ORIGINAL ARTICLE

Reaction of rat's connective tissue to injectable glass-ceramic-chitosan nanocomposite

Maryam Seyedmajidi[1],
Seyedmahmood Rabiee[2],
Gholamali Joorsaraee[3],
Seyedkamal Seyedmajidi[4],
Homayoun Alaghehmand[1],
Naghmeh Jamaatlou[5],
Neda Nazparvar[4],
Ali Bijani[6]

[1] DDS, MS, Associate Professor, Dental Materials Research Center, School of Dentistry, Babol University Medical Sciences, Babol, Iran
[2] PhD, Assistant Professor, Department of Materials Engineering, School of Mechanic Engineering, Babol University of Technology, Babol, Iran
[3] PhD, Associate Professor, Fatemeh Zahra Infertility and Reproductive Health Research Center, School of Medicine, Babol University Medical Sciences, Babol, Iran
[4] MSc, Engineer, Department of Materials Engineering, School of Mechanic Engineering, Babol University of Technology, Babol, Iran
[5] DDS, MS, Resident, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[6] MD, Non-Communicable Pediatrics Diseases Research Center, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received August 27, 2013; Accepted February 25, 2014)

Abstract

Background and purpose: The use of bioactive glass-ceramics in medicine has been noticed because of their ability in directly connection to bony tissue and bone repairing. Chitosan is also nontoxic material and biologically is compatible with the capability of biodegradation. However, due to the minimally invasive nature of injectable systems and their ability to make scaffold in place of using, they can take the shape of bone defect and eliminate the need for fabricated implants. The aim of this study was evaluation of rat's connective tissue reaction to injectable glass-ceramic-chitosan nanocomposite; it looks to be a good substitute synthetic material in filling bone defects and its production is possible in Iran.

Materials and methods: In this animal study, 40 rats were divided into 5 groups of 8. Polyethylene tubes filled with glass-ceramic-chitosan nanocomposite as case group and the empty tube as control group were implanted in subcutaneous tissue of rats. Biopsy samples from case and control sites were histologically examined after 7, 15, 30, 60, and 90 days and the number of inflammatory cells and blood vessels were counted. T and analysis of variance (ANOVA) tests were used to examine differences at the significance level of $P < 0.05$.

Results: Overall, no significant differences in severity of inflammation and vessel counts were found between case and control groups on different days ($P > 0.05$ for all).

Conclusion: It seems that injectable glass-ceramic-chitosan nanocomposite was biocompatible.

Keywords: Bioglass, ceramics, biocompatible materials, chitosan, inflammation

J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(110): 200-9 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۱۰ اسفند سال ۱۳۹۲ (۲۰۹-۲۰۰)

بررسی هیستوپاتولوژیک واکنش بافت همبند موش سفید بزرگ آزمایشگاهی به نانوکامپوزیت قابل تزریق شیشه سرامیک- کایتوسان

مریم سیدمجیدی[۱]
سید محمود ربیعی[۲]
غلامعلی جورسرایی[۳]
سیدکمال سیدمجیدی[۴]
همایون علاقه‌مند[۱]
نغمه جماعت‌لو[۵]
ندا نازپرور[۴]
علی بیژنی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از شیشه سرامیک بیواکتیو به جهت توانایی آن در پیوند مستقیم با بافت استخوانی در بازسازی و ترمیم استخوان از دست رفته، مورد توجه قرار گرفته است. کیتوسان نیز غیر سمی است و دارای قابلیت سازگاری بیولوژیکی و قابلیت تجزیه بیولوژیکی می‌باشد. از طرفی، سیستم‌های تزریق پذیر به علت حداقل تهاجمی بودن و توانایی ایجاد داربست‌هایی در محل کاربرد، می‌توانند شکل عیب استخوانی را به خود بگیرند و نیاز به ایمپلنت از پیش ساخته شده را از بین ببرند. لذا در تحقیق حاضر، واکنش نسج همبندی رت به نانوکامپوزیت تزریق پذیر شیشه سرامیک- کایتوسان که به نظر می‌رسد جانشین خوبی برای مواد صناعی پر کننده نقص‌های استخوانی باشد و با توجه به امکان تولید این ماده در ایران، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این پژوهش، یک مطالعه حیوانی بود که در آن ۴۰ موش صحرایی به ۵ گروه ۸تایی تقسیم شدند. لوله‌های پلی اتیلن پر شده با نانوکامپوزیت قابل تزریق شیشه- سرامیک- کایتوسان، به عنوان گروه مورد و لوله‌های خالی به عنوان گروه شاهد در بافت همبند زیر جلدی موش‌های سفید بزرگ کاشته شد. نمونه‌های بیوپسی از نواحی مورد و شاهد پس از ۷، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز، مورد بررسی هیستولوژیک قرار گرفتند و تعداد سلول‌های التهابی و رگ‌های خونی شمارش شد. برای بررسی تفاوت‌ها از آزمون‌های آماری t و Analysis of variance (ANOVA) در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵۰$ استفاده شد.

یافته‌ها: به طور کلی، اختلاف معنی‌داری در شدت التهاب بین دو گروه مورد و شاهد در روزهای مختلف دیده نشد. این مسأله در مورد تعداد رگ خونی نیز صادق بود ($P > ۰/۰۵۰$).

استنتاج: به نظر می‌رسد که ماده پیش‌گفته، از سازگاری نسجی خوبی برخوردار است.

