

소각 X선 산란을 이용한 신경조직보존법이 쥐 궁둥신경 구조에 미치는 영향 분석

대구가톨릭대학교 의과대학 마취통증의학교실, *해부학교실

변성혜 · 이승미 · 한성미* · 류태하 · 정진용 · 김봉일

The effect of nerve preservation methods on rat sciatic nerve structures studied with Synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS)

Sung Hye Byun, Seung-mi Lee, Sung-Mi Han*, Taeha Ryu, Jin-Yong Jung, and Bong-IL Kim

Departments of Anesthesiology and Pain Medicine, *Anatomy, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea

Background: Synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) is a very useful technique for experimental study of the nano-structure of the nervous system of animals. The study was designed to evaluate nerve preservation methods for the measurement of SAXS patterns.

Methods: Normal sciatic nerves extracted from male Sprague-Dawley rats were preserved in saline (N = 2), formalin (N = 2) or liquid nitrogen (N = 2) for 1 day, followed by measurement of SAXS patterns. SAXS patterns of normal sciatic nerves (N = 3) extracted just before the initiation of the experiment were used as controls. The study was carried out using the 4C1 beamline at Pohang Accelerator Laboratory in Korea. Incoming X-rays were monochromatized at 11 keV using a double multilayer (WB4C) monochromator with beam size of approximately 0.5 (V) × 0.8 (H) mm². The exposure time was set at 60 sec, and 8 to 12 images per sample were acquired at a 0.5 mm interval.

Results: The periodic peaks of interfibrillar space between collagen fibrils were undetectable. The periodic peaks of the myelin

sheath and collagen fibers were weakly detected or undetected in the nerves preserved in normal saline or formalin. The periodic peaks and intensity of the myelin sheath, collagen fibers, and interfibrillar space between collagens in the nerves preserved in liquid nitrogen were comparable to those of nerves in the ex vivo state.

Conclusions: The study results indicated that preservation of nerves in liquid nitrogen is adequate for measurements with SAXS. However, saline and formalin preservation techniques were inadequate for SAXS measurement. (*Anesth Pain Med* 2016; 11: 149-154)

Key Words: Sciatic nerve preservation, Small angle X-ray scattering.

서론

신경 조직의 구조를 연구하기 위하여 동물을 사용하는 실험적 연구에서는 흔히 광학현미경이나 전자현미경을 이용한다. 그러나 방사광 가속기를 이용하여도 구조의 연구가 가능하다는 것을 Kim 등이[1] 보고한 바가 있다.

X선 산란 기법은 방사광 가속기를 이용한 구조분석법의 하나로 그 중 소각 X선 산란(small-angle X-ray scattering, SAXS)기법을 이용하여 신경 구조의 변화를 측정할 수 있다 [2,3].

광학현미경이나 전자현미경을 사용하여 연구하는 경우에는 조직의 고정, 절편 그리고 화학적 처리 등과 같은 과정이 필요하며 처리과정을 위한 시간 또한 요구된다. 특히 신경조직은 화학적 처리과정으로 인해 시료의 손상과 artifact가 발생할 수가 있다[4,5]. 또한 광학현미경이나 전자현미경을 이용하는 경우에는 조직의 절편으로 연구하게 된다. 이에 비해 SAXS 기법으로 시행할 시에는 조직 주위가 잘린 것을 제외하고는 조직의 처리를 하지 않은 원상태로 연구하는데 매우 유용하며[2,3], 측정시간이 매우 짧아서(60초 이내) 변성되지 않은 상태의 나노 구조 정보를 정확히 제공할 수 있어 바이오 물질의 구조연구에 매우 적합하다.

그러나 이러한 장점이 있음에도 불구하고 방사광 가속기

Received: September 21, 2015.

Revised: 1st, October 27, 2015; 2nd, November 9, 2015.

Accepted: November 10, 2015.

Corresponding author: Bong-IL Kim, M.D., Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Catholic University of Daegu School of Medicine, 33, Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu 42472, Korea. Tel: 82-53-650-4505, Fax: 82-53-650-4517, E-mail: bikim@cu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

가 국내에서 포항 한곳에만 있기에 이를 이용할 시에는 시간의 제한이 있다. 또한 아직 동물실험실이 준비 중에 있기에 동물을 in vivo 혹은 ex vivo 상태에서 연구를 시행하려면 미리 이용시간에 맞추어 실험조건을 만들어야 하고 직접 준비한 동물을 가져가야 하고, 조직적출을 그곳에서 해야하는 등 실험하기 위해서는 제한점이 있다.

