مجله مهندسی پزشکی زیستی، دوره اول (جدید)، شماره اول، بهار ۱۳۸۶، ۱۹- ۲۸

چسبندگي باكتري اشرشياكلي در شرايط آزمايشگاهي به سطح پلي‌اتيلن‌ترفتالات تابش‌ديده با ليزرهاي دي‌اكسيدكربن و كريپتون‌فلوئورايد

روحا مهدي‌نواز افدم[۱]، حميد ميرزاده[۲،۳*]، مرتضي دليري[۴]، عليرضا زارع[۵]

[۱] دانشكده مهندسي پزشكي، دانشگاه صنعتي اميركبير

[۲] دانشكده مهندسي پليمر، دانشگاه صنعتي اميركبير

[۳] پژوهشگاه پليمر و پتروشيمي ايران

[۴] مركز تحقيقات مهندسي ژنتيك و بيوتكنولوژي

[۵] پژوهشگاه ليزر، سازمان انرژی اتمی ایران

چكيده

اخيراً مطالعاتي در زمينه توسعه روش‌هاي جديد براي افزايش چسبندگي باكتريـايي روي سـطوح پليمـري وجـود دارد كـه در كاربردهاي بيولوژيكي از جمله بيوسنسورهاي پايه سلولي استفاده مي‌شوند. در اين مطالعه، سطح فيلم پلي‌اتيلن‌ترفتالات (PET) در معرض نور ليزرهاي اكسايمر كريپتون فلوئورايد (KrF) و دی‌اكسيدكربن (CO_2) ضـربه‌اي قرار گرفت و رفتـار چـسبندگي باكتري اشرشياكلي (E-coli K-12) روي سطوح پرتودهي‌شده در شرايط آزمايشگاهي (*in vitro*) بررسي شد. تغييرات خـواص سطح PET حاصل از پرتودهي ليـزر، توسط ميكروسكوپ الكتروني روبشي (SEM) و اندازه‌گيري زاويه تماس مـشخص شـد. نتايج نشان دادكه آمايش ليزري باعث تغيير مورفولوژي و همچنين آبدوستي سطح PET مي‌شود. تعداد باكتري‌هاي E-coli K-12 كـه به سطح PET چسبيده بودند به طور كمي توسط رنگ‌آميزي فلورسنت، مشاهدات ميكروسـكوپي و شـمارش از طريـق نـرم‌افـزار Image Proplus بررسي شد. نتايج نشان داد كه تعداد باكتري‌هاي E-coli K-12 چسبيده به سطوح پرتودهي‌شـده بـا ليزرهـاي كريپتون‌فلوئوريد و دی‌اكسيدكربن در مقايسه با سطوح اصلاح نشده افزايش يافت.

واژه‌های كليدی: ليزر كريپتون‌فلوئوريد؛ ليزر دی‌اكسيدكربن؛ آمايش ليزري؛ پلي‌اتيلن‌ترفتالات؛ چسبندگي باكتريايي

* عهده‌دار مكاتبات

نشانی: تهران، كيلومتر ۱۵ بزرگراه تهران- كرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه پليمر و پتروشيمی ايران

تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۰۲۰، **پيام‌نگار:** h.mirzadeh@ippi.ac.ir

۱- مقدمه

با پيشرفـت تكنولوژي نياز به موادي با برهم‌كنش سـلولي قابـل پيش‌بيني افـزايش يافتـه اسـت. در حـال حاضـر در پزشكي گرايش به سمت موادي است كه نه تنها پاسخ‌هاي منفـي جسم خارجي را ايجاد نكند بلكـه بـه طـور بالفعـل چسبندگي سلول‌ها به بستر را نيز شدت بخشد [۱].

اخيـراً مطالعـاتي در زمينه توسعـه روش‌هاي جـديد براي افزايش چسبندگي باكتـريايي روي سطـوح پليمري وجـود دارد كه در كاربردهـاي بيولوژيكي از جمله بيوسنسورهاي پايه سلولي استفاده مي‌شوند [۳،۲]. پاسخ محيطي معين بـه وسيله بـرهم‌كنـش سلـول- پليمـر، مهمترين معيار بـراي كاربرد مواد پليمري جديد در محيط‌هاي بيولوژيكي است. بـرهم‌كنـش‌هاي سلـول- پليمر اغلب به وسيله انرژي آزاد سطـح بستر، شـيمي سطـح و توپوگرافـي سـطح متـأثر مي‌شوند. بـررسی تغييرات اين خـواص از طـريق آمـايش سطـح بـه عنـوان روش عمـومي بـراي بـه دسـت آوردن برهم‌كنش سلولي مطلوب در نظـر گرفته می‌شود [۴]. اكثر تحقيقات براي پيش‌بينی و اصـلاح چسبندگي سلـول‌ها يـا باكتري به سطـوح پليمري، از طريق انتخاب ماده يا سلول، اصـلاح شيمي يا بـافت سطـح، دمـا و اصـلاح سـايـر خصوصيات سطح پليمر انجام شده است [۴]. خصوصيات آبدوستي يا آبگـريزي ديواره سلـولي از اين نظـر كه روي چسبندگي آن به سطـح تأثير مي‌گذارد حائز اهميت بوده و بنابر اين مي‌تواند يك فاكتور مهم در انتخاب مـواد بـراي محيط‌هاي بيولوژيكي باشد [۵]. بـراي مثـال، چـسبندگي خوب سلول‌هاي اندوتلیال انسان [۶] و فيبروبلاست‌ها [۷] روي سطـوح پليمري آبـدوست مشـاهـده شـده است. در حـالي كه طبـق مطالعـات انجـام شـده روي يك لاستيك اتيلـن- پـروپيلـن پيـونـدخـورده بـا آكريـل‌آميـد و ۲- هيـدروكسي اتيـل‌متـاكـريلات توسـط ليـزر، بـا افـزايش آبدوستـي چسبندگـي ماكـروفاژها كاهش می‌يابـد [۸]. بـه منظور پيشگويـی رفتار چسبندگي باكتـري يا سلـول بايـد تمام جنبه‌هاي سطـح از جمله آبدوستي، زبري، سـميت و اثرات محيط در نظر گرفته شود.