واژه های کلیدی: شیشه زیستی، سرامیک‌ها، مواد دارای زیست سازگاری، کیتوزان، التهاب

مولف مسئول: سیدکمال سیدمجیدی- بابل: دانشگاه صنعتی بابل، دانشکده مهندسی مکانیک، گروه مهندسی مواد. E-mail: sks_majidi86@yahoo.com

۱. دانشیار، مرکز تحقیقات مواد دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۲. استادیار، گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی بابل، بابل، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت باروری و ناباروری فاطمه الزهرا (س)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۴. کارشناس ارشد، گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی بابل، بابل، ایران
۵. دستیار تخصصی، گروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۶. پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۸/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۲/۶

مقدمه

بازسازی و ترمیم استخوان از دست رفته در انسان از زمان‌های دور مورد توجه جراحان بوده است. آنان پیوسته در جستجوی موادی بودند که بتوانند به عنوان جانشین مناسب، نقایص استخوانی را بر طرف کنند. ماهیت استخوان شامل کامپوزیت پلیمری و نانو ذرات کلسیم فسفاتی می‌باشد. مواد مختلفی به عنوان جایگزین بافت استخوان مورد توجه قرار گرفته‌اند. هر چند که اتوگرفت و آلوگرفت، مطرح‌ترین جایگزین استخوانی می‌باشند؛ اما معایب زیادی از آن‌ها گزارش و سبب شده است که توجه پزشکان و دندانپزشکان به سمت جایگزین‌های مصنوعی استخوان و مهندسی بافت استخوان معطوف شود. مواد بیواکتیوی نظیر هیدروکسی آپاتیت، شیشه‌های بیواکتیو (بیوگلس)، شیشه- سرامیک‌های بیواکتیو، کامپوزیت‌های پلیمری و پوشش‌های بیواکتیو بر روی آلیاژهای تیتانیومی مورد توجه بوده‌اند و پس از تحقیقات فراوان، به صورت تجاری در اختیار جراحان قرار گرفته‌اند. شیشه- سرامیک بیواکتیو دسته مهمی از مواد جایگزین بافت استخوان می‌باشند که به جهت توانایی در پیوند مستقیم با بافت استخوانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲، ۱).

تجزیه شبکه شیشه منجر به تشکیل لایه ژل غنی از سیلیکا و در نهایت تشکیل لایه آپاتیت زیستی بر سطح شیشه می‌شود. تشکیل لایه آپاتیت زیستی مشابه بافت استخوانی به پارامترهای مورفولوژیکی مانند سطح مخصوص، اندازه تخلخل‌ها و ترکیب شیشه بستگی دارد. البته نانو بودن این ذرات سبب افزایش سطح مخصوص بیشتر می‌شود و افزایش پتانسیل استئوژنیک شیشه- سرامیک را به همراه خواهد داشت (۴، ۳).

استفاده از کایتوسان در ترکیب ماده، مزیت دیگری می‌باشد. کایتوسان یک پلیمر خطی با ساختار ساکاریدی است و از هیدرولیز پلیمر طبیعی کیتین به دست می‌آید. کیتین یک پلی‌ساکارید با ساختار آرتروپد (*Arthropods*) و دومین پلی‌ساکارید فراوان طبیعی بعد از سلولز می‌باشد. این پلیمر طبیعی از منابع دریایی (خرچنگ‌ها و به طور کلی سخت پوستان) استخراج می‌شود (۶، ۵). کایتوسان به دلیل وجود گروه‌های آمینی و همچنین طبیعی بودن، از ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله قابلیت سازگاری بیولوژیکی، قابلیت تجزیه بیولوژیکی، فعالیت ضد میکروبی، ترمیم زخم و تسریع بهبود تا ۷۵ درصد، اثرات ضد تومور، غیر سمی بودن و سازگاری با ژن‌ها برخوردار است (۸-۶).

از طرف دیگر، امروزه در بسیاری از جراحی‌ها استفاده از مواد تزریق پذیر در دستور کار قرار گرفته است. نتایج این تلاش‌ها بسیار مطلوب بوده و چشم‌انداز بسیار روشنی را در این زمینه در پیش روی جراحان قرار داده است؛ چرا که این مواد، امکان بازتولید استخوان با حداقل ایجاد ناراحتی را در بیمار نسبت به روش‌های مرسوم دارد. در حقیقت، سیستم‌های تزریق پذیر به علت حداقل تهاجمی بودن آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۹). در واقع، استفاده از سیستم‌های تزریق پذیر در کاربردهای مهندسی بافت، می‌تواند با ایجاد داربست‌هایی در محل، شکل عیب استخوانی را به خود بگیرند و نیاز به ایمپلنت از پیش ساخته شده را از بین ببرند. عوامل دیگری هم وجود دارد که این توجه را دوچندان می‌نماید. برای مثال، در بسیاری موارد به تعلیق سلول‌ها در سیستم نیاز است که این امر به علت جامد نبودن ماده پیش از تزریق، امکان پذیر می‌باشد (۱۰). با کمی دقت به راحتی می‌توان به این نکته دست یافت که این سیستم‌ها چه در مهندسی بافت و چه در رهایش دارو، بسیار حایز اهمیت هستند. در واقع، این سیستم‌ها مراحل مربوط به عملیات جراحی را تا حد ممکن کم می‌نمایند و در نهایت، یک عملیات با حداقل تهاجم شامل تزریق ماده را در بر می‌گیرند. همچنین این مواد شکل موضعی را که به آن تزریق شده‌اند، به خود می‌گیرند و به همین دلیل، در تمام مواضع حتی با شکل غیر منظم هم می‌توانند استفاده شوند. این در حالی است که مشکل چسبندگی سلول و رهایش مولکول‌های بیواکتیو از طریق مخلوط کردن آن‌ها پیش از تزریق مرتفع می‌شود (۱۲، ۱۱).

مواد مورد استفاده برای پیوند استخوان، به دو گروه طبیعی و صناعی تقسیم می‌شوند. گرافت‌های استخوانی طبیعی با استفاده از

استخوان اتوژن انجام می‌شود که به دلیل عدم واکنش ایمونولوژیک بعد از جراحی و قابلیت بسیار بالا در استدوژنیسیتی، به عنوان Gold standard جهت ترمیم و رژنراسیون استخوان شناخته شده‌اند. اگر چه گرافت‌های استخوانی اتولوگ Osteoinductivity و Osteoconductivity به طور موفقیت‌آمیزی باعث رژنراسیون استخوان می‌شوند، اما نیاز به جراحی مهاجم اضافی دارند که باعث مرگ و میر محل دهنده، درد بعد از عمل، افزایش حساسیت و عفونت می‌گردد.

