایط بالینی انجام شود. از این رو هدف تحقیق حاضر بررسی اثر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون روی ضخامت فیبریلهای کلاژن لیگامان طرفی داخلی برش خورده موش صحرایی با آگاهی از آثار مثبت آن روی قدرت کشش لیگامان [۸] است.

مواد و روشها

در این تحقیق از ۳۵ سر موشهای صحرایی نر بالغ نژاد Sprague Dawley با محدوده وزنی ۳۰ ± ۲۵۰ گرم که در انستیتوپاستور ایران تکثیر شدند استفاده شد. موشها طی دوره تحقیق دسترسی آزاد به آب و خوراک موش داشتند و درون قفسهای انفرادی تمیز در یک حیوانخانه نگهداری شدند و اصول اخلاق پزشکی در مورد آنها مراعات شد.

موشها به‌طور تصادفی به چهار گروه طبیعی، شاهد، تجربی یک و تجربی دو تقسیم شدند. تعداد موشها در گروه طبیعی ۵ سر و در سایر گروهها ۱۰ سر بود. ۵ سر از موشهای هر یک از گروههای شاهد و تجربی برای دوره دوازده روزه و ۵ سر برای دوره ۲۱ روزه در نظر گرفته شدند. به منظور انجام جراحی در گروههای شاهد و تجربی، ابتدا موشها به‌وسیله تزریق داخل عضلانی کتامین هیدروکلرید (۱۰۰mg/kg) و دیازپام (۵ mg/kg) بیهوش شدند. تحت بیهوش عمومی موی سطح داخلی زانوی اندام خلفی راست تراشیده و با بتادین ضدعفونی شد. سپس به‌وسیله تیغ بیستوری نمره ۱۵ برش کوچکی در پوست و فاسیای عمقی داده شد؛ لیگامان طرفی داخلی در معرض دید قرار گرفت و قسمت میانی لیگامان کاملاً از نسوج اطراف و کپسول مفصلی آزاد شد. با تیغ بیستوری یک برش عرضی در محاذات توبرکل تیبیا به لیگامان داده شد؛ به نحوی که لیگامان کاملاً به دو قسمت مجزا تقسیم شد. سپس دو لبه لیگامان در امتداد آناتومیک خود قرار گرفت و فاسیای عمقی و پوست دوخته شد. بعد از جراحی موشها اجازه تحرک و فعالیت نامحدود داشتند. روز جراحی روز صفر محسوب شد و روز بعد روز یک و الی آخر.... در گروههای تجربی بلافاصله بعد از عمل، محل جراحی تحت تابش لیزر کم توان هلیوم نئون با طول موج ۶۳۲/۸nm و خروجی ۱۰mW و دانسیته انرژی $10mJ/cm^2$ در گروه تجربی یک و $1/2J/cm^2$ در گروه تجربی دو به‌صورت روزانه قرار گرفتند. نام دستگاه مولد لیزر IR-2000 و ساخت سازمان انرژی اتمی ایران واقع در تهران بود.

در انتهای دوره‌های بررسی موشهای گروههای شاهد و تجربی به همراه موشهای گروه طبیعی ابتدا بیهوش شدند. سپس فیکساسیون پرفیوژن با گلوتارآلدئید ۳ درصد در بافر فسفات روی موشها انجام شد. پس از آن نمونه‌برداری به‌عمل آمد. لیگامان ابتدا درون محلول گلوتارالدئید ۳ درصد فیکس و درون تتراکسید اسمیوم یک درصد فیکس ثانویه شد. نمونه‌ها درون درجات پیش‌رونده استون آبگیری شدند و با رزین درون قالبهای Beem به‌طور طولی قالبگیری شدند و به‌وسیله اولترامیکروتوم LEIKA ابتدا برشهای نازک و سپس برشهای خیلی نازک به ضخامت ۵۰ الی ۷۰ نانومتر زده شد و به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی انتقالی ZEISS EM900 تحت مشاهده قرار گرفتند و از نواحی مورد نظر میکروگراف تهیه شد. میکروگراف‌ها به‌وسیله دستگاه اسکنر به حافظه کامپیوتر شخصی پنتیوم III منتقل شد و به‌وسیله برنامه نرم‌افزاری MOTIC IMAGE 2000 حداقل قطر ۵۰۰ فیبریل در هر گروه با واحد میکرون اندازه گرفته شد. داده‌های گروهها به روش آنالیز واریانس با یکدیگر مقایسه شدند و $P<0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار با استفاده از روش Least Significant Difference گروههای دارای اختلاف معلوم شدند روی میکروگرافها مطالعه توصیفی هم به‌عمل آمد.