이에 본 연구는 이러한 제한점을 보완하여 가속기 운용 시간에 실험할 수 있도록 쥐 공동신경을 미리 적출한 후 포르말린, 액화질소, 그리고 생리식염수를 사용하여 보관하는 방법이 SAXS 기법을 이용하여 측정 시 이의 결과에 미치는 영향이 있는가를 조사하고자 시행하였다.

대상 및 방법

본 연구는 본 의료원 동물 윤리위원회의 승인 하에 시행하였으며(2010-1222-CU-AEC-8-Y) 실험동물들은 본 병원의 IACUC (Institutional animal care and use committee)에 기술된 가이드라인에 따라 관리하였다.

실험동물로 연령이 7주(체중 250-350 gram)인 웅성 백서(Sprague-Dawley rat)를 대상으로 하였으며 실험 전 1-2일간 동물 사육실에서 안정토록 하였다.

실험 군은 방사광 가속기를 이용하기로 배정 받은 날 하루 전에 공동신경을 적출한 후 생리식염수($N = 2$), 포르말린 용액(알데하이드계열 [0.1% Glutaaldehyde + 4% Paraformaldehyde, PFA]) ($N = 2$), 그리고 액화질소(liquid nitrogen, $N = 2$)에 하루 동안 보존한 군으로 하였다. 액화질소에 보관한 군은 실험 직전에 실온에서 녹인 후 실험하였다. 대조군($N = 3$)은 방사광 가속기를 이용하여 실험을 하기 직전에 공동신경을 적출한 군으로 하였다. 두 군 모두 공동신경에 아무런 조작을 하지 않았다. 마취는 두 군 모두에서 케타민 80 mg/kg를 복강 내로 주입하여 시행하였고 꼬리뼈에 자극을 주어 움직이지 않을 시 마취가 되었다고 판단하였다. 혹은 움직임을 있을 시 복강 내로 추가 주입한 후 시행하였다.

적출한 네 군의 공동신경은 폴리이미드 필름 사이에 끼워 넣은 후 잘 밀봉하여 측정하는 동안 수분의 증발에 의한 변형을 방지하였다.

소각 X-선 산란(small angle X-ray scattering, SAXS) 법의 실험은 포항 방사광 가속기 연구소의 4C1 SAXS 빔 라인에서 수행하였다. 사용된 X-선의 에너지는 11 keV이었으며, 시료에서 X-선 검출기까지의 거리는 3 m로 이때 측정 가능한 최대 먼간거리(d_{max})는 약 150 nm이었다. X-선 검출기로는 지름 165 mm인 2차원 검출기(MarCCD, Mar USA, Inc. Evanston, IL, USA)를 사용하였으며 SAXS 패턴을 측정하기 위한 노출시간은 각각 60초였다.

측정에 사용된 공동신경의 길이는 각각 약 15 mm이었으며 측정 시 신경을 수직으로 거치한 후 수평방향과 수직방

향으로 수초, 섬유소간의 거리와 콜라겐 섬유를 측정하였다. SAXS 패턴은 각각의 공동신경을 길이 방향으로 0.5 mm간격으로 8-12곳에 측정하였다.

결 과

보존 처리하지 않은 쥐 공동신경의 SAXS 패턴

소각 X-선 산란법으로 측정하기 직전에 적출한 정상 쥐 공동신경을 수직방향으로 위치시킨 후 SAXS 회절 패턴을 측정한 결과 수직방향과 수평방향에서 각기 다른 주기성을 가지는 회절패턴을 보였다. 수평방향과 수직방향으로 측정된 일차원적인(1 dimension, 1D) 소각 회절 데이터를 Fig. 1A와 Fig. 2A에 나타냈는데 Fig. 1A는 수평 방향으로의 1D 소각 회절 데이터를 나타낸 것으로 약 18 nm 축 주기성(axial periodicity)을 나타내는 수초(myelin sheath)의 회절 피크들(M_{1st} , M_{2nd} 그리고 M_{3rd})과 약 66 nm의 축 주기성을 나타내는 콜라겐 섬유소들 사이의 거리(interfibrillar distance)에 해당하는 회절피크(F_{1st} , F_{2nd})가 측정되었다. 콜라겐 섬유소들 사이의 거리에 해당하는 회절피크는 폭이 상당히 넓고 또한 회절 세기도 매우 약하게 측정되었다. Fig. 2A는 수직 방향으로의 1D 소각 회절 데이터를 나타낸 것으로 약 67 nm의 축 주기성을 나타내는 콜라겐의 회절 peak 들(C_{1st} - C_{9th})이 뚜렷하게 측정되었다.

