

بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد میکروبی و چسبندگی در دو فرم لایه نازک و شکل کپه‌ای آلیاژ نایتینول

محمد کریم رحیمی^۱، مهدی معروف^۲، احسان صائب نوری^۳، پریسا فرشید^۴، سعید ذاکر بستان آباد^۱، پروانه عدیمی^۵، زهرا طیبی^۶، مژگان معصومی^۶، سمیرا صائمان^۲

^۱ استادیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

^۲ پزشک عمومی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

^۳ کارشناس ارشد مهندسی متالوژی، دانشکده متالوژی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ کارشناس ارشد مدارک پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

^۵ مربی، گروه قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

^۶ کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: آلیاژ نایتینول (Nitinol) کاربرد وسیعی در ساخت پروتزها در پزشکی دارد. از طریق دست‌کاری کردن آلیاژ، چسبندگی سلول‌ها و میکروارگانیسم‌ها به سطح آن کاهش می‌یابد، همچنین، از اثرات سمیت آلیاژ بر روی سلول‌های زنده کاسته می‌شود. هدف این مطالعه، مقایسه اثرات ضد میکروبی و چسبندگی شکل کپه‌ای این آلیاژ با شکل جدید لایه نازک می‌باشد.

روش بررسی: در این پژوهش تحلیلی-مقایسه‌ای، قطعاتی از شکل‌های کپه‌ای و لایه نازک نایتینول در مجاورت با ۵ میکروارگانیسم متفاوت قرار گرفتند. میکروارگانیسم‌ها قبل و بعد از مجاورت با فلز و در حضور شاهد شمارش شدند. خاصیت چسبندگی آلیاژها از طریق عکس‌برداری و مشاهده در زیر میکروسکوپ الکترونی بررسی و مقایسه گردید.

یافته‌ها: در مجاورسازی با فرم لایه نازک، کاهش تعداد به میزان ۱۴ درصد برای اشریشیاکولی، ۴۴ درصد برای پseudomonas آئروژینوزا، ۳۰/۱ درصد برای استافیلوکوک اورئوس، ۲۲ درصد برای باسیلوس سرئوس و ۶/۴ درصد برای کاندیدا مشاهده گردید. اما در مجاورسازی باکتری‌ها با فرم کپه‌ای، کاهش تعداد به میزان بیشتری اتفاق افتاد که به ترتیب کاهش تعداد به میزان ۳۹ درصد، ۶۲ درصد، ۶۱/۹ درصد، ۴۹ درصد و ۳۱ درصد حاصل شد. در تمام موارد، اختلاف معنی‌داری از نظر کاهش تعداد در مجاورت با فرم لایه نازک و فرم کپه‌ای وجود داشت ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: احتمالاً در فرم لایه نازک، آزاد شدن ذرات فلز کم‌تر است و اثرات تخریبی کم‌تری برای میکروارگانیسم‌ها و سلول‌های زنده دارد و به نظر می‌رسد که سازگاری زیستی میکروارگانیسم‌ها در فرم لایه نازک نسبت به فرم کپه‌ای بیش‌تر باشد.

واژگان کلیدی: نایتینول، اثرات ضد میکروبی، چسبندگی، لایه نازک، شکل کپه‌ای.

مقدمه

آلیاژ نیکل - تیتانیوم (Nickel-Titanium alloy) یا نایتینول با نسبت مولار ۱ به ۱ از هر یک از فلزات فوق، ویژگی‌های مکانیکی خاصی دارد که به نام اثر حافظه شکلی (Shape memory effect) و انعطاف‌پذیری بالا (Super elasticity)

شناخته می‌شود. این اثر حافظه‌داری به این ترتیب است که اگر در دماهای پایین، تغییر شکل به آن داده شود بعد از افزایش حرارت، دوباره به شکل قبلی خود برمی‌گردد. در مطالعه دینکا و همکارانش نشان داده شد که سلول‌های کشت بافت در مجاورت با نایتینول، زیست سازگاری خوبی دارند و در مقایسه با کنترل اثرات سیتوتوکسیک دیده نمی‌شود. علاوه بر این، در مطالعه فوق نشان داده شد که باکتری‌ها (اشریشیا کولی) و مخمرها (ساکارومیس سروسیه) تمایل چسبندگی به