یافته‌ها

مطالعه توصیفی میکروگراف‌های گروهها نشان داد که در گروه تجربی دو در روز ۱۲ بررسی شبکه آندوپلاسمی خشن در مقایسه با گروه شاهد گسترش زیادی پیدا کرده است و بخش وسیعی از سیتوپلاسم را اشغال کرده است (میکروگراف شماره یک). در یکی از نمونه‌های گروه تجربی دو گسترش شبکه به حدی بود که سیتوپلاسم میان کیسه‌های شبکه به علت فشرده و تیره شدن با خود شبکه اشتباه گرفته می‌شود و میتوکندری که به‌طور معمول هیچ‌گاه درون شبکه قرار نمی‌گیرد؛ به نظر می‌رسد که در این مورد درون شبکه جای گرفته است.

میانگین و انحراف معیار ضخامت فیبریلهای کلاژن لیگامان در روز ۱۲ بررسی در جدول یک ارایه شده است و محاسبات آماری نشان داد که بین گروه طبیعی با گروههای تجربی یک (P=0.009) و شاهد (P=0.015) اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. محاسبات آماری نشان داد که در روز ۲۱ بررسی بین گروه تجربی یک با گروههای شاهد (P=0.002) و تجربی دو (P=0.002)، شاهد و طبیعی (P=0.014) اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

مقایسه روزها به روش Student t test در هر یک از گروهها نشان‌دار که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری بین دو روز مورد بررسی وجود ندارد.

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار ضخامت فیبریلهای کلاژن لیگامان طرفی داخلی برش خورده موش صحرایی گروههای تحقیق با واحد میکرون و مقایسه آنها به روش آنالیز واریانس

گروه / روز	طبیعی	شاهد	تجربی یک	تجربی دو
۱۲	۹۴/۷۶±۲۸/۱	۵۵/۵۲±۱۶/۱۶	۴۹/۶۷±۱۶/۳	۷۱/۳۲±۲۵/۷۹
۲۱	۹۴/۷۶±۲۸/۱	۴۵/۳۱±۵/۴۵	۱۱۲/۰۵±۳۱/۳۷	۶۶/۶۹±۲۹/۱۴

در روز ۱۲ بررسی بین گروههای تجربی یک و طبیعی (P=0.009)، و گروه شاهد و طبیعی (P=0.015) اختلاف وجود دارد. در روز ۲۱ بررسی بین گروههای تجربی (P=0.023)، گروه تجربی یک و شاهد (P=0.002) و گروه شاهد و طبیعی (P=0.014) اختلاف وجود دارد. مقایسه روزها به روش Student t test در هر یک از گروهها نشان داد که هیچ‌گونه اختلاف آماری بین روزها در گروههای مورد بررسی وجود ندارد.

بحث

اختلاف ضخامت فیبریلهای گروه طبیعی تحقیق حاضر با گروههای شاهد و تجربی یک در روز ۱۲ بررسی در حد معنی‌داری است. اما با توجه به اینکه ضخامت فیبریلهای گروه تجربی دو در این روز افزایش یافته است بین گروه طبیعی و گروه تجربی دو اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ولی اختلاف بین ضخامت فیبریل‌های گروه تجربی دو و گروه شاهد هم از نظر آماری معنی‌دار نیست که این نشان‌دهنده فقدان تأثیر مثبت و معنی‌دار آماری تابش لیزر کم توان هلیوم - نئون با دوز $1/2J/cm^2$ روی افزایش ضخامت فیبریلهای لیگامان در حال ترمیم است. از تلفیق نتایج تحقیق حاضر با نتایج آزمایشهای بیومکانیکی که در تحقیق قبلی [۸] به‌دست آمد، چنین نتیجه گرفته می‌شود که مشاهده قدرت کشش بالاتر در گروه تجربی دو در روز ۱۲ بررسی تحقیق حاضر به‌دلیل وجود فیبریلهای کلاژن با قطر بیشتر نیست بلکه احتمالاً عوامل دیگری هم نظیر پیوندهای عرضی کلاژن و میزان محتوی تام کلاژن و کلاژن محلول و غیر محلول یا کیفیت مولکول‌های کلاژن [۲۰] در این خصوص نقش دارند. این نظریه می‌تواند در مورد مشاهده فیبریلهای کلاژن با قطر بیشتر در گروه تجربی یک در روز ۲۱ بررسی تحقیق حاضر با وجود قدرت کشش پایین‌تر این گروه نسبت به سایر گروهها صدق کند. در همین خصوص می‌توان به نظریه Frank و همکاران اشاره نمود که نسبت مستقیمی بین کاهش ویژگی‌های بیومکانیکی لیگامان طرفی داخل در حال التیام و تعداد پیوندهای عرضی کلاژن و کاهش حجم و قطر فیبرهای کلاژن وجود دارد [۲۱] که انجام تحقیقات مولکولی و بیوشیمیایی آتی جزئیات بیشتری را روشن خواهد کرد. کاهش ضخامت فیبریلهای کلاژن در گروههای شاهد و تجربی در روز ۲۱ بررسی نسبت به روز ۱۲ آن می‌تواند نشانه بلوغ (remodling) فیبریلهای کلاژن در این گروهها باشد.