عیب دیگر آن‌ها، محدودیت دسترسی است؛ برخلاف استخوان اتوژن، گرافت‌های زنوژن و آلوژن به طور گسترده‌ای در دسترسند و نیاز به جراحی اضافی بر روی بیمار ندارد؛ اما انجام لیوفیلیزاسیون، Irradiation و Freez-drying جهت برداشت پروتئین‌های ایمونوژنیک لازم است. این روش‌ها اثر منفی روی مواد Osteoinductivity و Osteoconductivity دارند. گرافت‌های صناعی به طور گسترده‌ای در دسترسند؛ باعث ایجاد پاسخ آنتی‌ژنیک نمی‌شوند و می‌توانند به آسانی استفاده گردند. به هر حال، قابلیت بیولوژیکی گرافت‌های استخوانی صناعی به منظور شروع حمایت از رشد استخوان، کمتر از گرافت‌های استخوان طبیعی می‌باشد. در دهه گذشته، تعداد زیادی سرامیک صناعی را در سگ، هیدروکسی آپاتیت سرامیک مشتق از مرجان‌ها را در سگ، میمون، بابون و ... نشان داده‌اند. علاوه بر این، سمان‌های کلسیم- فسفات، این خاصیت را در مدل‌های مختلف حیوانی نشان داده‌اند. البته این خاصیت در شیشه- سرامیک‌ها نیز دیده شده است. آن‌ها توانایی شرکت در لایه کلسیم- فسفات سطحی را در محیط غنی از فسفات و کلسیم دارند و به طور in vivo تشکیل استخوان اکتوپیک و کلسیفیکاسیون با آن‌ها دیده شده است (۱۳).

در بررسی مقالات انگلیسی زبان، تنها به مقاله Asikainen در این زمینه می‌توان اشاره کرد. وی واکنش بافت نرم زیر پوست خرگوش را در استفاده از مش‌های شیشه زیستی فیکس شده به کایتوسان ۳ درصد وزنی را پس از ۶، ۱۲ و ۲۴ هفته بررسی نمود. در استفاده از این ماده، پس از ۶ هفته، واکنش جسم خارجی مشاهده شد. پس از ۱۲ و ۲۴ هفته به طور تقریبی تمام ماده استفاده شده، جذب شده بود و در مواردی که کمی از آن باقی مانده بود، واکنش التهابی خفیف‌تری دیده شد (۱۴). البته فدراسیون جهانی دندانپزشکی و اداره استاندارد آمریکا برای بررسی زیست سازگاری کوتاه و بلند مدت دندانی، به صورت کاشت زیر جلدی آن‌ها، بررسی هیستولوژیک زمان‌های ۷، ۱۴، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز را لازم می‌دانند (۱۶، ۱۵).

به نظر می‌رسد نانوکامپوزیت تزریق پذیر شیشه- سرامیک- کایتوسان، جانشین خوبی برای مواد صناعی پر کننده نقص‌های استخوانی باشد؛ زیرا در پژوهش دیگری، با استفاده از آنالیزهای (Scaning electron microscope) SEM، TEM (Transmission electron microscope)، XRD (X-ray powder diffraction) و FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) ترکیب، مورفولوژی و میزان کریستال‌های آن مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

تصاویر TEM و SEM حاکی از آن بود که اندازه ذرات بین ۴۰-۱۰ نانومتر است. همچنین فعالیت زیستی آن توسط SEM و XRD به دلیل لایه غنی آپاتیت شبه استخوانی تأیید شد. از این رو با توجه به جدید بودن این ماده و امکان تولید آن در ایران، در تحقیق حاضر واکنش نسج همبندی رت در زمان‌های توصیه شده، جهت بررسی زیست سازگاری این ماده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مراحل ساخت نمونه

سنتز شیشه- سرامیک

جهت سنتز شیشه- سرامیک کلسیم فسفاتی به روش سل- ژل از ترکیبات پایه‌ای نظیر تری اتیل فسفات و دی آمونیوم فسفات جهت تأمین P_2O_5 موجود در ترکیب شیشه، نیترات کلسیم تترا هیدرات به عنوان منبع تهیه CaO، اسید نیتریک و اسید فسفریک، به عنوان محیط سل و تترا اتیل اورتو سیلیکات به عنوان منبع تأمین SiO_2 استفاده شد. سل تهیه شده در یک ظرف تفلونی ایزوله شده برای مدت ۱۰ روز نگهداری شد تا

عملیات پلی کندانسیون و تشکیل ژل آغاز شود و ژل تشکیل گردد. ژل به دست آمده، تحت عملیات حرارتی خاص در خشک کن و کوره الکتریکی قابل برنامه‌ریزی قرار داده شد تا علاوه بر خروج گازها و بخارات موجود، عملیات کریستالیزاسیون بر روی نمونه انجام گیرد و نمونه به شیشه- سرامیکی با ابعاد نانو تبدیل گردد.

تهیه محلول کایتوسان بهینه

در این مرحله، جهت تزریق پذیری از یک محلول پلیمری استفاده شد. جهت آماده‌سازی کامپوزیت شیشه- سرامیک زیستی به صورت تزریق پذیر از محلول کایتوسان استفاده شد. در این راستا، اسید استیک به عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت. سپس جهت ایجاد بهترین کامپوزیت از نظر تزریق پذیری که در عین حال از قوام مناسبی برخوردار باشد، درصدهای مختلف کایتوسان در حلال آماده‌سازی شدند.

نانو کامپوزیت کایتوسان- شیشه- سرامیک

این مرحله شامل تشکیل کامپوزیت نهایی است که در آن با اختلاط دو جزء تعریف شده نانو ذرات پودری و محلول کایتوسانی، غلظت مطلوب جهت تزریق پذیری و کار پذیری به دست می‌آید. در این راستا، به صورت تجربی مقادیر مختلف از نانو ذرات شیشه- سرامیک در مقادیر متفاوت از کایتوسان افزوده شدند. سپس بهترین ترکیب از نظر تزریق پذیری انتخاب شد. نتایج نشان داد که اگر نسبت محلول کایتوسان ۲ درصد به پودر شیشه- سرامیک برابر با ۱/۲ ml/gr باشد، نمونه از لحاظ مهندسی جهت بررسی‌های کلینیکی مناسب می‌باشد.