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی، دکتر محمدکریم رحیمی

(email: mohammadkrahimi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۸/۲۱

سطح نایتینول و تشکیل بیوفیلم را ندارند. آنها نتیجه گرفتند که نایتینول آلیاژ مناسبی برای پروتزها و وسایل پزشکی است. در هر دو مورد، تغییر شکل از یک مرحله در هم پیچیدگی مولکولی در دمای پایین یا فاز مونوکلینیک (monoclinic) به مرحله بازشدگی فضایی (Austenitic) در دمای بالا یا فاز مکعبی (Cubic)، مسئول رفتار مکانیکی ویژه این آلیاژ می باشد (۱). با توجه به این ویژگی های خارق العاده، چندین کاربرد پزشکی برای این آلیاژ پیشنهاد شده است. استفاده از این آلیاژ در سیم های ارتودنسی، کاشت های ارتوپدی (Orthopedic implants) برای ساخت استخوان، استنت های داخل عروقی و مواد جایگزین شونده استخوان از کاربردهای آن هستند (۲). اگر محتوای نیکل این آلیاژ افزایش یابد موجب افزایش توانایی ایجاد واکنش های آلرژیک در بدن خواهد شد. در مطالعه آنا کریستینا و همکارانش نشان داده شد که سیم های ساخته شده از نایتینول برای ارتودنسی دندان ها مناسب تر هستند (۳).

آلیاژ نایتینول در ساختن استنت های داخل عروقی و دریچه های مصنوعی قلب کاربرد دارد. در مطالعه استوک و همکارانش، یک استنت نایتینول توسط یک بافت موکوسی بدون سلول پوشانده شد و دریچه های قلب خوک توسط نخ بخیه متصل گردیدند. به این وسیله از آسیب بافتی در هنگام کارگذاری دریچه ها به درون قلب ممانعت شد (۴). خصوصیات شیمیایی سطحی این آلیاژ نیز به گونه ای است که در محل کاشت از ثبات سطحی برخوردار است و از آن، نیکل به بافت های مجاور منتشر نمی شود. روش های جدیدی ابداع شده اند که در آن ها لایه های از داروها به آهستگی از سطوح پروتزهای نایتینول که در بدن کاشته شده اند، آزاد می شوند (۵). یون های نیکل، اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول های اندوتلیوم دارند.

براساس تحقیقات الکتروشیمیایی، آلیاژ نایتینول برای کارهای دندان پزشکی مناسب است و در برابر اثر خوردگی میکروب های اکسید کننده ی آهن و منگنز و باکتری های تولید کننده اسید، که در بزاق وجود دارند، مقاومت می کند (۶). سازگاری بیولوژیک این آلیاژ نسبت به تیتانیوم خالص کم تر است اما در مقایسه با استیل بدون رنگ و نیکل خالص بیشتر است (۷). خوردگی آلیاژ در مجاورت عوامل الکتروشیمیایی و مکانیکی در چندین مورد از سیم های ارتودنسی توصیف گردیده و در برخی از موارد، آزاد شدن مقادیر قابل توجهی از نیکل مشاهده شده است (۸). نایتینول به علت داشتن سازگاری بیولوژیک بالا، کاربردهای زیادی دارد اما در هنگامی