Fung و همکاران تأثیر لیزر کم توان گالیوم آلومنیوم آرسناید را

روی مورفولوژی و فراساختاری لیگامان طرفی داخلی در حال ترمیم بررسی کردند [۲۰]. آنها تفاوت معنی‌داری در قطر فیبریلهای لیگامان گروههای تحقیق خود مشاهده کردند و افزایش معنی‌دار قطر فیبریلها را تحت تأثیر تابش لیزر گزارش کردند که دلایل احتمالی این افزایش معنی‌دار ممکن است در دوز بیشتر لیزر $15/6J/cm^2$ در مقابل $31/6J/cm^2$ و $26/4J/cm^2$ در مقابل $63/2J/cm^2$ و تابش مستقیم لیزر به نسج لیگامان باشد [۲۰].

تابش لیزر کم توان هلیوم نئون به لیگامان طرفی داخل برش خورده موش صحرایی ضخامت فیبریلهای آن را افزایش داد اما موجب بروز تغییرات مثبت آماری در مقایسه با گروههای شاهد و طبیعی نشد که دلیل احتمالی آن ممکن است دوز کم لیزر کم توان مورد استفاده باشد.

در پایان انجام تحقیقات بعدی با دوزهای بالاتر لیزر کم‌توان پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است و برنامه نرم‌افزاری MOTIC با راهنمای هیئت علمی محترم دانشگاه بقیةا... آقای دکتر صدرایی تهیه شد. بدینوسیله مراتب قدردانی و تشکر نویسندگان مقاله از همه ایشان اعلام می‌گردد.

References

1. **Amano A, Miyagi K, Azuma T, Ishihara Y, Katsube S, Aoyama I, Saito I.** Histological studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. Lasers Surg Med. 1994; 15: 290-294
2. **Basford JR, Hallman HD, Sheffield CG, Mackey GL.** Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy laser, and occlusion in wound healing in a swine model. Arch Phys Med Rehabil. 1986; 67: 151-154
3. **Gogia PP.** Physical therapy modalities for wound management. Ostomy wound manage. 1996; 42: 46-48
4. **Johannsen F, Hauschild B, Remvig L, Johnsen V, Petersen M, Breler T.** Low energy laser therapy in rheumatoid arthitis. Scand J Rheumatol. 1994; 23: 145-147
5. **Mester E, Mester AF, Mester A.** The biomedical effects of laser applccation. Lasers Surg Med. 1985; 5: 31-39
6. **Minor MA, Sanfod MK.** The role of physical therapy and physical modalities in pain management. Rheum Dis Clin N Am. 1998; 25: 233-248
7. **Nemeth AJ.** Laser and wound healing. Dermatol Clin. 1993; 11: 783-789
8. **دلبری علی، بیات محمد، الماسیه محمدعلی، رضایی فاطمه‌السادات.** تأثیر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر التیام لیگامان طرفی داخلی قطع شده زانوی موش صحرایی. مجله علوم تشریح ایران. سال ۱۳۸۲، شماره ۳، صفحات ۲۰-۱۵
9. **Enwemeka CS.** Ultrastructural morphometry of membrane bound interacytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to He:Ne laser beam. Tissue Cell. 1992; 24: 511-523
10. **Hrnjak M, Kuljic-Kapulical N, Budisin A, Giser A.** Stimulatory effect of low-power density He-Ne laser radiation on human fibroblasts in vitro. Vojnosanit Pregl. 1995; 52: 539-546
11. **Reddy GK, Stenno-Bittel L, Enwemeka CS.** Laser photostimultion of collagen production in healing rabbit Achilles tendon. Lasers Surg Med. 1998; 22: 281-287
12. **Enwemekn CS, Rodriquez OO, Gall NG, Walsh NE.** Morphometrics of corllagen fibril population in He:Ne laser photo-stimulated tendon. J Clin Laser Med Surg. 1990; 8: 151-156
13. **Franck C, Bray RC, Hart DA, Shrive NG, Loitz BJ, Matyas JR, Wilson JE.** Soft tissue healing in Fo HH, Harner CD, Vince KG (Eds). Williams and Wilkins, Baltimore, 1994, p. 189
14. **Franck C, McDonald D, Wilson J, Eyre D, Shrive W.** Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline cross link density. J Orthop Res. 1995; 13: 157-165