포르말린(알데하이드계열 [0.1% Glutaaldehyde, GA + 4% Paraformaldehyde, PFA])을 사용하여 공동신경 조직을 1일 동안 보존한 경우의 SAXS 패턴

쥐 공동신경을 포르말린에 1일 동안 보존하여 측정한 결과 수평 방향에서 Fig. 1B와 같이 콜라겐 섬유소 사이의 거리를 나타내는 회절 peak인 F_{1st} , F_{2nd} 가 측정되지 않았으며, 수초를 나타내는 M_{1st} , M_{2nd} 그리고 M_{3rd} 의 회절 peak가 측정된 되었으나 세기가 매우 약했다. 수직방향에서 측정한 결과 콜라겐 섬유를 나타내는 회절 peak (C_{1st} - C_{9th})도 Fig. 2B와 같이 역시 세기가 약하게 측정되었다.

생리식염수에 신경조직을 1일 동안 보존한 쥐의 공동신경의 SAXS 패턴

쥐 공동신경을 생리식염수에 하루 동안 보존한 후 측정한 결과 수평 방향에서 Fig. 1C와 같이 콜라겐 섬유소 간의 거리를 나타내는 회절 peak인 F_{1st} , F_{2nd} 가 측정되지 않았고 수초의 회절 peak인 M_{1st} , M_{2nd} 그리고 M_{3rd} 의 일부분이 측정되지 않았고 측정된 peak에서도 그 세기는 매우 약하게 측정되었다. 그리고 콜라겐 섬유들의 회절 peak인 C_{1st} - C_{9th} 의 세기도 Fig. 2C에서와 같이 매우 약하게 측정되었다.