که برای مدت های طولانی در بافت کاشته می شود (از قبیل استنت ها و گرافت های استخوانی) تردیدهایی وجود دارد. در طی مطالعات اخیر، که سازگاری بیولوژیک نایتینول با آلیاژی حاوی سه فلز نیکل، تیتانیوم، مس (NiTiCu) بر روی سلول های کشت بافتی اپیتلیال و فیبروبلاست مقایسه گردید، نشان داده شد که به علت حضور مس، سازگاری بیولوژیک، کاهش می یابد. این کاهش سازگاری به علت آزاد شدن یون های مس می باشد (۹). معمولاً سازگاری بیولوژیک نایتینول به علت مقاومت بالای آن در برابر خوردگی است (۱۰). مقاومت نایتینول در برابر خوردگی ممکن است به فاکتورهای دیگری از قبیل میزان صیقلی بودن سطح فلز (Quality Surface finish)، مقدار واحدها و درجه هوموژن بودن ریز ساختارها (Microstructure) بستگی داشته باشد. تمامی این فاکتورها از طریق تثبیت کردن عناصر خورده شونده و جلوگیری از آزاد شدن یون های فلزی از بروز سمیت بر روی سلول ها (سیتوتوکسیسیتی) ممانعت می کنند (۱۱). نایتینول به لحاظ داشتن خاصیت الاستیسیته مضاعف، کاربرد زیادی در ساخت استنت ها برای باز نگاه داشتن عروق دارد، اما در درمان آترواسکلروز به دلیل این که یون های نیکل، اثرات سیتوتوکسیسیته و سرطان زایی (کارسینوژنی) دارند، کاربرد چندانی را دارا نمی باشد. اثرات سمی نیکل ناشی از استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) است که بر روی سلول ها وارد می شود. استنت های نایتینول که به یک جریان الکتریکی متصل باشند، می توانند برای تخریب باکتری ها در پروستاتیت های عفونی استفاده شوند (۱۲). اما در هر حال، اکنون نایتینول، گسترش زیادی در دنیای مهندسی پزشکی پیدا کرده است. در مقایسه با آلیاژهای دیگر، سازگاری بیولوژیک خوبی دارد که به علت شکل گیری یک لایه غیرفعال تیتانیوم - اکسید (TiO_2) می باشد. این لایه اکسید شده موجب پایداری لایه های سطحی در برابر خوردگی شده و یک مانع فیزیکی و شیمیایی را در برابر اکسیداسیون نیکل ایجاد می کند. بنابراین، مسیرهای اکسیداسیون نیکل اصلاح می شود (۱۳). میکروارگانیسم ها تمایل چسبندگی کمتری برای اتصال به سطح نایتینول دارند. چسبیدن میکروارگانیسم ها اهمیت زیادی در تشکیل بیوفیلم و شروع عفونت دارد. محتوای شیمیایی، ناهمگونی، کریستالی بودن و خشونت سطحی اهمیت زیادی در پاسخ های بیولوژیک، سمیت برای سلول ها، مقاومت در برابر خوردگی و چسبندگی این آلیاژ دارد (۱۴).

هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه ای اثرات سمی دو شکل متفاوت نایتینول (شکل کپه ای و شکل لایه نازک) بر روی

اسپوردار و کاندیدا/آلبیکانس ATCC:1203 از گروه قارچ‌ها. ویال‌های هر یک از سوش‌های لیوفیلیزه استاندارد باکتری‌ها در محیط لاکتوز برات (Lactose broth, Hi media code No: Mo26) با pH=7.0-7.5 و کاندیدا/آلبیکانس در محیط عصاره مخمر، پپتون، گلوکز (Yeast Pepton Glucose, code No: Mo14) با pH=5.5-6 وارد شدند. سپس برای فعال‌سازی این سوش‌های لیوفیلیزه، آنها در دمای ۳۷° درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند.

بعد از این که میکروارگانیسم‌های استاندارد از شکل لیوفیلیزه خارج شده و از زنده ماندن آنها اطمینان حاصل گردید، کشت‌های خالصی از هر یک در محیط‌های اختصاصی در دمای ۴° درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در هنگام انجام آزمایش، مقدار یک لوپ پر از کلونی‌ها برداشته شد و در لوله‌های آزمایش مجزا، با استفاده از سرم فیزیولوژی (محلول ۰/۹٪ از NaCl) رقت‌های متوالی ۰/۱، ۰/۰۱، و ۰/۰۰۱ تهیه شد. در ۵ سری آزمایش جداگانه، هر یک از رقت‌های میکروارگانیسم‌ها در سه سری مجزا (در مجاورت با فرم لایه نازک، در مجاورت با فرم کپه‌ای و بدون مجاورت با آلیاژهای فلزی) در دمای ۳۷° درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. هر یک از سوسپانسیون‌ها قبل و بعد از انکوباسیون به روش پورپلیت از نظر تعداد باکتری‌ها شمارش شده و با واحد CFU/mL بیان شدند (۶).