جهت استریل کردن ماده سنتز شده، از روش اتوکلاو استفاده گردید. ساختار سخت دی گلوکز آمین، تبلور بالا و شبکه‌های سه بعدی باندهای هیدروژنی بین مولکول‌ها در پلیمر کایتوسان، منجر به مقاومت خوب این ماده تا دمای ۲۰۰ $^{\circ}C$ می‌گردد. همچنین جزء معدنی این کامپوزیت که در حدود دمای ۱۰۰۰ $^{\circ}C$ سنتز شده است، توانایی اتوکلاو را بدون از دست دادن ماهیت و خواص خود دارد. به همین علت، نمونه پس از این که به طور کامل ایزوله شد، در دستگاه اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۰ $^{\circ}C$ استریل گردید. نتایج نشان می‌دهد که در این محدوده، خواص کامپوزیت هیچ گونه تغییری نمی‌کند.

ماهیت بافت سخت به گونه‌ای است که در آن دو جزء متفاوت پلیمری و سرامیکی به طور مشهودی به چشم می‌خورد. در این راستا، بهترین جایگزین، مواد سنتزی شبیه‌سازی شده با ترکیب کامپوزیتی بافت سخت می‌باشد. در حقیقت، قسمت پلیمری و سرامیکی به عنوان دو جزء مختلف در کنار هم قرار می‌گیرند و هر یک خواص منحصر به فرد خود را حفظ می‌نمایند و هیچ واکنش شیمیایی در این بین رخ نمی‌دهد و تنها یک مخلوط شدن فیزیکی اتفاق می‌افتد. قسمت معدنی این کامپوزیت شامل نانو ذرات شیشه- سرامیک کلسیم فسفاتی است که توانایی استخوان‌سازی را دارد. همچنین فاز آلی کایتوسانی به عنوان حامل و عامل تزریق پذیری کامپوزیت سبب می‌شود که ذرات معدنی بتوانند در کنار یکدیگر قرار بگیرند. این فاز، به علت ماهیت چسبنده‌اش مانع از مهاجرت و پراکندگی ترکیبات معدنی می‌گردد.

مراحل جای‌گذاری ماده

چهل موش صحرایی بالغ نر به وزن تقریبی ۲۵۰ گرم و سن ۸-۶ هفته از نژاد ویستار با تیوپنتال سدیم بیهوش شدند و برای حفظ بیهوشی از دی اتیل اتر استفاده شد. برای سنجش بیهوشی از Pedal Reflex استفاده گردید؛ به این صورت که اندام تحتانی حیوان به طرف خارج کشیده می‌شد و یک تحریک دردناک با نوک سوند یا سوزن روی پوست آن وارد می‌گردید. درصورتی که حیوان واکنش نشان نمی‌داد، عمق بیهوشی مناسب در نظر گرفته می‌شد. پس از تراشیدن موی پشت آن‌ها و تمیز کردن محل با محلول یداین ۵ درصد، دو شیار به طول ۱ cm با تیغ بیستوری شماره ۱۵ در دو طرف و در جهت محور طولی ستون مهره‌ها ایجاد گردید و در یک طرف (سمت راست)، ماده مورد آزمایش در لوله

پلی اتیلنی آنژیوکت به طول ۸ mm و عرض ۱/۱ mm در محل برش زیر جلد روی فاسیای عضلات قرار داده شد و در برش دیگر (سمت چپ)، لوله پلی اتیلنی آنژیوکت با همان طول و قطر بدون ماده‌ای قرار داده شد که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

پس از ۷، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز به ترتیب یک گروه ۸تایی از حیوانات، بیهوش و ناحیه قرارگیری ماده با اندازه مستطیلی به طول ۲ cm و عرض ۱/۵ cm به صورت Enblock شامل پوست و فاسیای عضلات برداشته شد. نمونه‌ها به مدت ۲ هفته در فرمالین بافر ۱۰ درصد نگهداری شدند. پس از تهیه بلوک‌های پارافینه، مقاطع طولی قرارگیری ماده به ضخامت ۶ میکرون (به طوری که از ماده مورد نظر عبور کند)، تهیه و با H&E (Haemotoxylin and Eosin) رنگ‌آمیزی شد.

بررسی مقاطع توسط یک پاتولوژیست که از محتوای اسلایدهای میکروسکوپی آگاه نبود، با میکروسکوپ نوری Olympus BX۴۱ (Japan, Tokyo) انجام پذیرفت و تعداد سلول‌های التهابی (لنفوسیت، پلاسموسیت، پلی مورفو نوکلئرها، ماکروفاژ و ژانت سل) در ۳ منطقه جداگانه در بزرگ‌نمایی ۴۰ × شمارش شدند و میانگین آن برای هر مورد به دست آمد (۱۸، ۱۶، ۱۵).

همچنین بعد از بررسی تمامی مناطق مورد نظر در اسلایدها (منطقه قرارگیری لوله‌ها) با بزرگ‌نمایی ۱۰ × و انتخاب نواحی با بیشترین تعداد رگ، تراکم رگ‌های خونی در سه میدان میکروسکوپی شمارش و میانگین آن بیان شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آماری Paired t و Analysis of variance (ANOVA) واکاوی شد.

یافته‌ها

میانگین تعداد سلول‌های التهابی و تعداد عروق خونی به وجود آمده در اطراف لوله‌های حاوی نانو کامپوزیت شیشه- سرامیک- کایتوسان جای‌گذاری شده در بافت زیر جلدی رت‌ها، پس از ۷، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز در جداول شماره ۱ و ۲ آمده است (تصاویر شماره ۱ و ۲). لازم به ذکر است که دو رت از گروه‌های چهارم و پنجم در طی دوره آزمایش از دست رفتند.

با استفاده از آزمون Paired t اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد و شاهد از نظر شدت التهاب پس به دست نیامد (P = ۰/۴۰۴). این نتیجه در مورد تعداد عروق خونی هم حاصل شد (P = ۰/۴۷۲).

البته همبستگی آماری مثبتی بین تعداد عروق خونی و شدت التهاب در کل به دست آمد (P = ۰/۰۲۵ و r = ۰/۳۶۴). اگر چه در بررسی تک‌تک روزها از نظر آماری نتیجه معنی‌داری حاصل نشد (P > ۰/۰۵۰).