امـروزه نور ليزر به علت نداشتن اثر سـوء بر تـوده پليمـر بيشتر از منابع ديگر براي اصلاح سطح پليمرها به كار برده مي‌شـود. تغييرات حاصـل از پرتو ليـزر محـدود به سـطح پليمر است و خسارت احتمالي بـه تـوده پليمـر نسبت بـه پرتوهاي گاما و الكتروني بـه حـداقل مي‌رسـد و خـواص مكانيكي پليمرها حفـظ مي‌شـود [۹-۱۱]. بـا تـوجـه بـه مطالعـات انجام شده در زمينه بهينه‌سازي فيلم‌هاي پليمري با ليزر مشخص شـده است كه كندگي حاصل از پرتو ليزر بـا تغييرات شيميايـي و فيـزيكي سطـح و ايجـاد گروه‌هـاي عاملي جديد همراه است [۱۲-۱۴] و ساختـار منظمي كه در نواحـي تابش ديده ايجـاد مي‌گردد باعـث بهبـود زيـست-سازگاري پليمر مي‌شـود. مطالعـات اخير نشان مي‌دهند كه سلول‌هاي حياتـي نسبت بـه خـواص شيميايي و فيـزيكي حساسنـد و مورفـولـوژي سطـح پليمر و گروه‌هاي عاملي روي آن بـر چسبندگـي، رشد و جهـت‌گيـري سلـول‌هاي حيـاتي تأثيرگذار بـوده و مي‌تواننـد باعـث تغيير زيـست-سازگاري پليمر شوند [۱۵،۱۳].

تحقيقات انجـام شده درمورد پلي‌اتيلن‌ترفتالات نـشان داده است كه ساختـار سطـح اين پليمر بعد از قـرار گـرفتن در معرض پرتو ليـزرهای اكسايمر و دی‌اكسيدكربن از حالـت كريستالي به حالت آمورف تغيير مي‌كند [۱۷،۱۶]. همچنين در مطالعـه ديگر توسط دادستان و همكاران نشان داده شد پـرتـو ليـزر بـاعـث بـرخـي تغييـرات در مورفـولـوژي، ترشوندگي، كريستالينيتي و تركيب شـيميايي سـطح پلـي-اتيلن‌ترفتالات مي‌شود. اثر ايـن تغييـرات روي چـسبندگي پلاكت‌ها و فيبروبلاست‌ها به سطـح پلي‌اتيلـن‌ترفتـالات بررسي شده است [۱۸، ۱۹]. همچنين ميرزاده و همكـاران در تحقيقات اخير نشان دادند كه ليزر اگزايمر روي سـطح پلي‌استيرن باعث تغييرات زيست‌سـازگاري پلـي‌اسـتيرن و ليزر گـاز كربنيـك باعـث تغييـرات خـون‌سـازگاري روي الاستومر سيليكون مي‌شود [۲۰-۲۲].

در اين تحقيق، اثـر ليـزرهاي دی‌اكسيـدكربن و اكسـايمـر كريپتون‌فلوئورايد بر سطـح پلي‌اتيلن‌ترفتـالات و همچنـين چسبندگي باكتـري اشـرشياكلي (E-coli K-12[1]) به سطوح

[1] Escherichia coli K-12

پرتودهي شده با ليزرهاي مذكور بررسي گرديده و سطوح بهينه با حداكثر يا حداقل جذب باكتري مورد مطالعه قرار گرفته است. نتايج اين بررسی می‌تواند در ساخت بيوسنسورها[2] برای ردیابی باكتری‌ها يا سم‌های بيوشيميايی مورد استفاده قرار گيرد.

۲- مواد و روش‌ها

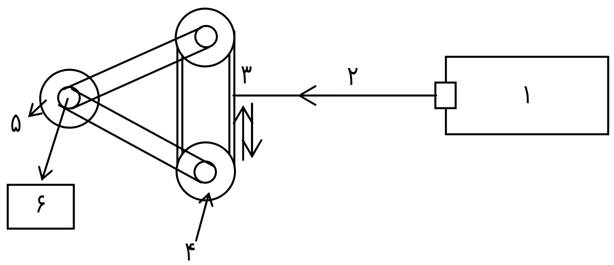
۲-۱- مواد

در اين تحقيق از فيلم پليمري پلي‌اتيلن‌ترفتالات تهيه شده از دانشگاه برونل[3] انگلستان (مركز تكنيكي Wolfong Center) براي بررسي آثار ليزر و همچنين چسبندگي باكتري E-coli K-12 روي سطح پليمر استفاده شد. نمونه‌هایی با قطر ۱۰ mm از فيلم PET پرتودهي شده و PET شاهد تهيه شد. سطح آنها توسط دستگاه تميزكننده اولتراسونيك Sonorex مدل RK31 در مخلوط آب يون زدايي و با استون شستشو داده شد و براي خشك شدن در آون خلاء با دماي ۴۰°C قرار گرفت تا به وزن ثابت برسد.

۲-۲- پرتودهي با ليزر

در اين آزمايش‌ها از ليزر ضرباني دی‌اكسيدكربن (Lumonics مدل TEA-840) با پهناي پالس ۲۰۰ ns استفاده شد. اين ليزر داراي طول موج قابل تنظيم در محدوده ۹-۱۱ µm و شاريدگي ۰/۴-۱/۵ J/cm² است. پرتودهي نمونه‌ها در طول موج ۹/۵۸ µm و شاريدگی ۱/۵ J/cm² انجام شد (شاريدگی توسط ژول‌متر و از روی اندازه پرتو ليزر محاسبه می‌شود) و سرعت تكرار ضربان يك هرتز انتخاب گرديد. با توجه به طيف IR پلی‌اتيلن‌ترفتالات، اين پليمر جذب‌هايی در ناحيه ۱۰۴۳ cm⁻¹ دارد كه با طول موج ۹/۵۸ µm در ليزر دی‌اكسيدكربن مطابقت دارد.

