

# استفاده از روش ترکیب طیف‌سنجی فروشکست القای لیزری و جرقه الکتریکی به منظور مطالعه‌ی بافت‌های سالم و سرطانی معده

آیدا سیفعلی‌نژاد<sup>۱\*</sup>، مریم بحرینی<sup>۱</sup>، محمدمهدی حسنی‌متین<sup>۲</sup> و سیدحسن توسلی<sup>۱</sup>

## چکیده

در این مقاله به مطالعه آزمایشگاهی برای یافتن امکان تشخیص بافت معده‌ی سرطانی از سالم با استفاده از روش طیف‌سنجی فروشکست القایی ترکیب شده با جرقه الکتریکی پرداخته شده است. در این آزمایش‌ها تپ‌های لیزر با انرژی کم قسمتی از نمونه را کنده و جرقه الکتریکی توده‌ی کنده شده را برای تابش نور پلاسما تحریک می‌کند. از بافت‌های معده دو فرد مبتلا به سرطان در آزمایش‌ها استفاده شده است. نتایج بدست آمده از آزمایش‌ها تفاوت چشم‌گیر شدت خط طیفی عنصر کلسیم نرمالیزه شده در طیف‌های بافت سالم و بافت سرطان را نشان می‌دهد. این تفاوت ناشی از افزایش عنصر کلسیم در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم است. می‌توان نتیجه گرفت که مقادیر شدت نسبی خطوط کلسیم در طیف‌های طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری بافت سرطانی در مقایسه با بافت سالم می‌تواند امکان دسته‌بندی بافت‌های سالم و سرطانی را فراهم کند. لازم به ذکر است که تعداد نمونه‌هایی که در این پژوهش استفاده شده‌اند برای نتیجه‌گیری قطعی کافی نیستند و باید تحقیقات بیشتری برای تعمیم این ایده صورت بگیرد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان معده، تپ لیزری، تفاوت چشمگیر شدت طیفی.

## مقدمه

طولانی و نمونه‌برداری است. بدلیل مزایای بسیار روش‌های اپتیکی، امروزه کاربرد روش‌های طیف‌سنجی اپتیکی در حوزه‌های مختلف پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله این روش‌ها که برای تشخیص سرطان مورد توجه هستند می‌توان به روش‌های طیف-

روش‌های رایجی که امروزه در آزمایشگاه‌ها برای تشخیص انواع سرطان وجود دارد، نیازمند صرف زمان

۱ پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران

۲ دانشگاه ولیعصر، رفسنجان

باتوجه به اینکه در روش نامبرده شده می‌توان با کندگی کم از نمونه طیف گسیلی قوی بدست آورد، در این مطالعه از روش ترکیب فروشکست القایی لیزری و جرقه الکتریکی برای مقایسه طیفی و یافتن رابطه بین شدت عناصر موجود در بافت‌های سالم و سرطانی معده مربوط به دو فرد بهره گرفته شده است.

### مواد و روش‌ها

در این بخش نمونه‌های آزمایش و چیدمان تجربی استفاده شده در این پژوهش را معرفی می‌کنیم.

### نمونه‌های بافت

نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش بافت‌های معده انسانی می‌باشند. از آنجا که بافت مورد آزمایش بافتی نرم می‌باشد باید طبق روشی استاندارد طی انجام مراحل آن را بلوکه کرده و به اندازه‌ی مورد نظر برش داد.

این کار با انجام این مراحل امکان پذیر است: درابتدا بافت در محلول فرمالین بافری تثبیت می‌شود. سپس در دستگاه پردازش نمونه قرار داده می‌شود که در این مرحله به ترتیب در ظرف‌هایی قرار می‌گیرد که عبارتند از: ۱- فرمالین ۲- الکل (که از ۷۰٪ تا ۱۰۰٪ تغییر می‌کند و به تدریج آبیگری صورت می‌گیرد) ۳- گریل ۴- پارافین ۵- الکل. پس از انجام این مراحل بلوکه شده و توسط میکروتوم‌های مخصوص به ابعاد ۲۰×۱۰ میلی‌متر مربع و ضخامت ۲ میلی‌متر برش داده می‌شود و از نمونه روی لام طیف‌گیری انجام می‌گیرد. نحوه‌ی انجام این مراحل در شکل ۱ قابل مشاهده است.