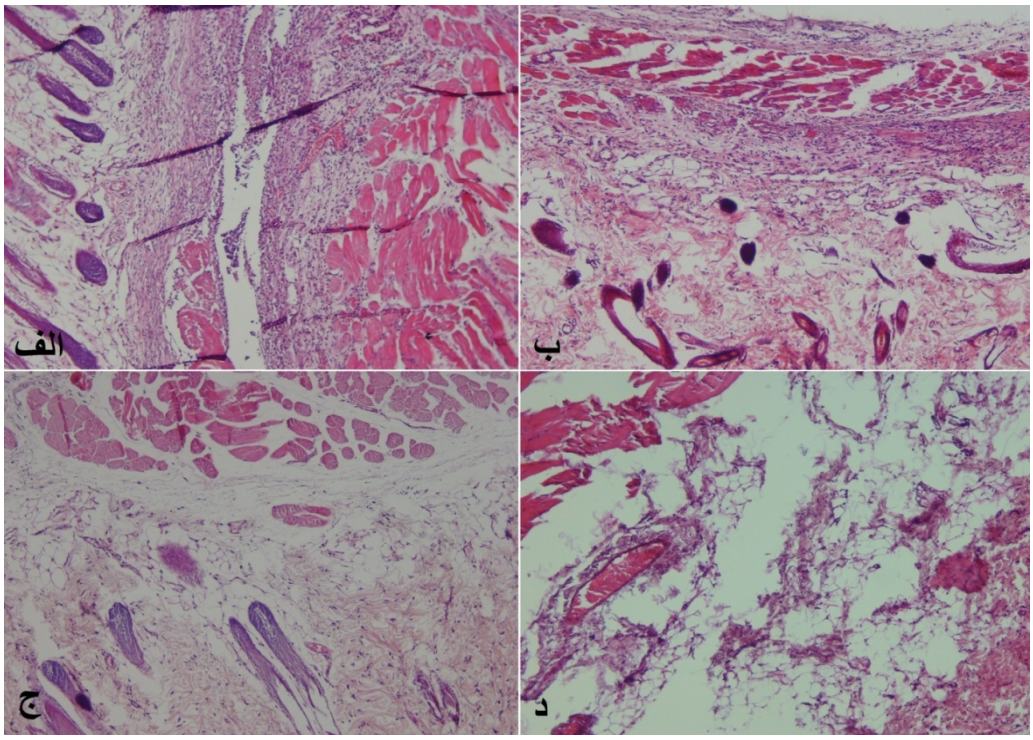
با انجام One-Way ANOVA، تفاوت میانگین تعداد سلول‌های التهابی و تعداد رگ در روزهای مختلف بررسی شد. اگر چه در روزهای مختلف میانگین تعداد سلول‌های التهابی و رگ با کاهش روبه‌رو بود، اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P > ۰/۰۵۰).

جدول شماره ۱: تعداد سلول‌های التهابی در اطراف لوله‌های حاوی نانو کامپوزیت شیشه- سرامیک- کایتوسان در دو ناحیه

روز بررسی	تعداد رت	تعداد سلول‌های التهابی (میانگین ± انحراف معیار)		P
		ناحیه مورد	ناحیه شاهد	
۷	۸	۱۶/۱۶ ± ۱۸/۶۳	۱۵/۲۴ ± ۲۴/۶۵	۰/۸۹۹
۱۵	۸	۸/۷۵ ± ۵/۲۰	۶/۵۸ ± ۴/۰۲	۰/۳۵۲
۳۰	۸	۱۰/۱۲ ± ۳/۹۸	۷/۳۷ ± ۲/۷۵	۰/۰۶۵
۶۰	۷	۴/۹۰ ± ۳/۲۷	۴/۲۸ ± ۱/۳۵	۰/۶۸۱
۹۰	۷	۲/۹۵ ± ۱/۴۱	۳/۳۳ ± ۱/۱۷	۰/۶۰۲

جدول شماره ۲: تعداد عروق خونی در اطراف لوله‌های حاوی نانو کامپوزیت شیشه- سرامیک- کایتوسان در دو ناحیه

روز بررسی	تعداد رت	تعداد عروق خونی (میانگین ± انحراف معیار)		P
		سمت مورد	سمت شاهد	
۷	۸	۳/۰۸ ± ۲/۰۶	۲/۵۸ ± ۲/۶۸	۰/۷۱۴
۱۵	۸	۳/۴۱ ± ۳/۲۷	۲/۶۲ ± ۲/۰۵	۰/۵۱۲
۳۰	۸	۲/۵۸ ± ۱/۳۳	۲/۴۹ ± ۱/۴۹	۰/۹۰۹
۶۰	۷	۱/۹۰ ± ۰/۴۹	۱/۷۱ ± ۰/۵۵	۰/۵۱۰
۹۰	۷	۱/۷۶ ±۰/۴۹	۱/۹۹ ± ۰/۹۴	۰/۴۶۵