همچنين پرتودهي توسط ليزر اكسايمر كريپتون‌فلوئورايد (Physics Instrumentation Center-RAS، مدل ۱۸۱۲) با طول موج ۲۴۸ nm و پهناي پالس ۲۵-۱۰ ns كه سرعت تكرار ضربان ليزر از ۱۰۰-۱ هرتز قابل تنظيم است، نيز انجام شد. در اين آزمايش، پهنای پالس، ۲۰ ns؛ فركانس يک هرتز



شكل ۱- شكلواره‌اي از پرتودهی ليزری پليمرها
۱: ليزر؛ ۲: نور ليزر؛ ۳: فيلم پليمري؛ ۴: قرقره دوار؛ ۵: جعبه تنظيم سرعت موتور؛ ۶: موتور گامي

و شاريدگی ۶۰ J/cm² انتخاب گرديد (پارامترهای فوق با استفاده از مينی‌كامپيوتر متصل به ليزر كريپتون‌فلوئورايد قابل تنظيم است). پرتودهي نمونه‌ها با انتخاب شرايط مناسب نظير انرژي، سرعت تكرار و تعداد پالس ليزر، با قرار دادن نوارهايي از فيلم پليمري روي يك موتور گامي[4] مخصوص انجام شد، به طوري كه سرعت موتور با سرعت تكرار ضربان ليزر قابل تنظيم بود (شكل ۱).

۲-۳- اندازه‌گيري زاويه تماس

به منظور مطالعه آبدوستي نمونه‌ها، زاويه تماس استاتيك قطره آب با سطوح پليمر با روش قطره چسبيده[5] به كمك دستگاه كراس G10 اندازه‌گيري شد. همه زاويه‌هاي داده‌شده ميانگين زاويه تماس قطره آب با پنج نقطه مختلف سطوح پليمر است.

۲-۴- ميكروسكوپ الكتروني روبشي (SEM)

ميكروسكوپ الكتروني روبشي فيليپس (مدل XL30) با ولتاژ ۱۰ kV و شيب صفر درجه براي مطالعه مورفولوژي سطح فيلم‌هاي پلي‌اتيلن‌ترفتالات (قبل و بعد از پرتودهي) به كار گرفته شد. نمونه‌ها قبل از قرارگيري در محفظه خلاء ميكروسكوپ الكتروني با طلا پوشش داده شدند.

۲-۵- كشت سلولي[6]

در اين آزمايش از باكتري E-coli K-12 (تهيه شده از بانك سلول انستيتو پاستور ايران) استفاده شد. محلول كشت مغذي

[2] Biosensors
[3] Brunell
[4] Step motor
[5] Sessile drop
[6] Cell Culture

حـاوي كلريـد سـديم، تريپتـون پپتون، Yeast extract و آب يون‌زدا شـده در يك بشـر تهيه شـد. بشر و محلول در يـك اتوكلاو در دماي 121°C به مدت ۳۰ دقيقه سترون شـــدند. براي ايجاد يك رده تازه و خالص از باكتري E-coli K-12 از محيط كشت جـامد (حـاوي مولر هينتون آگار جامد) استفاده شد. براي اينكه باكتري‌ها بتوانند در محيط جـامد فوق رشـد كنند از انكوباتـور 37°C بـه مـدت ۲۴ ساعـت استفاده شـد. باكتـري‌ها را پـس از رشـد تـك لايـه روي مولرهينتون آگار جامد، توسـط لوپ فلـزي سترون شده برداشته و درون محلول كشت قرار داده شـدند تـا سوسپانسيوني از باكتـري بـا غلظـت $2 * 10^{5}$ bacteria/ml تهيه شود (با استفاده از روش مكفارلند). سپس محلول كشت حـاوي باكتـري به مـدت ۱۶-۱۴ ساعـت در دماي 23°C درون حمام آبي قرار داده شـد. بـر اساس منحنـي رشد E-coli K-12 اين زمـان انكوباسيـون باعـث مي‌شـود كه باكتـري به مرحله لگاريتمی رشد خود برسد. بررسي‌ها نشان داده است كه چسبندگـي باكتـري‌ها به بسترهاي پليمـري در مرحله لگاريتمی رشد بهتر انجـام مي‌شـود [۲]. براي اطمينان از اينكه باكتري در مرحله لگاريتمی از رشد خود قرار دارد از اسپكتروفتومتر براي اندازه‌گيـري دانسيته نوري[7] محيط كشت استفاده شـد و سپس مقـادير به دست آمـده بـا منحني رشـد E-coli K-12 مقايسه شد.

نمـونه‌هاي پليمـري پلـي‌اتيلن‌ترفتالات با قطر ۱۰ ميلي‌متر در بشرهاي كوچك قرار داده و ml ۱۰۰ از محلول كشت حاوي باكتري درون آنها پـر شـد و به مـدت ۳/۵ ساعـت همـراه با تكان‌خـوردن[8] در شـرايـط محيـط نگهـداري شـد. در ادامـه نمونه‌ها توسـط محلول نمـك به مـدت يك ساعـت شستشو داده شـدند تا براي مشاهـده چسبندگي باكتري‌ها روي سطح توسط ميكروسكوپ فلورسانس آماده باشند.

۲-۶- رنگ‌آميزي[9]

رنگ فلورسنت محصول شركت Molecular Probes با نام The LIVE/DEAD Baclight Bacterial Viability Kit بـا شماره كاتالوگ L-13152 بـراي تشخيص باكتري‌هاي زنده و مرده E-coli K-12 چسبيده به سطـح نمونه‌هاي پليمري پلي-اتيلن‌ترفتالات استفاده شد. براي رنگ‌آميـزي نمونه‌ها محلول رنگ در يـك مكان دور از نـور تهيه شـد. بـا استفاده از يك ميكروپيپت، µl ۱۵ از محلول رنـگ روي سطـح نمـونـه‌هاي پليمري ريخته شد، سپس يك لامل روي ناحيه‌اي كه محلول رنگ ريخته شـده بـود، گذاشته شـد؛ نمـونه‌ها سپس در يك اتـاق تـاريـك بـه مـدت ۱۵ دقيقه نگهداري شـدنـد. زمـان انكوباسيون به رنگ فرصت مي‌دهـد تا به درون باكتـري‌هاي چسبيده روي سطح نمـونه نفـوذ كرده و امكان آشكارسـازی باكتری‌های رنگ شده توسط ميكروسكوپ فلورسانس فراهم گردد.