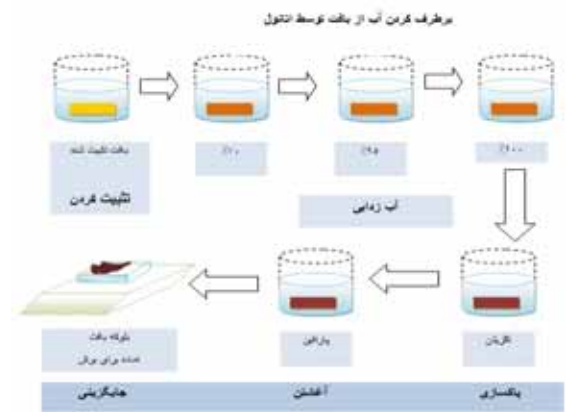
سنجی رامان، طیف‌سنجی فلورسانس و به‌تازگی روش طیف‌سنجی فروشکست القای لیزری<sup>۱</sup> اشاره کرد.

روش طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری یک روش تحلیل چندعنصری بر اساس گسیل طیفی می‌باشد که در سال‌های اخیر برای آنالیز بافت‌های مختلف از قبیل بافت‌های سختی از جمله ناخن [۱] و بافت‌های نرمی مثل بافت‌های سینه و روده [۲] به کار رفته است. مزیت این روش به‌عنوان یک روش تحلیل چندعنصری، سریع، نیازمند به آماده‌سازی کم برای نمونه‌های زیستی می‌باشد. باید در نظر داشت هنگامی که روش طیف‌سنجی فروشکست القای لیزری به‌تنهایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، در صورتی که از انرژی‌های پایین استفاده گردد، طیفی مشاهده نمی‌شود. همچنین در این روش افزایش انرژی لیزر تخریب شدید نمونه را در پی دارد، به‌طوری که بعد از برخورد چند تپ، نمونه به‌طور کامل تخریب می‌شود.

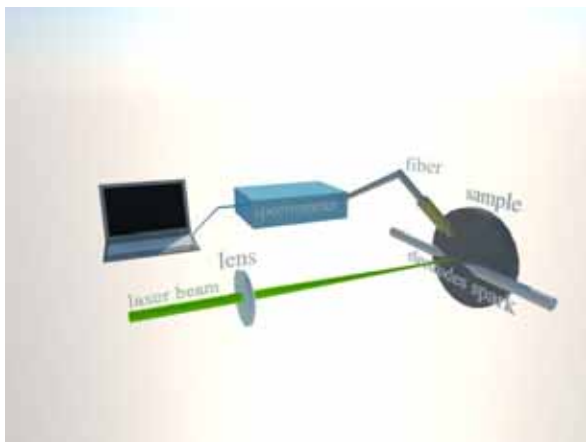
استفاده از جرقه الکتریکی همراه با روش طیف‌سنجی فروشکست القایی لیزری<sup>۲</sup> باعث تقویت سیگنال‌های طیفی می‌شود [۳]. در صورتی که جرقه الکتریکی فقط به پلاسمای ایجاد شده اصابت کند بدون زیاد کردن حجم کندگی از نمونه، این تقویت را ایجاد می‌کند. بنابراین استفاده از این روش باعث می‌شود تا با پایین آوردن انرژی لیزر برخوردی به نمونه قادر به مشاهده‌ی طیف‌های قابل‌قبولی باشیم که تخریب نمونه را کاهش می‌دهد.

1 Laser induced breakdown spectroscopy  
2 Spark discharge assisted laser induced breakdown spectroscopy

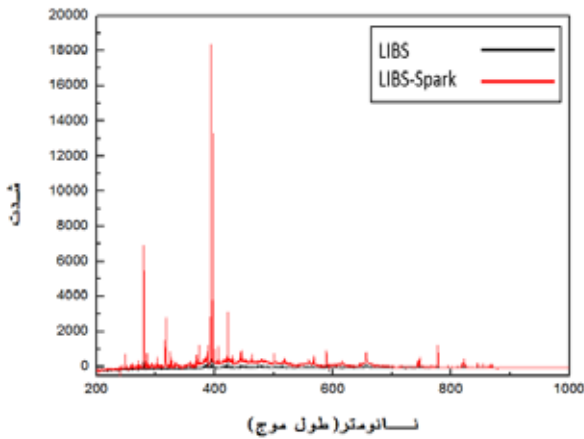
به منظور اندازه‌گیری‌های زمانی مجهز شده است. دوربین توسط یک مولد تاخیر یک میکرو ثانیه بعد از شروع پلاسما شروع به کار کرده و هر طیف در زمان ۲۰ میکروثانیه ثبت می‌شود. نمونه‌ها در صفحه عمود نسبت به جهت لیزر توسط یک پایه متحرک XYZ حرکت داده شده‌اند. در این آزمایش طیف‌هایی از نقاط مختلف هر نمونه گرفته شده است.