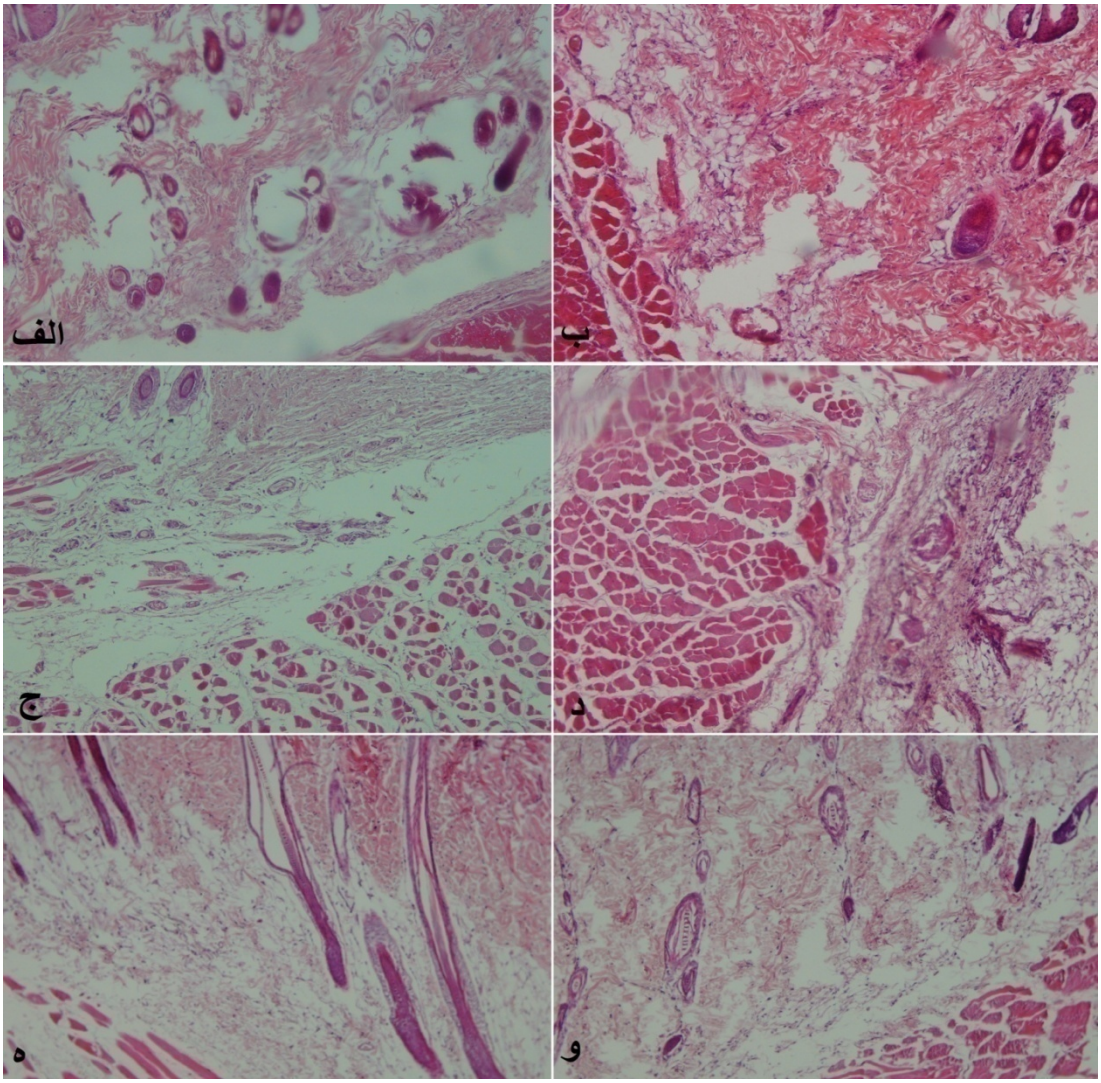
تصویر شماره ۱: نمای هیستوپاتولوژیک اطراف لوله‌های حاوی نانو کامپوزیت شیشه- سرامیک- کایتوسان و لوله‌های شاهد جای‌گذاری شده در بافت زیر جلدی رت‌ها پس از ۷ و ۱۵ روز (الف: ناحیه مورد پس از ۷ روز، ب: ناحیه شاهد پس از ۷ روز، ج: ناحیه مورد پس از ۱۵ روز، د: ناحیه شاهد پس از ۱۵ روز)

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوکامپوزیت قابل تزریق شیشه- سرامیک- کایتوسان دارای سازگاری نسجی خوبی است؛ به طوری که در هیچ یک از دوره‌های مورد بررسی (زمان‌های ۷، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز) تفاوت آماری مشخصی با گروه شاهد از نظر تعداد عروق خونی و شدت التهاب دیده نشد.

از مهم‌ترین خصوصیات ماده پر کننده نقص‌های استخوانی می‌توان به سازگاری زیستی اشاره نمود. با توجه به این که مواد مورد استفاده در ترمیم و بازسازی استخوان در بدن به کار می‌روند، نیاز به مصرف مواد دارای سازگاری نسجی، ضرورت کاربرد این گونه تحقیقات را اثبات می‌کند.

سازگاری زیستی، توانایی یک ماده برای ایجاد پاسخ بیولوژیک مناسب هنگام کاربرد مشخص در بدن می‌باشد. اولین تحقیقات در این زمینه به سال ۱۹۲۶ بر می‌گردد که دفتر بین‌المللی استاندارد به بررسی اختصاصی آمالگام دندانی پرداخت. به نقل از Craig و Powers سایر کوشش‌های اولیه جهت استاندارد کردن تحقیقات سازگاری نسجی توسط Mishel با استفاده از بافت همبند زیر جلدی و توسط Masler با استفاده از پالپ انجام شد (۱۹).



تصویر شماره ۲: نمای هیستوپاتولوژیک اطراف لوله‌های حاوی نانو کامپوزیت شیشه- سرامیک- کایتوسان و لوله‌های شاهد جای‌گذاری شده در بافت زیر جلدی رت‌ها پس از ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز (الف: ناحیه مورد پس از ۳۰ روز، ب: ناحیه شاهد پس از ۳۰ روز، ج: ناحیه مورد پس از ۶۰ روز، د: ناحیه شاهد پس از ۶۰ روز، ه: ناحیه مورد پس از ۹۰ روز، و: ناحیه شاهد پس از ۹۰ روز)

در سال ۱۹۷۲ شورای مواد دندانی لایحه شماره ۴۱ را جهت استاندارد کردن بررسی‌های بیولوژیک مواد دندانپزشکی تصویب کرد. این لایحه کلیه تحقیقات در این زمینه را در سه سطح دسته‌بندی کرد که شامل آزمایش‌های اولیه (بر روی محیط‌های کشت سلولی)، آزمایش‌های ثانویه (روی حیوانات آزمایشگاهی) و آزمایش‌های کاربردی (روی انسان یا حیوان با شرایط مشابه بالینی) بودند. آزمایش‌های حیوانی در مورد سازگاری نسجی که اغلب بر روی پستاندارانی نظیر موش، خرگوش، خوکچه هندی و غیره صورت می‌گیرد، اجازه بروز بسیاری از واکنش‌های پیچیده نظیر پاسخ ایمنی و یا فعال شدن سیستم کمپلمان و غیره را می‌دهد که امکان بروز چنین واکنش‌هایی در سیستم کشت سلولی وجود ندارد. بنابراین، پاسخ‌های بیولوژیک در آزمون‌های حیوانی، جامع و کامل‌تر از آزمایش‌های سلولی می‌باشد (۲۰).