۲-۷- ميكروسكوپ فلورسانس

از ميكروسكـوپ فلورسـانس نيكون (Nikon مـدل E600 با بزرگنمايـي 400 ×) بـراي مشاهـده باكتري‌هايي كه به سطـح پليمـر چسبيـده بـودنـد، استفاده شـد. همچنيـــن تـصـاويـر باكتري‌هاي چسبيده به سطـح پليمرها به كمـك ابزار CCD[10] (مـدل JVC-TK-C601) بـه دست آورده شـــد و شمـــارش باكتري‌های زنده توسط نرم‌افزار Image Proplus انجام شد.

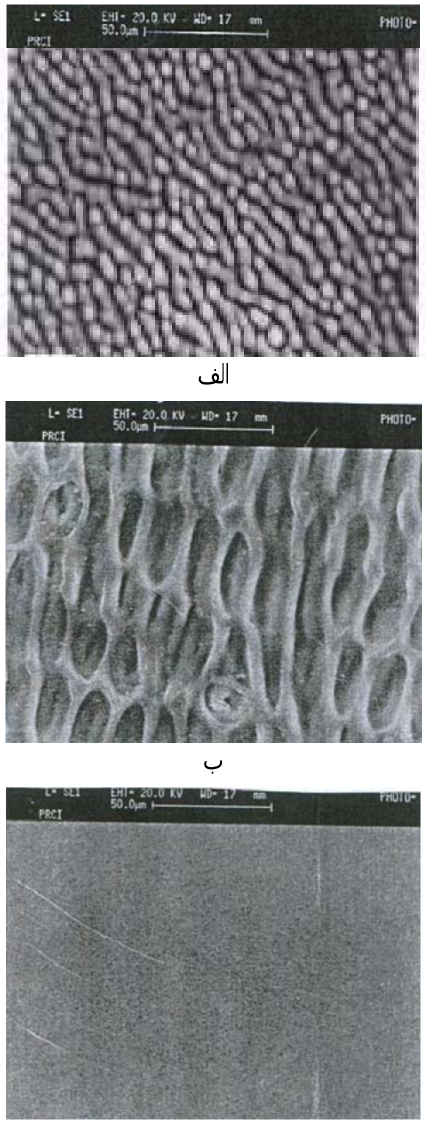
۳- نتايج و بحث

۳-۱- بررسي مورفولوژي سطح

تغييرات مورفولوژي در اثر پرتودهـي با ليزر دی‌اكسيد كربن با طـول مـوج µm ۹/۵۸ و ليـزر كريپتون‌فلوئوريد با طـول مـوج nm ۲۴۸ در تصاوير ميكروسكوپ الكتروني شكل ۲ نشان داده شده است. همـان طـور كه در اين شكل مشاهـده مي‌شـود در سطح پليمر تپه‌ها و دره‌هايي در اثر قرار گرفتن در معرض نـور ليزر KrF ايجاد شده است كه با مشاهدات لازار و سرينيواسان مطابقـت دارد [۱۶]. با پرتودهي نمونه با انرژي بيشتر از آستانه كندگي (آستانه كندگي PET در طول موج nm ۲۴۸، ۳۰ mJ/cm^2 است.)، يك لايه از سطـح پليمر كنده شده و در لايه زيرين بـه نام لايه ذوب، تنش‌هاي داخلـي مربـوط به كشش فيلم جهـت يافته آزاد مي‌شـوند و جامد شدن مجدد، بافت ويژه‌اي را در سطح فيلم موجب مي‌شود [۲۴،۲۳]. تغييرات مورفولوژي در اثر پرتودهي با طول مـوج µm ۹/۵۸ ليزر دی‌اكسيدكـربن در شكل ۲- ب نشـان داده شده است. تشكيل ريزساختار ايجاد

[7] Optical Density [8] Shaking [9] Staining [10] Controlled Charge Coupled Device

مجله مهندسی پزشکی زیستی، دوره اول (جدید)، شماره اول، بهار ۱۳۸۶، ۱۹- ۲۸



الف

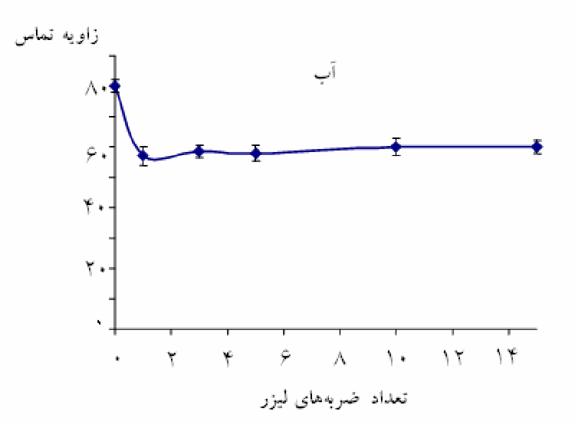
ب

ج

شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکتروني PET پرتودیده با لیزر الف- KrF در طـول‌مـوج nm ۲۴۸ و ده ضـربه بـا شـاریدگـی J/cm2 ۶۰؛ ب- دي‌اكسيدكربن در طـول‌مـوج µm ۹/۵۸ و ده ضـربـه بـا شاریدگی J/cm2 ۱/۵؛ ج- PET کنترل [۱۷]

شده روي سطح PET به آزاد شدن تنش در يك لايه سطحي فيلم مذاب نسبت داده شـده است [۱۷]. از طـرفی هـر چـه ضـریب جذب پلیمر بیشتر باشد، عمـق کندگي کمتر است و نور لیزر کمتر در توده پلیمر نفوذ مي‌کند [۲۵].