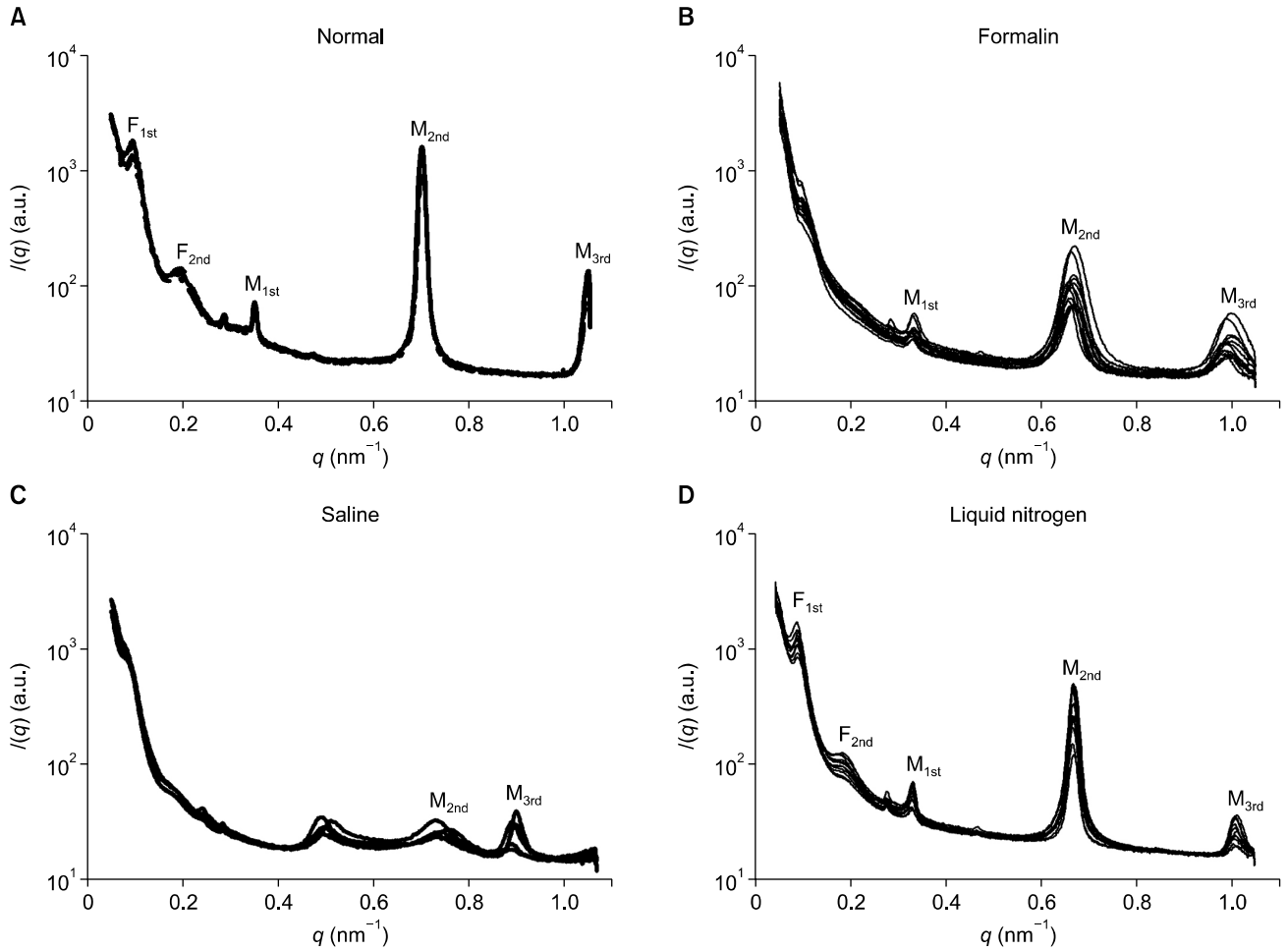


Fig. 1. One dimensional SAXS plot of nerve in ex vivo state (normal) and nerve preserved for one day in formalin, normal saline and liquid nitrogen (LN2) measured by using of SAXS at horizontal direction. Myelin sheath was measured as 18 nm periodicity peak patterns (M_{1st} , M_{2nd} , M_{3rd}) in ex vivo state (A). Interfibrillar distance was between collagen fibrils measured 66 nm periodicity peak patterns (F_{1st} , F_{2nd}) which is wide and weak in ex vivo state (A). Periodic peaks, F_{1st} and F_{2nd} , of nerve preserved in formalin and saline were not measured (B, C). The Measured periodic peaks and intensity, M_1 , M_2 and M_3 , of nerve preserved in formalin and saline were weak and/or not detected. Periodic peaks and intensity, F_{1st} , F_{2nd} and M_1 , M_2 , M_3 , of nerve preserved in liquid nitrogen, were comparable to those of nerve in ex vivo state (D).

액화질소에 신경조직을 1일 동안 보존한 쥐의 궁둥신경의 SAXS 패턴

쥐 궁둥신경을 액화질소에 하루 동안 보관한 후 측정된 결과 Fig. 1D와 Fig. 2D에서와 같이 수초(M_{1st} , M_{2nd} 그리고 M_{3rd}), 콜라겐 섬유소 간의 거리(F_{1st} , F_{2nd}) 그리고 콜라겐 섬유들의 회절피크(C_{1st} - C_{9th})는 ex-vivo 상태 측정된 경우와 유사하게 측정되었다.

고 찰

소각 X-선 산란 기법을 이용하여 신경 구조의 변화를 측정할 수 있으나[2,3] 방사광 가속기가 국내에서 포항 한곳에만 있기에 이를 이용하는 시간에 제한이 있다. 그러므로 미

리 실험모델을 만들고 시료를 적출하여 보관한 후 가져가서 실험을 하면 이를 어느 정도 보완할 수가 있다고 생각되기에 이에 임상에서 조직의 보관을 위해 사용하는 포르말린과 액화질소, 그리고 생리식염수를 사용하여 신경조직을 보관한 후 실험을 시행할 시 이들 보존방법이 SAXS의 결과에 미치는 영향이 있는가를 조사할 필요가 있어 포항 가속기 4C1 SAXS 1 빔 라인에서 본 실험을 시행하였다. 그 결과 액화질소에 보관 한 경우에는 실험직전에 조직을 적출한 ex vivo 상태에서 SAXS 기법을 이용하여 측정된 결과와 비교 시 유사하였으나 포르말린과 생리식염수에 보관하는 방법을 사용한 경우에는 SAXS 패턴에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