شکل ۱: مراحل آماده سازی نمونه



شکل ۲: چیدمان آزمایش



شکل ۳: مقایسه طیف‌های به دست آمده از دو روش فروشکست القایی لیزری و همراه جرقه الکتریکی و فروشکست القایی لیزری

### روش تجربی

چیدمان مورد استفاده در این آزمایش برای آنالیز نمونه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. در این روش از یک لیزر Nd:YAG با طول موج اصلی ۱۰۶۴ نانومتر و پهنای زمانی تپ ۶ نانوثانیه با انرژی ۳۰ میلی ژول بر تپ با نرخ تکرار ۱ هرتز برای ایجاد پلاسما روی نمونه استفاده شده است. تپ‌های لیزر توسط یک عدسی با فاصله کانونی ۱۷ سانتی متر روی سطح نمونه بافت معدنه متمرکز شده‌اند. پلاسمای حاصل از نمونه بین دو الکتروده که نسبت به هم ۶ میلی‌متر و محور افقی الکترودها نسبت به سطح نمونه ۱/۵ میلی‌متر فاصله دارند، ایجاد می‌گردد. همزمان با تشکیل پلاسما جرقه‌ی الکتریکی با انرژی ۳ ژول روی آن اعمال شده است که باعث گرم کردن آن و در نتیجه تقویت سیگنال می‌گردد. پس از آن تابش پلاسما توسط یک فیبر اپتیکی که نسبت به جهت پرتو لیزر زاویه ۴۵ درجه می‌سازد و در فاصله ۱۷ میلی‌متری نسبت به پلاسما قرار دارد، وارد یک طیف سنج اشل با قدرت تفکیک پذیری طیف سنج ۰/۰۲ نانومتر می‌شود. طیف‌سنج به یک دوربین ICDD

## نتایج و بحث

در این پژوهش از روش فروشکست القایی لیزری همراه با جرقه الکتریکی استفاده شده است و در شکل ۳ تفاوت طیف به دست آمده از این روش (طیف قرمز رنگ) و روش فروشکست القایی لیزری به تنهایی (طیف مشکی رنگ) با انرژی های لیزر یکسان نشان داده شده است.

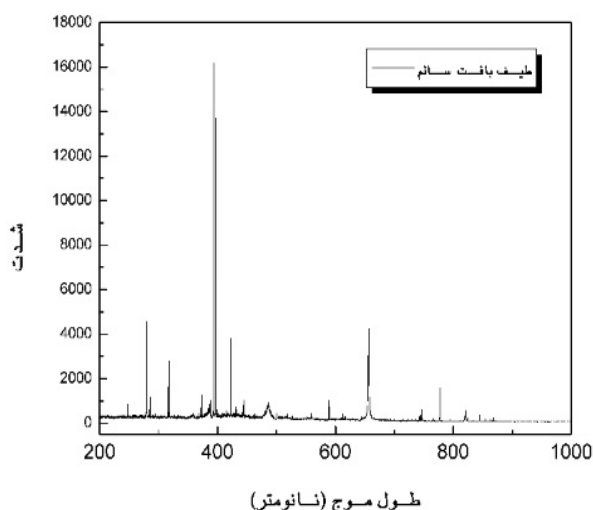
همانطور که در شکل نمایان است طیف قرمز رنگ دارای شدت بیشتری نسبت به طیف مشکی رنگ می باشد که تقویت سیگنال در این حالت به وضوح قابل مشاهده است. همچنین تعداد خطوط قابل تشخیص و مشاهده مربوط به عناصر مختلف در طیف قرمز رنگ از طیف مشکی رنگ بیشتر است. لذا استفاده از روش فروشکست القایی لیزری و جرقه الکتریکی برای انرژی های کم لیزر علاوه بر اینکه آسیب کمتری به بافت اعمال می کند، طیف بهتری را نیز نتیجه می دهد.