عامـل دیگر در تغییر ساختـار سطحـي پلیمـر مقیاس زمـاني در پهناي پالس لیـزر است. در لیـزرهاي اکسایمر کریپتون‌فلوئورید پهناي پـالس از s $۱۰^{-۹}$ * ۱۰ تا s $۱۰^{-۹}$ * ۲۵ است و در لیــزر دي‌اکسیدکربن این زمان به s $۱۰^{-۹}$*۱۰۰ مي‌رسـد و با توجه به



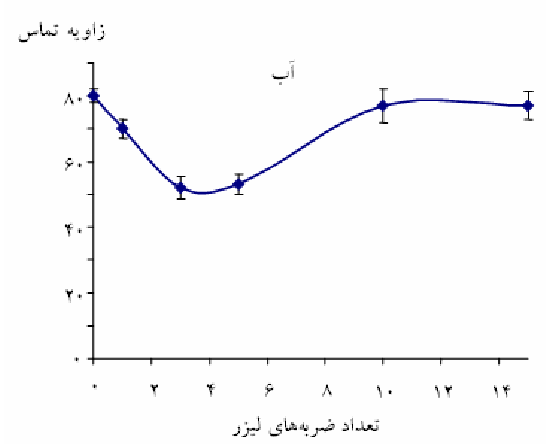
شکل ۳- تغییرات زاویه تماس قطره آب با سطح PET پرتودیده با لیزر دي‌اکسید کربن در طول موج µm ۹/۵۸ بر حسب تغییر تعداد ضربه‌هاي لیزر

اینکه سرعت آسایش براي تغيير يك حـالت الكتروني به حـالت ارتعـاشي گرمايي تقـريباً s $۱۰^{-۱۱}$ است [۲۶]، در اثـر ايـن تغيير حالت فقط سطح پليمر گرم خواهد شد. ولي براي نفوذ گرما در توده پليمر در حـدود s $۱۰^{-۵}$-$۱۰^{-۷}$ زمان لازم است كه اين زمان به مراتب بيشتر از پهناي پالس در ليزر اكسايمر است. از اين رو، در ليـزر كـريپتـون‌فلـوئـورايـد نفـوذ گـرمـا بـه داخـل پليمـر پلي‌اتيلن‌ترفتـالات كمتر صـورت مي‌گيـرد و تغييرات در سطـح پليمر باقي مي‌ماند، در حالي كه در ليزرهاي دی‌اکسیدکربن نفوذ گرمايي بيشتري صورت مي‌گيرد و تغييرات مورفولوژي در عمق بيشتري به وجود مي‌آيد.

۳-۲- زاویه تماس

براي مطالعـه تغيير آبدوستي سطـح فيلم PET كه در معرض نور ليـزرهاي دی‌اکسیدکربن و کریپتون‌فلوئـوراید قرارگرفتـه است زاويه تمـاس استـاتيكي قطـره آب با سطح اندازه‌گيری شـد. همان طور كه در شكل ۳ ديده مي‌شـود بر اثر پرتودهي سطـح PET با ليـزر دی‌اکسیدکربن زاويه تمـاس قطـره آب كاهش مي‌يابد و با افزايش تعـداد ضـربه‌هاي ليزر به يك حد نسبتاً ثابت مي‌رسد.

كـاهش زاويـه تمـاس قطـره آب بـه تـشكيل هيدروپراكـسيد، هيدروكسيل، و گروه‌هاي كربونيل‌دار حاصل از بـرهم‌كنـش‌هاي راديكال‌هاي پراكسي در سطح فيلم نسبت داده مي‌شود [۲۷].

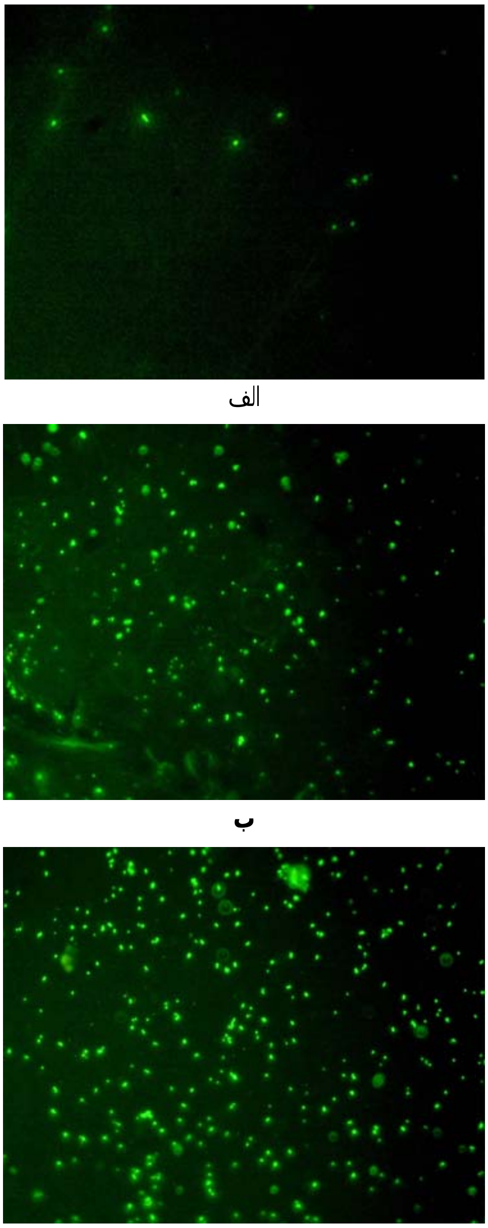


شكل ۴- تغييرات زاويه تمـاس قطـره آب با سطح PET پرتوديده با ليزر اكسايمر كريپتون‌فلوئوريد در طول موج ۲۴۸ nm بـر حسب تغيير تعـداد ضربه‌هاي ليزر

در شكل ۴، منحني زاويه تماس قطـره آب با سطـح فيلمي كـه در معرض تابش نور ليـزر اكسايمر قرار گرفته است، نسبت به تغيير تعداد ضربان ليزر رسم شده است. در اثر پرتودهی با ليزر اكسايمر و با افزايش تعـداد ضربان، زاويه تمـاس به تدريج كم مي‌شـود ولـی بـا رسيدن به چهار ضـربه بر مقـدار آن افـزوده مي‌گردد، به عبارت ديگر آبدوستي سطـح فيلم ابتـدا افزايش و سپس كاهش مي‌يابـد. ايـن رفتـار مشابه نيز در اصلاح سطـح پلـي‌يورتان با ليـزر دی‌اكسيدكربن بـا طول موج ۱۰/۶ μm قبلاً مشاهده و گزارش شـده است [۱۳]. كاهش زاويه تمـاس قطـره آب با سطـح پليمر بر اثر پرتو ليزر اكسايمر نشان‌دهنده افزايش آبدوستي سطـح بر اثـر ايجـاد گروه‌هاي قطبـي و تغيير ساختـار شيميايي آن است. بـا افـزايش تعـداد ضربان ليزر به دليل تجزيه پراكسيدهاي روي سطح، ايجاد تخلخل و محبوس شدن اكسيژن در حفره، آبدوستي سطح كاهش مي‌يابد [۲۸،۷].