본 연구에서 대조군은 SAXS를 이용하여 실험하기 직전에 궁둥신경을 적출하였다. 신경을 수직으로 거치한 후

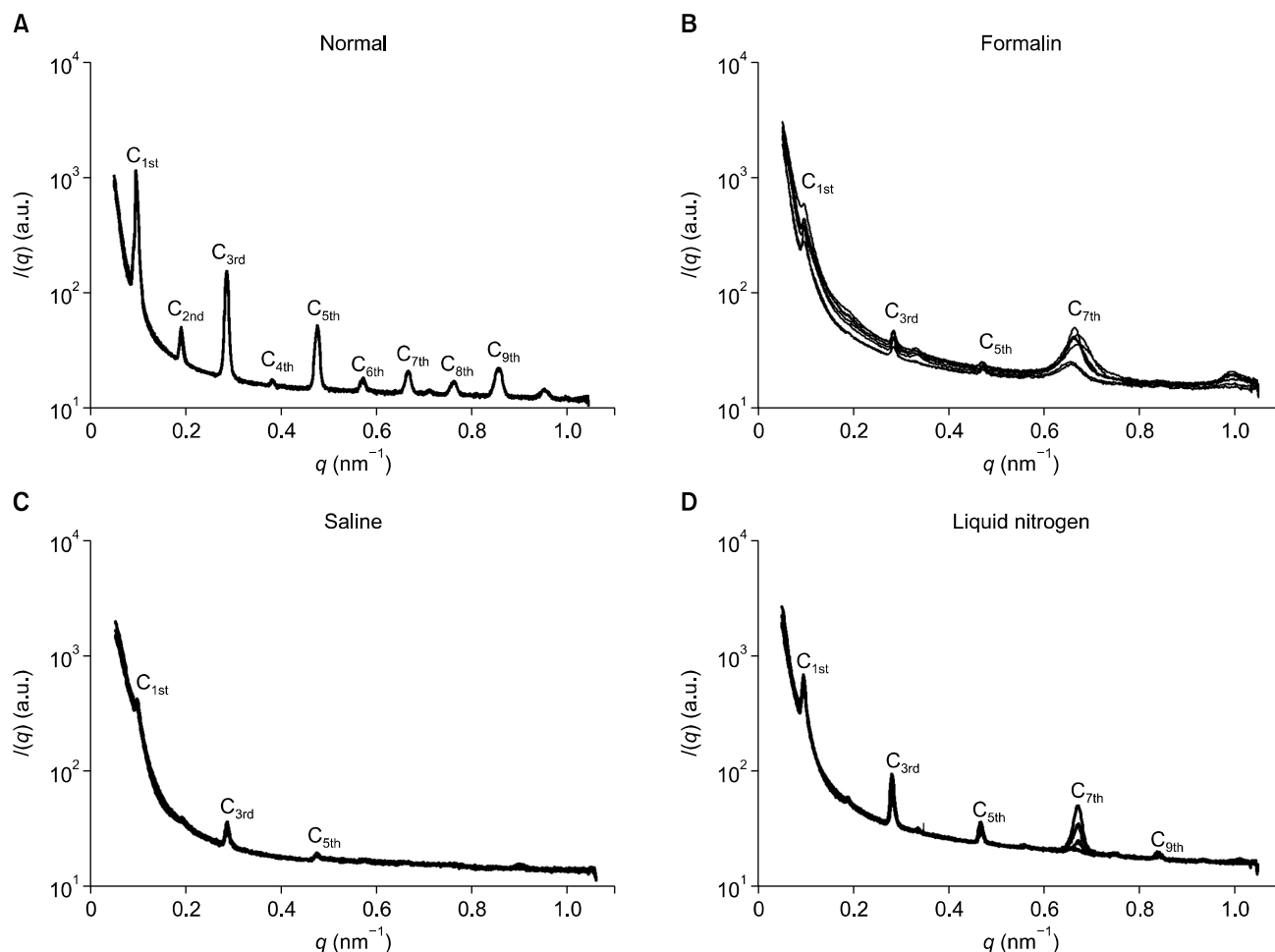


Fig. 2. One dimensional SAXS plot of nerve in ex vivo state (normal) and nerve preserved for one day in formalin, saline and liquid nitrogen (LN2) measured by using of SAXS at vertical direction. Collagen fiber was measured as 67 nm periodicity peak pattern (C_{1st} - C_{9th}) in ex vivo state (A). Periodic peaks, C_{1st} - C_{9th} , of the nerve preserved in formalin and saline were not measured and/or weak intensity (B, C). Periodic peaks and intensity, C_{1st} - C_{9th} , of the nerve preserved in liquid nitrogen were comparable to those of nerve in ex vivo state (D).

SXAS기법을 이용하여 수평방향으로 측정하면 수초와 콜라겐 섬유소간의 거리를 나타내는 회절 피크 패턴을 측정할 수 있으며 수직방향으로 측정하면 콜라겐 섬유를 측정할 수 있다. 수평방향에서 측정 시 18 nm의 주기성을 나타내는 회절 피크가 측정되었는데 이러한 회절 피크들은 수초의 이중 막(double membrane) 구조에 기인한다[6]. 