روش‌های متداول جهت بررسی زیست سازگاری مواد شامل بررسی سمیت سلولی (۲۰)، کاشت زیر جلدی (۲۱)، کاشت داخل استخوانی (۲۳، ۲۲) و بررسی واکنش بافت‌های اطراف ریشه نسبت به ماده قرار داده شده (۲۵، ۲۴) می‌باشد. در مطالعه حاضر، از روش کاشتن زیر جلدی استفاده شد و ماده

مورد مطالعه در لوله‌های پلی اتیلن به صورت زیر جلدی در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی کاشته شدند. این روش، اولین بار توسط Torneck جهت بررسی زیست سازگاری مواد در دندانپزشکی استفاده شد (۲۶). Olsson و همکاران بعدها در سال ۱۹۹۸ کارایی این روش را مورد بازبینی قرار دادند و اثبات نمودند (۲۷).

در بررسی‌های اولیه، ماده به طور مستقیم در نسج نرم حیوانات آزمایشگاهی قرار داده می‌شد (۲۹، ۲۸). نقطه ضعف این روش در این بود که منطقه به نسبت زیادی از مواد در تماس با بافت قرار می‌گرفت که در نتیجه می‌توانست واکنش فوری شدیدی ایجاد نماید. بنابراین، توصیه شد که مواد مورد بررسی در داخل یک حامل جهت جای‌گذاری زیر پوستی قرار گیرند. وقتی این روش با جای‌گذاری مستقیم ماده مقایسه می‌شود، به نظر می‌رسد که این روش به ثبات ماده در جای خود کمک می‌نماید و سطح تماس استانداردی از ماده- بافت‌ها را به دست می‌دهد (۳۰، ۲۱). مطالعات قبلی از تیوب‌های سیلیکون (۳۱)، تفلون (۳۲، ۲۸) و پلی اتیلن (۳۳، ۳۰) نیز به عنوان حامل ماده استفاده نموده‌اند. با بررسی بافت‌شناسی نسوجی که در مجاورت این مواد قرار می‌گیرند، می‌توان سازگاری نسجی این مواد را مشخص نمود.

در مطالعه حاضر، میزان التهاب و تعداد عروق خونی در اطراف تیوب‌های پلی اتیلن پر شده با نانو کامپوزیت شیشه- سرامیک- کایتوسان قرار داده شده زیر پوست رت مورد بررسی قرار گرفت. جهت گروه شاهد از همین تیوب‌ها به صورت خالی استفاده شد. وجود این تیوب‌ها باعث می‌گردید که مواد در مدت مطالعه در بافت پخش نشود و شرایطی مناسب را ایجاد نماید. جهت نمونه‌برداری از نقطه مشخصی یعنی دو سر تیوب، مقطع بافت‌شناسی تهیه شد. از این رو، روش پیش‌گفته نسبت به تزریق زیر جلدی ماده ارجحیت دارد.

فاصله‌های زمانی انتخاب شده در مطالعه‌ی حاضر (۷، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز) بر اساس زمان‌های پیشنهادی فدراسیون جهانی دندانپزشکی می‌باشد که توسط آن واکنش التهابی کوتاه و بلند مدت را بتوان ارزیابی نمود (۳۵، ۳۴).

جهت بررسی واکنش‌های التهابی از روش‌های مختلفی استفاده شده است. یکی از روش‌ها که توسط Cox و همکاران ارایه شده است، به بررسی تراکم سلول‌های التهابی، وجود پاسخ‌های بافتی مثل فیبروز، پاسخ‌های عروقی مانند احتقان و فیبرین خارج عروقی جهت تعیین شدت پاسخ التهابی می‌پردازد که جهت تعیین التهاب پالپ، قرار دادن ماده پوشاننده پالپی پیشنهاد شده است (۳۶).

شاهی و همکاران از این روش جهت بررسی التهاب بافت زیر جلدی موش استفاده نموده‌اند (۳۷) که به نظر می‌رسد به دلیل تفاوت نسج پالپ و نسج همبندی زیر جلدی موش، خالی از اشکال نباشد. به این دلیل، در مطالعه حاضر از شمارش سلول‌های التهابی انفیلتره شده در میدان‌های مختلف میکروسکوپی استفاده شد. این روش به عنوان روش استاندارد جهت ارزیابی بیولوژیکی مواد دندانی پیشنهاد شده است.

در مطالعه حاضر، در هیچ موردی سلول ژانت مشاهده نشد؛ زیرا به نظر می‌رسد که میزان سلول ژانت در داخل بافت، ارتباط نزدیکی با اندازه ذرات جسم خارجی دارد و دلیل بر عدم تحمل بافتی یک ماده به طور صد در صد نمی‌باشد. این امر تنها بیانگر این موضوع است که بدن می‌تواند این ماده را به عنوان جسم خارجی شناسایی نماید (۳۸). البته شاید بتوان عدم حضور سلول ژانت را به استفاده از ماده در مقیاس نانو در تحقیق حاضر نسبت داد. البته تأثیر نانو ذرات بر سلامت انسان و محیط اطرافش به طور کامل مشخص نشده است. ذرات نانو، توانایی عبور از غشاهای بیولوژیک را دارند و به همین دلیل، احتمال آن می‌رود که توانایی تأثیر بر سلول‌های بدن را داشته باشند (۳۹). از این رو، مطالعات بیشتر در زمینه بررسی این تأثیرات بر سلول‌های بدن انسان پیشنهاد می‌گردد.