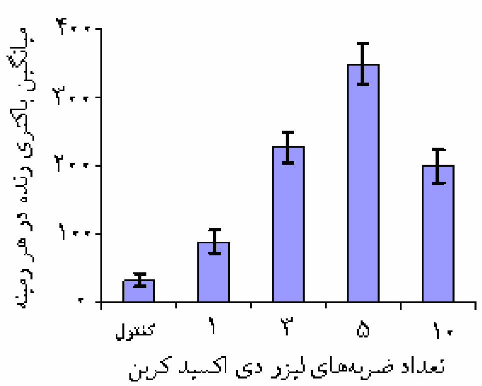
۳-۳- چسبندگي باكتريايي

شكل ۵، تصاوير ميكروسكوپ فلورسانس باكتـري‌هاي زنده چسبيده به سطح پلي‌اتيلن‌ترفتالات (PET) پرتودهـي‌شده بـا ليزر دی‌اكسيدكربن را در مقـايسه با PET شاهـد (عمل‌آوري نشده) نشان مي‌دهد. هـان طـور كه ديده مي‌شـود چسبندگي باكتري E-coli K-12 بر اثر پرتودهـي با ليـزر دی‌اكسيدكربن با تعـداد ضـربه‌هاي مختلف افـزايش مي‌يابـد. بـا توجـه بـه



شكل ۵- تصـاوير ميكروسكـوپ فلـورسانس باكتـري‌هـاي E-coli K-12زنده چسبيده روي الف- PET پرتونديده؛ ب- PET پرتوديده با سه ضربه ليزر CO2 در طول موج ۹/۵۸ μm؛ ج- PET پرتو ديده با پنج ضربه CO2 در طول موج ۹/۵۸ μm (با بزرگنمايي ۴۰۰)

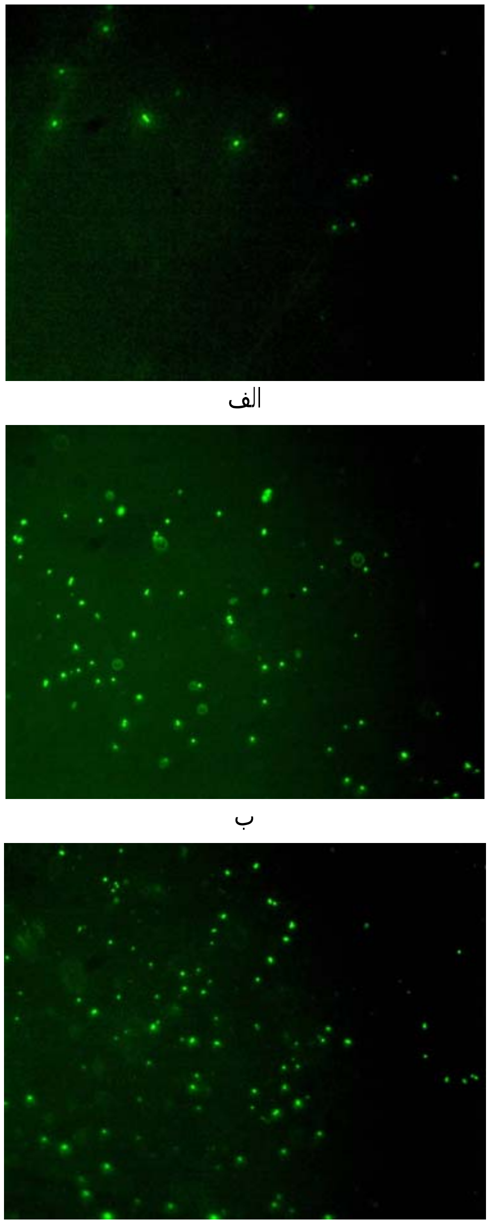
مطالعاتي كه تاكنون انجام شده، چسبندگي و رشد سلـول‌ها روي نمـونه‌هـاي پليمـري بـه ويژگـي‌هـاي سطـح از قبيل آبدوستي- آبگريزي، ساختـار شيميايـي و مورفولوژي سطـح بستگي دارد [۳۰،۲۹]. پرتودهـي با ليـزر دی‌اكسيد كـربن در طول موج ۹/۵۸ μm ريزساختار ويژه‌اي را ايجـاد مي‌كند كـه اين ساختارها متناسب با ابعـاد و شـكل‌شـان بـر چـسبندگي



شکل ۶- تغییرات چسبندگي باکتري E-coli K-12 روي سطح PET پرتو دیده با لیـزر دی‌اکسیدکربن در طـول مـوج ۹/۵۸ μm با تعداد ضربه‌هاي مختلف (p values<۰/۰۰۱)

باکتري و رفتار سـلولي تـأثیر مـي‌گذارنـد. همچنـین در اثـر پرتودهي با لیزر مذکور زاویه تماس قطره آب کاهش یافته و آبدوستي سطح در مقایسه با نمونه شاهد زیاد مي‌شود کـه در نتیجه این تغییرات یا به عبارت دیگر بـر اثـر تغییـر سـاختار شیمیایي سطح، چسبندگي باکتري‌هـا روي نمونـه‌هـاي پرتـو دیده در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافته اسـت. شـکل ۶، نتایج حاصـل از شـمارش بـاکتري‌هـاي E-coli K-12 زنـده چسبیده به سطح پلي‌اتیلن‌ترفتالات (PET) پرتودهي شـده بـا لیزر دی‌اکسید کربن را توسط نـرم‌افـزار Image Proplus در مقایسه با PET شاهد (عمل‌آوري نشده) نشان مي‌دهد. همان طور که در این شکل نیز دیده مي‌شود با افزایش ضربان لیـزر تعداد باکتري‌هاي چسبیده به سطح پلیمر افزایش مي‌یابد کـه با مشاهدات میکروسکوپي مطابقت دارد.