수초는 40%의 수분, 지질(42-51%), 단백질(9-18%) 성분으로 구성되어 있는데, 단백질은 축삭돌기 주위를 동심원으로 감싸고 있는 얇은 판으로 존재하고 지질의 이분자 층들(two bimolecular layers)은 이웃한 단백질 층들 사이에 끼어 들어가 있는 특이한 구조이다. 또한 폭이 상당히 넓고 회절세기가 약한 66 nm의 주기성을 나타내는 회절 피크가 측정되었는데[7] 이러한 peak들은 수직으로 위치한 콜라겐 섬유소 사이의 간격(interfibrillar space)을 나타내는 것이다. 그리고 수직방향으로 측정한 결과 수평방향과 비슷하게 약 67 nm

의 주기성을 가지는 회절패턴을 보이고 있음이 측정되었는데 이는 신경 막을 이루고 있는 주성분인 콜라겐 섬유의 규칙적인 구조를 나타내는 것이다[8]. 콜라겐 섬유는 말단이 각각 탄소(C-terminal)와 질소(N-terminal)로 끝나는 길이 약 300 nm 정도의 콜라겐 마이크로 섬유 다발이 뭉쳐져서 형성되는데[9] 이들이 다발로 뭉쳐질 때, 각 말단이 서로 직접 연결되지 않고 틈새를 가지게 되어 중첩 영역(전자밀도가 높은 영역)과 갭 영역(전자밀도가 낮은 영역)이 반복적이고 규칙적인 특이한 구조를 형성하게 된다. 이 영역의 단위 길이(중첩영역 + 갭 영역)가 축 주기성에 해당하는 67 nm 이다. 콜라겐 섬유의 회절 피크들 중에서 Fig. 2A에서와 같이 특히 홀수 차수 회절 피크들이 매우 강한 세기가 측정되었다. 이것은 회절 피크 사이의 갭 영역이 미네랄 등으로 채워지지 않고 비어있음을 암시한다. 일반적으로 뼈 등과 같은 지지 구조체 조직의 경우에는 갭 영역은 무기질 미네랄

성분으로 채워지며 이때는 짝수 차수의 회절피크들의 상당한 세기가 나타난다[10].