با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌دار در شدت التهاب و تعداد رگ خونی بین دو ناحیه مورد و شاهد در روزهای مختلف و کاهش در شدت التهاب در طول دوره مطالعه، به نظر می‌رسد که ماده مورد مطالعه از سازگاری نسجی خوبی برخوردار است. بنابراین انجام آزمایش‌های تکمیلی جهت بررسی بیشتر این ماده از نظر قابلیت استفاده از آن در بدن انسان به عنوان ماده مؤثر در ترمیم استخوان پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه، حاصل طرح تحقیقاتی مصوب شورای محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل به شماره ۸۹۲۹۹۲۵ می‌باشد و هزینه آن توسط معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی بابل پرداخت شده است. بدین وسیله از این معاونت تشکر می‌گردد. همچنین از همکاری جناب آقای عبید محمدی در تهیه اسلایدهای میکروسکوپی و جناب آقای مصطفی شیخ‌زاده سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Vogel M, Voigt C, Gross UM, Muller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. Biomaterials 2001; 22(4): 357-62.
2. Wilson J, Yli-Urpo A, Risto-Pekka H. Bioactive glasses: clinical applications. In: Hench LL, Wilson J, Editors. An Introduction to Bioceramics.Toh Tuck, Singapore: World Scientific; 1993.
3. Aguiar H, Solla E, Serra J, Gonzalez P, Leon B, Almeida N, et al. Orthophosphate nanostructures in SiO2 P2O5 CaO Na2O MgO bioactive glasses. Journal of Non-Crystalline Solids 2008; 354(34): 4075-80.
4. Schouten C, Meijer GJ, van den Beucken JJ, Leeuwenburgh SC, de Jonge LT, Wolke JG, et al. In vivo bone response and mechanical evaluation of electrosprayed CaP nanoparticle coatings using the iliac crest of goats as an implantation model. Acta Biomater 2010; 6(6): 2227-36.
5. Domszy JG, Roberts GA. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. Die Makromolekulare Chemie 2003; 186(8): 1671-7.
6. Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. Int J Biol Macromol 2007; 40(3): 175-81.
7. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules 2003; 4(6): 1457-65.
8. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. J Biomed Mater Res 2000; 51(4): 586-95.
9. Hu G, Xiao L, Fu H, Bi D, Ma H, Tong P. Study on injectable and degradable cement of calcium sulphate and calcium phosphate for bone repair. J Mater Sci Mater Med 2010; 21(2): 627-34.
10. Alves HL, Dos Santos LA, Bergmann CP. Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. J Mater Sci Mater Med 2008; 19(5): 2241-6.
11. Kretlow JD, Klouda L, Mikos AG. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(4-5): 263-73.
12. Li RH, Bouxsein ML, Blake CA, D'Augusta D, Kim H, Li XJ, et al. rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. J Orthop Res 2003; 21(6): 997-1004.
13. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials-properties and relevance in bone repair. J Tissue Eng Regen Med 2007; 1(1): 25-32.
14. Asikainen AJ, Hagstrom J, Sorsa T, Noponen J, Kellomaki M, Juuti H, et al. Soft tissue reactions to bioactive glass 13-93 combined with chitosan. J Biomed Mater Res A 2007; 83(2): 530-7.
15. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Int Dent J 1980; 30(2): 140-88.
16. American National Standards Institute/American Dental Association Document no. 41 for Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. Council on Dental Materials and Devices. J Am Dent Assoc 1979; 99(4): 697-8.
17. Nabian N, Jahanshahi M, Rabiee SM. Synthesis of nano-bioactive glass-ceramic powders and its in vitro bioactivity study in bovine serum albumin protein. Journal of Molecular Structure 2011; 998(1-3): 37-41.
18. Vosough Hosseini S, Lotfi M, Mesgari M. Comparative Study of Histopathologic Reaction to Two Commercial Brands of Gray Mineral Trioxide Aggregate in Connective Tissue of Rat. Med J Tabriz Univ Med Sci 2008; 30(1): 133-7. (Persian).
19. Craig RG, Powers JM. Restorative Dental Materials. 11th ed. Philadelphia, PA: Mosby Inc; 2002.
20. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. J Endod 1998; 24(8): 543-7.
21. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Dezan JE. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. J Endod 1999; 25(3): 161-6.
22. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Tang HM. OR 56 Tibia and mandible reactions to implanted root end filling materials. J Endod 1997; 23(4): 263.
23. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide

aggregate for root-end filling in dogs. J Endod 1995; 21(12): 603-8.
24. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Dezan JE. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. J Endod 1999; 25(11): 728-30.
25. Ingle JI, Bakland LK. Endodontics. Shelton, CT: PMPH-USA; 2002.
26. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. II. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1967; 24(5): 674-83.
27. Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. J Endod 1981; 7(8): 355-67.
28. Friend LA, Browne RM. Tissue reactions to some root filling materials. Br Dent J 1968; 125(7): 291-8.
29. Yesilsoy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988; 65(4): 459-67.
30. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod 2004; 30(2): 95-9.
31. Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. Endod Dent Traumatol 1990; 6(2): 66-72.
32. Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. J Endod 1981; 7(8): 355-67.
33. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1966; 21(3): 379-87.
34. Moazami F, Shahsiah S. The Cellular Behavior and SEM Evaluation of ProRoot and Root MTAs on Fibroblast L929. Iran Endod J 2006; 1(3): 87-92.
35. Razmi H, Zarrabian M, Sharifian MR, Sharifi D, Sasani F, Ramezankhani N. A Histologic Evaluation on Tissue Reaction to Three Implanted Materials (MTA, Root MTA and Portland Cement Type I) in the Mandible of Cats. J Dent Tehran Univ Med Sci 2004; 1(3): 62-9. (Persian).
36. Cox CF, Subay RK, Suzuki S, Suzuki SH, Ostro E. Biocompatibility of various dental materials: pulp healing with a surface seal. Int J Periodontics Restorative Dent 1996; 16(3): 240-51.
37. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. J Endod 2006; 32(8): 776-80.
38. DeGrood ME, Oguntebi BR, Cunningham CJ, Pink R. A comparison of tissue reactions to Ketac-Fil and amalgam. J Endod 1995; 21(2): 65-9.
39. Brooking J, Davis SS, Illum L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. J Drug Target 2001; 9(4): 267-79.