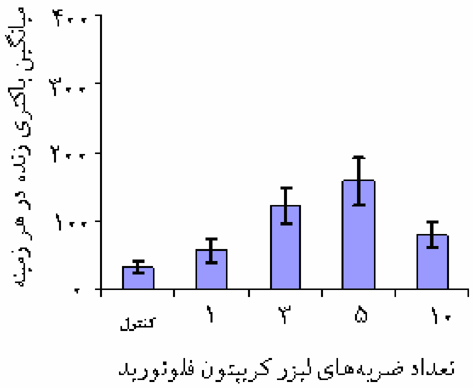
در شکل ۷، تصـویر میکروسکـوپ فلـورسـانس باکتري‌هاي زنده چسبیده روي سطح پلی‌اتیلن‌ترفتالات (PET) پرتودهـي شده با ضربه‌هاي مختلف لیزر اکسایمر درطول موج ۲۴۸ nm نشـان داده شـده است. همـان طـور که مشـاهـده مي‌شـــود چسبندگي باکتـري E-coli K-12 به سطـوح پرتودیده با تعداد ضربه‌هاي مختلف بهبود یافته است و تعـداد باکتري‌هایي که بـه سطح چسبیده‌اند در مقایسه با نمونه شاهد بیشتر اسـت. سـطح PET بر اثر پرتودهي با لیزر KrF تا ۵ ضـربه آبدوسـت شـده و بعد با ادامه پرتودهي آبگریز شده است.



الف
ب
ج

شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ فلورسانس باکتري‌هاي E-coli K-12 زنده چسبیده روي الف- PET پرتو ندیده؛ ب- PET پرتودیده با سه ضربه لیزر KrF در طول موج ۲۴۸ nm ؛ ج- PET پرتودیده با پنج ضربه لیزر KrF در طول موج ۲۴۸ nm (با بزرگنمایي ۴۰۰)

با توجه به تغییر آبدوستي سـطح PET تعـداد بـاکتري‌هـاي چسبیده به سطح پلیمر نیز در اثـر افزایش ضربه‌هاي لیزر یاد شده، زیاد شده است که نشان دهنده افزایش زیست‌سازگاري پلیمرـ باکتري است و پس از آن با افزایش ضربه‌هاي لیـزر و کـاهش آبدوسـتي و تغییـر ماهیـت شـیمیایي سـطح، تعـداد باکتري‌ها تا حدي کم شده است. از طرف دیگر با پرتـودهي



شكل ۸- تغييرات چسبندگي باكتري E-coli K-12 روي سطح PET پرتوديده با ليـزر كريپتون‌فلوئوريد در طـول موج ۲۴۸ nm با تعداد ضربه‌هاي مختلف (p values<۰/۰۰۰۱)

سطـح پليمر توسـط ليزر KrF ساختـار مورفولوژيكی مـنظم روي سطح ايجاد شده كه اين ساختار نيز به نوبه خـود مـي‌تواند در چسبندگي باكتري‌هـا مـؤثر باشـد. شـكل ۸، نتـايج حاصـل از شمارش باكتـري‌هاي E-coli K-12 زنده (توسـط نرم‌افـزار Image Proplus) چسبيـده بـه سطـح پلـي‌اتيلـن‌ترفتـالات (PET) پرتودهـی شـده با ليـزر كريپتون‌فلـوئورايد (KrF) را در مقـايسه با PET شاهـد (عمل‌آوري نشده) نشان مي‌دهد. همان طور كه در اين شكل نيـز ديده مي‌شـود بـا افزايش ضربان ليزر تعداد باكتري‌هاي چسبيده به سطح پليمر افزايش يافتـه است كه با مشاهـدات ميكروسكـوپي مطابقت دارد.

۴- نتيجه‌گيري

پرتودهي توسط ليزرهاي كريپتون‌فلوئورايد و دی‌اكسيد كربن يك ريزساختار خاصـی همـراه بـا تغييراتـي در آبدوسـتي و شيمـي سطـح پليمـر پلـي‌اتيلـن‌ترفتـالات ايجاد مي‌كند. اين تغييرات در چسبندگـي باكتـري E-coli K-12 به سطـح پلي‌اتيلن‌ترفتالات پرتودهي شـده با ليـزر تأثيـر مي‌گذارد. نتـايج بـه دست آمـده از آزمايشـات كشت سلـولي و مشـاهـدات ميكروسكوپي نشـان داد كه چسبندگي اين باكتـري به سطـح پرتودهي شده با ليـزر دی‌اكسيد كربن بيشتر است. چسبندگي كم باكتري‌ها به سطـح PET پرتودهـي شـده با ليزر اكسايمر كريپتون فلوئورايد ممكن است مربوط به ساختار ريز و منظم سطح PET باشد. اندازه واحـدهايي كه ساختـار سطـح PET پرتودهي شـده با ليزر اكسايمر را تشكيل داده‌اند در محدوده ۱ μm است كه بـا اندازه باكتـري‌ها، ۳-۱ μm، قابل مقـايسه است و باكتري‌ها به علت اندازه‌شان نمـي‌تواننـد در فواصـل بين دره‌ها و تپـه‌هاي پرتـوديده قرار گيـرند. در صـورتي كه اندازه ساختار تشكيل شـده روي PET پرتودهـي شده با ليزر دی‌اكسيـدكربن بيشتـر از ۱۰ μm است [۲۷] كه ايـن عـامـل موجب به دام افتادن باكتري‌ها مي‌شود. از طرف ديگر در اثـر پرتودهي ليـزري سطـح PET، در مـورد ليـزر CO_2 وضعيت آبدوستـي و انرژي‌هاي سطحي متفاوتي با وضعيت آبدوستي و انرژي سطحي PET پرتوديده با ليـزر KrF ايجـاد مي‌شود كه اين تغييرات نيز نتيجه‌اي متفاوت در مورد چسبندگي باكتـري‌ها آشكار مي‌كنـد. به نظـر مي‌رسـد در مـورد ليـزر KrF آبدوستـي پارامتـر اصلي است كه روي چسبندگي باكتري‌ها تأثير مي‌گذارد در صورتي‌كه مورفولوژي و آبدوستي سطـح هر دو فاكتـورهاي مهمي هستند كه در چسبندگـي باكتـري‌ها روي سطــوح PET پرتودهي شده با ليـزر دی‌اكسيدكربن تأثير مي‌گذارند. بنابر اين با توجه به نتـايج به دست آمده مي‌توان ادعـا نمـود كه چسبندگي باكتـري E-Coli K-12 به سطـح پليمـر به مورفولوژي، شيمي و آبدوستي سطـح بستگي دارد. بـا تـوجـه بـه افزايش چسبندگي باكتري روي سطوح تابش ديده با ليزر، پيش‌بيني مي‌شـود از اين پارامتر بتوان در طراحي و ساخت بيوسنسورها براي آناليز و ثبت ميـزان حضـور باكتـري‌ها و همچنين سم‌هاي بيـوشيميايـــي در محيط‌هاي آبي استفاده كرد.