실험 군에서 쥐 공동신경을 적출 후 알데하이드계열(0.1% GA + 4% PFA, 포르말린)을 사용하여 신경조직을 1 일 동안 보존한 후 SAXS기법을 이용하여 측정하였다. 광학 현미경이나 전자현미경을 이용하여 연구할 시에는 조직의 고정액으로 알데하이드계와 금속염 고정액(오스늄)이 사용된다. 특히 알데하이드계열의 용액은 현미경을 이용하여 조직을 검사할 시에 조직고정을 위하여 널리 사용되어 지고 있다. 이 용액을 사용할 시에는 세포의 성분 중 단백 응고와 침전, 조직의 경화를 유발시켜 조직의 자가용해를 방지하여 생체와 가깝게 만들 수 있기 때문이다. 알데하이드계 종류의 고정액으로는 글루타알데하이드(Glutaaldehyde, GA)와 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde, PFA)가 흔히 사용되고 있다. GA를 사용할 시에는 이 용액이 불안정하여 산(acid)을 만들기 쉽고, 불순물이 섞일 수가 있어 품질이 저하되고 고정작용이 떨어지는 단점이 있기에 PFA와 혼합하여 사용한다. PFA와 혼합하여 사용시 단백질 침전작용이 있어 단백질 보존효과가 우수하다. 특히 전자현미경을 이용할 경우 세포막 계의 보존이 좋고, 미세관, 아교질섬유, 탄력섬유 등이 선명하게 보이는 장점이 있다. 그러나 고정액의 침투가 나빠져, 조직이 부서지기 쉽고, 박절하기 곤란하다는 단점도 있다[11]. Changizi 등[12]에 의하면 유방암조직을 포르말린에 보존하여 SAXS기법을 이용하여 측정하는 방법은 조직병리학적인 수기로 부적절하다고 하였다. 본 연구상에서는 0.1% GA + 4% PFA를 사용하여 보존하여 SAXS기법을 이용하여 측정할 결과 콜라겐 섬유소 사이의 거리를 나타내는 회절 peak인 F_{1st} , F_{2nd} 가 측정되지 않았으며, 수초를 나타내는 M_{1st} , M_{2nd} 그리고 M_{3rd} 의 회절 peak가 측정된 것은 되었으나 세기가 매우 약하게 측정되었고 콜라겐 섬유의 회절 peak도 역시 세기가 약하게 측정되는 등 수초의 손상과 콜라겐 섬유소 사이의 거리의 손상 그리고 콜라겐 섬유소도 역시 손상된 것으로 측정되었는데 이러한 결과는 신경조직에 있는 단백질의 변화를 야기시켰기 때문이라고 생각된다.

생리식염수로 조직 보존하는 방법은 사용되고 있지는 않으나 가끔 타 보존 액으로 혼동하여 사용할 수가 있어 이의 적정성을 평가하였다. 생리식염수에 보존한 경우 수평방향과 수직 방향에서 측정되는 수초, 콜라겐 섬유소 간의 거리 그리고 콜라겐 섬유소 들을 측정한 SAXS 결과 콜라겐 섬유소 간의 거리를 나타내는 회절 peak는 측정되지 않았고, 수초를 나타내는 회절 peak의 세기 또한 매우 약하게 측정되었으며 콜라겐 섬유의 회절 peak의 세기들도 매우 약하게 측정되는 등 많은 손상이 발생하여 포르말린 보존 시와 같이 SAXS를 이용하여 연구 시 조직의 보존 방법이 적절하지 못하다는 결론을 얻었다. 이러한 원인은 생리식염수

에 의한 삼투압에 의한 조직손상에 의한 것으로 생각된다.

액화질소에 보존한 군에서는 액화질소에 보존하여 하루를 지난 후에 측정하였다. 액화질소에 보존하는 방법은 조직의 원형을 살리면서 급냉하는 방법이다. 이 방법을 사용할 시에는 조직의 준비과정이 없이 실험할 수가 있다. 그리고 큰 온도 변화 없이 일정 온도를 유지 할 수 있는 장점이 있다. 또한 저장온도가 세포활성화를 유지하기 위해서는 영하 150도를 유지하여야 하는데 액체질소에 담겨있는 시료의 온도는 영하 196도 이기에 세포의 변성이 유발되지 않는다[13]. Changizi 등에[14] 의하면 유방암 조직을 액화질소를 사용하여 조직을 보존하여 결과를 보고하였으며 이 방법이 적절하다고 하였다. 본 연구상에서도 수직과 수평방향에서 측정된 수초, 섬유소 간의 거리 그리고 콜라겐 섬유들을 나타내는 회절 피크와 세기가 방사광 가속기로 측정하기 직전에 조직을 적출하여 ex-vivo 상태로 측정한 경우와 비교 시 유사한 결과가 관찰되었다. 그러므로 SAXS기법을 이용하여 연구할 시에 차선의 방법이라고 생각된다.