برای سهولت در شمارش کلونی‌های موجود در سطح محیط کشت جامد، با استفاده از نقاله و خط‌کش، سطح پلیت‌ها به ۱۶ قطعه مساوی تقسیم شد و به صورت تصادفی حداقل سه قطعه از نظر تعداد کلونی‌ها شمارش شد و میانگین تعداد در عدد ۱۶ ضرب شد تا تعداد کلونی‌های سطح پلیت به دست آید. در هر یک از پلیت‌ها مقدار ۵۰ μL از سوسپانسیون میکروبی افزوده شده بود، بنابراین، تعداد کلونی‌های سطح پلیت در عدد ۲۰ ضرب شد تا تعداد در هر میلی‌لیتر محاسبه شود. در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان کاهش میکروارگانیسم‌ها محاسبه گردید:

$$R = \frac{A - B}{A} \times 100$$

در این فرمول، A=تعداد کلونی‌های اولیه (شاهد)، B=تعداد کلونی‌های ثانویه (بعد از مجاورت با آلیاژ) و R=درصد کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها در مجاورت با آلیاژ فلزی است (۶).

چسبندگی میکروارگانیسم‌ها به سطح آلیاژ نایتینول اهمیت زیادی در تشکیل بیوفیلم و سپس بروز عفونت در بدن دارد. بیوفیلم، یک لایه چسبنده نازک است که در اثر چسبیدن

میکروارگانیسم‌ها و چسبندگی میکروارگانیسم‌ها به سطح این آلیاژها می‌باشد. برای این منظور، کشت‌های سلولی باکتری‌ها (اشریشیاکولی، استافیلوکوک اورئوس، پseudomonas آئروژینوزا) و مخمرها (کاندیدا/آلبیکانس) در آزمون‌های جداگانه با شکل‌های متفاوت نایتینول مجاور می‌شود. درصد کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها در مجاورت با هر یک از شکل‌های آلیاژ فوق در مقایسه با شاهد منفی بررسی می‌شود. علاوه بر این، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، خشونت سطحی و میزان چسبندگی میکروارگانیسم‌ها به هر یک از شکل‌های فلز بررسی شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تحلیلی-مقایسه‌ای، در حضور شاهد، دو شکل متفاوت آلیاژ نایتینول با پنج میکروارگانیسم متفاوت مجاور شدند و اثر ضد میکروبی و زیست سازگاری فلز بررسی گردید. علاوه بر این، میزان چسبندگی میکروارگانیسم‌ها به سطح فلز و تشکیل بیوفیلم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل LEO 4401 ارزیابی شد. در این تحقیق، آلیاژ نایتینول (NiTi) در دو فرم لایه نازک (Thin film) و کپه‌ای (Bulk) مورد استفاده قرار گرفت. نمونه لایه نازک به صورت پوششی با ضخامت ۱ μm بر روی یک ویفر سیلیکونی به ابعاد ۵×۱۰ mm و به ضخامت ۱ mm نشانداده شد. ترکیب این لایه‌ها از آلیاژ نیکل (Ni) و تیتانیوم (Ti) به نسبت اتمی ۵۰:۵۰ انتخاب شد. نمونه‌ها توسط دستگاه اسپاترینگ (Sputtering) در شرایط خلاء بالا (۱۰^{-۶} میلی بار) به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. به این ترتیب، لایه نازک نایتینول با ویفر سیلیکونی، جفت (Annealing) شد و در قطعاتی به ابعاد ۵×۱۰ mm بریده شد. نمونه کپه‌ای مستقیماً از آلیاژ نایتینول با نسبت اتمی ۵۰:۵۰ از فلزات نیکل و تیتانیوم انتخاب گردید. برای این منظور، لایه‌ای با ضخامت ۱ mm و ابعاد ۵×۱۰ mm از آلیاژ نایتینول بریده شد.

برای انجام آزمایش اثر ضد میکروبی و زیست سازگاری، پنج میکروارگانیسم با هر یک از نمونه‌های لایه نازک و کپه‌ای آلیاژ نایتینول در شرایطی شبیه به شرایط بدن مجاور گردیدند. پنج میکروارگانیسم از گروه‌های متفاوت عبارت بودند از: اشریشیاکولی ATCC:11303 و پseudomonas آئروژینوزا PTCC:1557 از گروه باکتری‌های گرم-منفی، استافیلوکوک اورئوس ATCC:6538 از گروه باکتری‌های گرم-مثبت، باسیلوس سرئوس ATCC:12711 از گروه باکتری‌های

جدول ۱- درصد کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها بعد از مجاورت با آلیاژهای فلزی