همچنین در این مطالعه ۱۸۰ طیف از ۲ بیمار تهیه شده است که ۴۵ طیف مربوط به بافت سالم و ۴۵ طیف مربوط به بافت سرطانی قسمتهای مختلف از بافت معده ی هر بیمار می باشند.

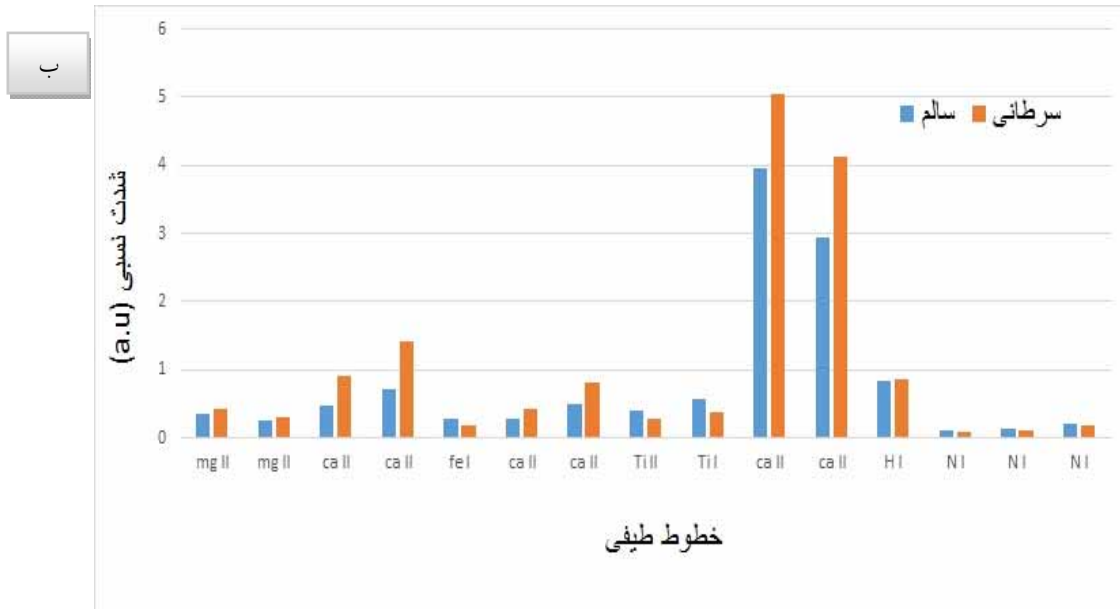
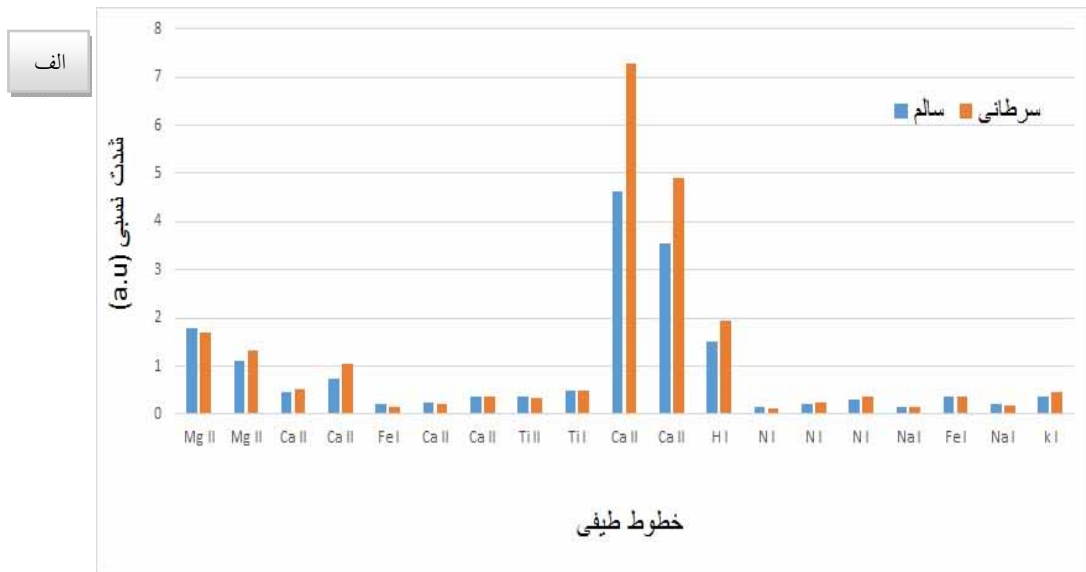
در شکل ۴ طیف نوعی بدست آمده از بافت معده توسط این روش مشاهده می شود. در طیف به دست آمده بافت معده عناصر کلسیم، منیزیم، سدیم، پتاسیم، آهن، هیدروژن، اکسیژن، نیتروژن، تیتانیوم و کربن آشکار شده است. طیف های بدست آمده از بافت سالم و سرطانی در تمامی موارد از نظر کیفی مشابه می باشد و تفاوت بین آنها در اختلاف شدت بین برخی عناصر مشخص شده در طیف هاست.