수초는 스멕틱(가늘고 긴 분자가 그 장축을 일정 방향으로 향해 줄 서고, 옆줄 분자와 이음매가 서로 일치하는 상태)의 액정성 상태를(fluid-crystalline or liquid-crystalline nature) 가진다[6]. 그러므로 대부분의 신경은 실온에서 액정상태이므로 물리적, 화학적 시료 준비과정에 의해 구조가 변형되기도 한다[15]. 그러므로 본 연구에서는 적출한 공동신경을 폴리이미드 필름 사이에 끼워 넣은 후 잘 밀봉하여 측정하는 동안 수분의 증발에 의한 변형을 방지하였다.

결론적으로 본 연구 결과 포르말린과 생리식염수에 고정하는 방법을 사용한 경우에는 SAXS 패턴에 영향을 미치는 것으로 측정되었기에 이러한 방법을 사용하는 것이 부적절하다고 판단된다. 그러나 액화질소에 보관 했던 경우에는 실험직전에 조직을 적출하여 ex vivo 상태에서 측정한 SAXS 결과와 유사하다고 할 수 있다. 그러므로 SAXS기법을 이용하여 신경조직을 측정하고자 할 시에는 측정직전에 신경조직을 적출 혹은 노출하여 원형 그대로를 이용하는 것이 바람직하나 액화질소에 보관한 후 측정하여도 무방하다고 생각된다.

REFERENCES

- Kim BI, Kim KH, Youn HS, Jheon S, Kim JK, Kim H. High resolution X-ray phase contrast synchrotron imaging of normal and ligation damaged rat sciatic nerves. *Microsc Res Tech* 2008; 71: 443-7.
- Kim BI, Song SY, Ryu T, Choi YH, Jung JY, Shin TJ. Peripheral nerve injury caused by needle impalement: Synchrotron small-angle X-ray scattering study in ex-vivo rat sciatic nerve. *Anesth Pain Med* 2014; 9: 268-73.
- Lee TH, Lee S, Kim JH, Jung JY, Kim BI, Shin TJ. Analysis

- of ultrastructural changes in the rat sciatic nerve after exposure to pulsed radiofrequency using small angle X-ray scattering (SAXS). *Anesth Pain Med* 2014; 9: 209-16.
4. Erdine S, Bilir A, Cosman ER, Cosman ER Jr. Ultrastructural changes in axons following exposure to pulsed radiofrequency fields. *Pain Pract* 2009; 9: 407-17.
 5. McInnes E. Artifacts in histopathology. *Comp Clin Path* 2005; 13: 100-8.
 6. Schmit FO, Bear RS. The ultrastructure of the nerve axon sheath. *Biological Rev* 1939; 14: 27-50.
 7. Inouye H, Worthington CR. X-ray observations on a collagen fibril lattice structure in peripheral nerve. *Int J Biol Macromol* 1983; 5: 199-203.
 8. Avila RL, Inouye H, Baek RC, Yin X, Trapp BD, Feltri ML, et al. Structure and stability of internodal myelin in mouse models of hereditary neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 976-90.
 9. Suhonen H, Fernández M, Serimaa R, Suortti P. Simulation of small-angle x-ray scattering from collagen fibrils and comparison with experimental patterns. *Phys Med Biol* 2005; 50: 5401-16.
 10. Chen J, Burger C, Kirshnan CV, Chu B, Hsiao BS, Glimcher MJ. In vitro mineralization of collagen in demineralized fish bone. *Macromol Chem Phys* 2005; 206: 43-51.
 11. Kwon KY, Kim YH, Chung ES. Methodology of electron microscopy. Seoul, Jungmunkag. 2004, pp 23-7.
 12. Changizi V, Wilkinson S, Hall CJ, Grossmann G. A study of the effect of formalin preservation on normal and cancerous breast tissues using small angle X-ray scattering (SAXS). *Radiat Phys Chem* 2006; 75: 932-5.
 13. Jeon JP, Han BK. Towards the era of biobank. Seoul, World science publishing. 2009, pp 125-42.
 14. Changizi V, Oghabian MA, Speller R, Sarkar S, Kheradmand AA. Application of small angle X-ray scattering (SAXS) for differentiation between normal and cancerous breast tissue. *Int J Med Sci* 2005; 2: 118-21.
 15. McIntosh TJ, Worthington CR. The lamellar structure of nerve myelin after rehydration. *Arch Biochem Biophys* 1974; 162: 523-9.