15. **Kavalkovich KW, Yamaji T, Woo SL-Y, Niyibizi C.** Type V collagen levels are elevated following MCL injury and in long term healing. Trans Orthop Res Society. 1997; 22: 485

16. **Franck C, McDonnel D, Shrive N.** Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament Scar: a longer term assessment. Connect Tissue Res. 1997; 36: 261-269

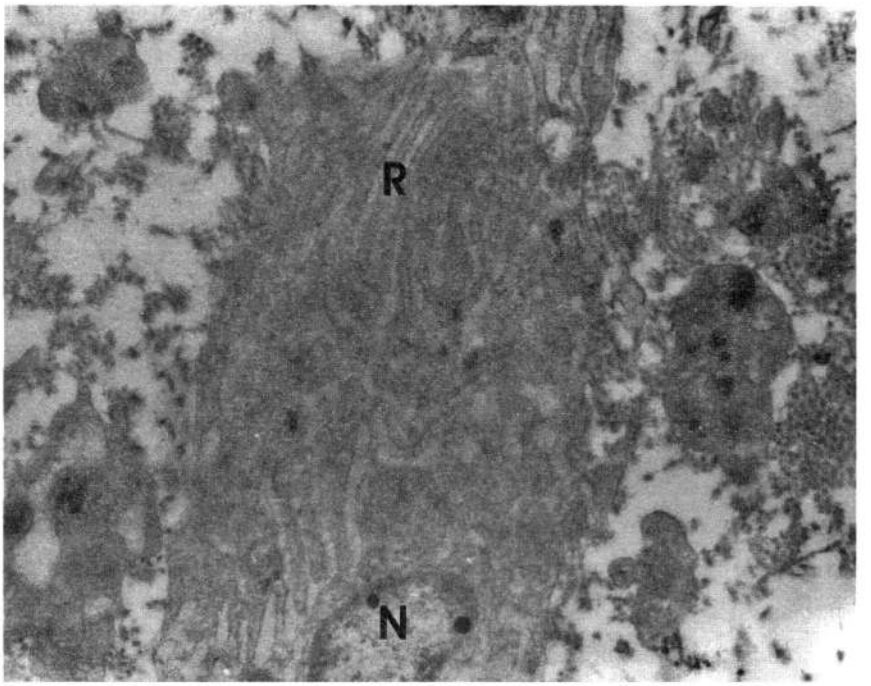
17. **Dollin CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH.** Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. Collagen Rel Res. 1985; 4: 481-492

18. **Parry DA, Barnes GR, Craig AS.** A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissue as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. Proc R Soc London [Biol]. 1978; 203: 305-321

19. **Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, Kaneda Y, Shrive NG, Marchuk LL, Shino K, Ochi T, Cyril BC.** Decorin antisence gene therapy improved functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. J Orthop Res. 2000; 18: 517-523

20. **Fung DTC, Ng GYF, Leung MCP, Tay DKC.** Therapeuti clow energy laser improves the mechanical strength of repairing medial collateral ligament. Lasers Surg Med. 2002; 31: 91-96

21. **Fung DTC, Ng GYF, Leung MCP, Tay DKC.** Effect of a therapeutic laser on the ultrastructure morphology of repairing medial collateral ligament in a rat model. Lasers Surg Med. 2003; 32: 286-293



شکل ۱. مقطع خیلی نازک یک فیبروبلاست لیگامان طرفی داخلی در حال ترمیم در کروه تجربی دو، دوازده روز بعد از ایجاد جراحت. شبکه اندوپلاسمی خشن (R) ، هسته (N) ، بزرگنمایی: ۱۲۰۰۰ ×

شکل ۲. مقطع خیلی نازک یک فیبروبلاست لیگامان طرفی داخلی در حال ترمیم در گروه شاهد، دوازده روز بعد از ایجاد جراحت. شبکه اندوپلاسمی خشن (R) ، هسته (N) ، بزرگنمایی: ۱۲۰۰۰ ×