در شکل ۵ شدت های نسبی عناصر موجود در بافت های سالم و سرطانی مورد مقایسه قرار گرفته اند. منظور از شدت نسبی تقسیم هر کدام از خطوط بر خط طیفی مربوط به عنصر کربن با طول موج ۲۴۷.۸ nm می باشد. در واقع به منظور یافتن اثری از رابطه بین ترکیبات عنصری بافت و بیماری سرطان تمامی شدت های عناصر موجود در بافت بر شدت خط عنصر کربن نرمالیزه شده است [۴ و ۵].

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود، مقایسه ی عناصر موجود در بافت های مختلف نشان می دهد که در دو بیمار مورد مطالعه، شدت نسبی خط کلسیم با طول موج ۳۱۵/۹۲ نانومتر و ۳۱۷/۹۶ نانومتر و ۳۹۳/۳۲ نانومتر و ۳۹۶/۸۰ نانومتر در بافت های سرطانی نسبت به بافت سالم بیشتر است. دلیل انتخاب این چهار خط کلسیم برای تشخیص بافت سرطانی از بافت سالم، شدت طیفی زیاد این خطوط، عدم تداخل این چهار خط با دیگر خطوط و تفکیک طیفی بهتر این چهار خط نسبت به دیگر خطوط کلسیم می باشد.



شکل ۴ : طیف تابشی بافت معده



شکل ۵: نمودار ستونی مقایسه شدت‌های نسبی خطوط طیفی بافت‌های سالم و سرطانی عناصر مختلف: الف) بیمار اول و ب) بیمار دوم

طیف های سالم در این طول موج ها بیشتر است. لازم به ذکر است نتایج بدست آمده با نمودارهای ستونی در توافق می باشد. بنابراین می توان افزایش شدت خطوط کلسیم در بافت های سرطانی نسبت به بافت های سالم را شناسه ای برای تشخیص بافت معده سالم از سرطانی در نظر گرفت.

علاوه بر نمودارهای ستونی، برای بررسی بهتر و دقیق تر، خطوط میانگین مربوط به تمامی طیف های سالم و طیف های سرطانی بیمار در چهار طول موج مربوط به عنصر کلسیم در شکل ۶ با یکدیگر مقایسه شده اند. همانطور که در شکل مشخص می باشد، شدت میانگین مربوط به طیف های سرطانی از شدت میانگین مربوط به

سرطان پروستات در آقایان و سرطان سینه در خانمها می‌باشد [۶].