مراجع

[1] Hunt JA; Quantifying the soft tissue response to implanted materials; Biomaterials 1995; 16(3): 167–170.
[2] Wimmer RF, Waddell E, Barker SLRB, Suggs A, Locascio LE, Love BJ, Love NG; Development of an Upset Early Warning Device to Predict Deflocculation Events; Proceedings of the Water Environment Federation Conference and Exposition 2001.
[3] Love NG, Love BJ, Meehan K; Live cell biosensor to detect presence of biochemical toxins in water supply; IDHS Research Summit 2003.
[4] Ikada Y; Surface modification of polymers for medical applications; Biomaterials 1994; 15(10): 725–736.

[5] Van Loosdrecht MCM, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB; The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion; Applied and Enviromental Microbiology1987; 53(8): 1893–1897.

[6] Dekker A, Beugeling T, Bantjes A, Feijen J, Van Aken WG; Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated PTFE; Biomaterials 1991; 12: 130–138.

[7] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N, Daliri M; Cell behaviors on laser surface-modification polyethylene terephtalate in vitro; Journal of Biomedical Materials Research 2001; 57: 183–189.

[8] Mirzadeh H, Katbab AA, Khorasani MT, Burford RP, Gorgin E, Golastani A; Cell attachment to laser-induced AAm and HEMA grafted ethylene propylene rubber as biomaterial: *in vivo* study; Biomaterials 1995; 16: 642–648.

[9] Mirzadeh H, Katbab AA, Burford RP; CO_2-pulsed laser induced surface grafting of acryl-amide onto ethylene propylene rubber (EPR); Radiat Phys Chem 1993; 41: 467–470.

[10] Mirzadeh H, Katbab AA, Burford RP; CO_2-Laser Graft Copolymerization of HEMA and NVP onto Ethylene-Propylene Rubber (EPR) as Biomaterial; Radiat Phys Chem1995; 46: 859–862.

[11] Khorasani MT, Mirzadeh H, Sammes PG; Laser induced surface modification of polydimethylsiloxane as a super-hydrophobic material; Radiat Phys Chem 1996;47: 881–888.

[12] Lazare S, Hoh PD, Baker JM, Srinivasan R; Controlled modification of organic polymer surface by continuous wave farultraviolet (185nm) and pulsed-laser (193nm) radiation: XPS studies; J Am Chem Soc 1984; 106: 4288–4290.

[13] Khosroshahi ME, Karkhaneh A, Orang F; A comparative study of chop-wave and super pulse CO_2 laser surface modification of Polyurethane; Iran Polymer Journal (ISI) 2004;13: 503.

[14] Khosroshahi ME, Dyer PE; Ablation mechnism of organic polymers using UV and IR lasers; Iranian Journal of Polymer Science and Tech 1995; 8:161.

[15] Watanabe H, Takata T, Tsugo M; Polymer surface modification due to excimer laser radiation-chemical and physical changes in the surface structure of poly(ethylene terephthalate); Polym Int 1993; 31: 247–250.

[16] Lazare S; Surface amorphization of Mylar films with excimer laser radiation above and below ablation threshold: ellipsometric measurements; Journal of Applied physics 1993; 74: 4953–4957.

[17] Dyer PE, Oldershaw GA, Sidhu J; CO_2 laser ablative etching of polyethylene terephthalate. Appl Phys B 1989; 48: 489–493.

[18] Mirzadeh H, Dadsetan M; Influence of laser surface modifying of polyethylene terphthalate on fibroblast cell adhesion; Radiat Phys Chem 2003; 67: 381–385.

[19] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N,Salehian P; In vitro studies of platelet adhesion on laser-treated polyethylene terephthalate surface; Biomaterials 2000; 21: 540–546.

[20] Mirzadeh H, Bagheria SH; Comparison of the effect of excimer laser irradiation and RF plasma treatment on polystyrene surface, Radiation Physics and Chemistry 2007; 76: 1435–1440.

[21] Khorasani M, Mirzadeh H; Laser Surface Modification of Silicone Rubber to Reduce Platelet Adhesion; Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 2005; 15: 59–72.

[22] Mirzadeh H, Amanpour S, Ahmadi H; Long Term Evaluation of Laser-Treated Silicone (LTS) Membrane as a Pericardial Substitute: *In Vivo* Study, Journal of Long–Term Effects of Medical Implants 2005; 15: 347–353.

[23] Kokai F, Saito H, Fujioka T; Characterization of polymer surface after KrF laser ablation by infrared spectroscopy; Macromolecules 1990; 23: 674–676.

[24] Dyer PE, Sidhu J; Excimer laser ablation and thermal coupling efficiency to polymer films; J Appl Phys 1985; 57(4): 1420.

[25] Andrew JE, Dyer PE, Foster D, Key PH; Direct etching of polymeric materials using a XeCl laser; Appl Phys Lett 1983; 43: 717–719.

[26] Knittel D, Kesting W, Schollmeyer E; Surface structuring of synthetic fibers by UV laser irradiation; Polym Int 1997; 43: 240–250.

[27] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N; Effect of CO_2 laser radiation on the surface properties of polyethylene terephthalate; Radiat Phys Chem 1999; 56: 597–604.

[28] Saito N, Yamashita S, Matsuda T; Laser-irradiation induced surface graft polymerization method; J Polym Sci 1997; 35: 747–754.

[29] Lee JH, Jung HW, Kang IK, Lee HB; Cell behavior on polymer surfaces with different functional groups; Biomaterials 1994; 15: 705–711.

[30] Faid1 K, Voicu1 R, Bani-Yaghoub M, Tremblay R, Mealing G, Py C, Barjovanu R; Rapid fabrication and chemical patterning of polymer microstructures and their applications as a platform for cell cultures, Biomedical Microdevices 2005; 7: 179–184.