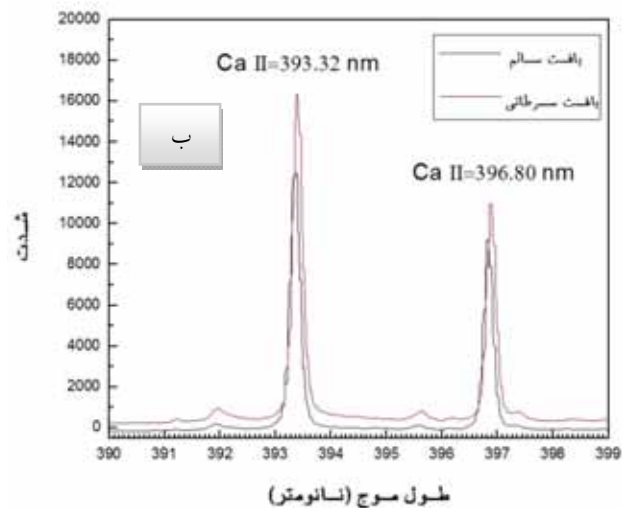
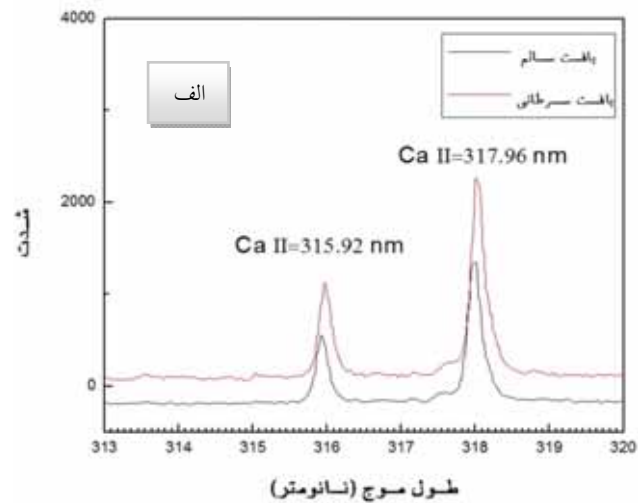
با توجه به نتایج بدست‌آمده، هرگونه ناهنجاری در غلظت کلسیم بافت می‌تواند اطلاعاتی در مورد وضعیت بافت بدهد. بطوری‌که با افزایش غلظت کلسیم در بافت احتمال وجود سرطان در بافت بیشتر است.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه ترکیب روش طیف‌سنجی فروشکست القای لیزری با جرقه الکتریکی به منظور تشخیص بافت سالم و سرطانی معده با بررسی طیف‌های این نمونه‌ها و مقایسه شدت خطوط طیفی عناصر موجود در آنها مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به شدت نسبی بیشتر عنصر کلسیم در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم، نتایج مثبتی برای تشخیص این ۲ نوع بافت از یکدیگر به دست آمده است. در نمونه‌های سرطانی، شدت کلسیم بطور قابل توجهی از نمونه‌های سالم بیشتر است که این اطلاعات می‌تواند رهیافت مناسبی برای تشخیص سرطان باشد. هرچند تعداد نمونه‌هایی که در این پژوهش استفاده شده‌اند برای نتیجه‌گیری قطعی کافی نیستند و باید تحقیقات بیشتری برای تعمیم این ایده صورت بگیرد.

### سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر نادر امامی رضوی عضو موسسه سرطان بیمارستان امام‌خمينی که نمونه‌های مورد نیاز برای آزمایش‌ها را در اختیار ما گذاشته‌اند صمیمانه تشکر می‌نمائیم.



شکل ۶: الف) و ب): نمودارهای مقایسه شدت‌های میانگین طیف‌های سرطانی و طیف‌های سالم بیمار برای چهار طول موج کلسیم.

این تفاوت در شدت نسبی خط کلسیم در مقاله‌های مشابه دیگر گزارش شده است [۲]. همچنین این مطلب در مطالعات بیولوژیکی که توسط محققان صورت گرفته نیز مورد تایید قرار گرفته است.

این تحقیقات نشان می‌دهد مصرف بالای کلسیم در تغذیه روزانه عامل بروز بسیاری از سرطان‌ها از جمله

مرجع‌ها

- [1] M. Bahreini, B. Ashrafkhani, and S. H. Tavassoli, *J. Biomed. Opt.* **18** (2013) 107006.
- [2] A. El-Hussein , A. K. Kassem , H. Ismail , M. A. Harith , *Talanta* **82** (2010) 495-501
- [3] O. Ayed Nassef, Hani E. Elsayed-Ali \* *Spectrochimica Acta Part B* **60** (2005) 1564 – 1572.
- [4] H. Imam, R. Mohamed, A. A. Eldakrouri, *Optics and Photonics Journal* **2** (2012) 193-199.
- [5] S. I. Miziolek AW, Palleschi V, “*Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamentals and applications.*” Cambridge: Cambridge University Press, (2006).
- [6] C. Rodriguez, M.L. McCullough, A.M. Mondul, E.J. Jacobs, D. Fakhrabadi Shokoohi, E.L. Giovannucci, M.J. Thun, E.E. Calle, *Cancer Epidemiol. Biomed.Prev.* **12** (2003) 597.