آزمون	میکروارگانیسم	مجاورت با آلیاژ	میانگین تعداد اولیه (CFU/ml)	میانگین تعداد ثانویه (CFU/ml)	درصد کاهش
		فرم کپه‌ای			
		لایه نازک			
۱	پسودوموناس آئروژینوزا	×	$2/0.8 \times 10^7$	$0/79 \times 10^7$	٪۴۴
۲	پسودوموناس آئروژینوزا	×	$2/0.8 \times 10^7$	$1/22 \times 10^7$	٪۶۲
۳	استافیلوکوک اورئوس	×	$2/4 \times 10^2$	$0/92 \times 10^2$	٪۶۱/۹
۴	استافیلوکوک اورئوس	×	$2/4 \times 10^2$	$1/7 \times 10^2$	٪۳۰/۹
۵	باسیلوس سرئوس	×	$2/6 \times 10^6$	$1/35 \times 10^6$	٪۴۹
۶	باسیلوس سرئوس	×	$2/6 \times 10^6$	$2/0 \times 10^6$	٪۲۲
۷	کاندیدا آلبیکانس	×	$8/12 \times 10^2$	$7/6 \times 10^2$	٪۳۱
۸	کاندیدا آلبیکانس	×	$8/12 \times 10^2$	$5/5 \times 10^2$	٪۶/۴

میکروارگانیسم‌ها به سطح مواد خنثی از قبیل سنگ، فلز یا چوب ایجاد می‌شود (۸). برای بررسی میزان چسبندگی میکروارگانیسم‌ها، در درون لوله‌های آزمایش، هر یک از شکل‌های لایه‌ی نازک و کپه‌ای آلیاژ نایتینول برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت با باسیلوس سرئوس، انکوباسیون شدند. سپس هر یک از این قطعات آلیاژ به روش رنگ‌آمیزی منفی (با استفاده از املاح فلزی) آماده‌سازی شده و در زیر میکروسکوپ الکترونی مقطع‌نگار (LEO 4401) بررسی شده و عکس‌برداری شدند (شکل ۱).

بعد از جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از آنالیز آماری SPSS نسخه ۱۵ و با به کارگیری تست T و تست لونز Leven's Test ارتباط آماری آنها بررسی گردید.

یافته‌ها

در آزمایشی که آلیاژهای فلزی با /شریشیاکولی مجاور شدند، اثرات ضد میکروبی آلیاژهای فلزی موجب کاهش تعداد باکتری‌ها بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت شد. پنج سوسپانسیون میکروبی با تعداد باکتری‌های شمارش شده اولیه CFU/mL $6/5 \times 10^4$ ، CFU/mL $6/60 \times 10^4$ ، CFU/mL $8/09 \times 10^4$ ، CFU/mL $6/07 \times 10^4$ و CFU/mL $8/88 \times 10^4$ با میانگین CFU/mL $7/23 \times 10^4$ انتخاب شدند و در سه سری مجزا، آزمایش شدند. در مجاورت با فرم لایه نازک، تعداد باکتری‌ها به میانگین CFU/mL $6/25 \times 10^4$ (با درصد کاهش ۱۴ درصد) و در فرم کپه‌ای، تعداد باکتری‌ها به میانگین CFU/mL $8/09 \times 10^4$ (با درصد کاهش ۳۹ درصد) کاهش یافتند.

در آزمایش مجاورت آلیاژهای فلزی با پسودوموناس آئروژینوزا، پنج سوسپانسیون میکروبی با تعداد شمارش شده اولیه CFU/mL $1/06 \times 10^7$ ، CFU/mL $1/76 \times 10^7$ ، CFU/mL $2/56 \times 10^7$ و CFU/mL $2/24 \times 10^7$ با میانگین CFU/mL $2/08 \times 10^7$ انتخاب شدند. در مجاورت با فرم لایه‌ی نازک، تعداد باکتری‌ها به میانگین تعداد CFU/mL $1/22 \times 10^7$ (با درصد کاهش ۴۴ درصد) و در مجاورت با فرم کپه‌ای، تعداد باکتری‌ها به میانگین تعداد CFU/mL $0/79 \times 10^7$ (با درصد کاهش ۶۲ درصد) کاهش یافت.

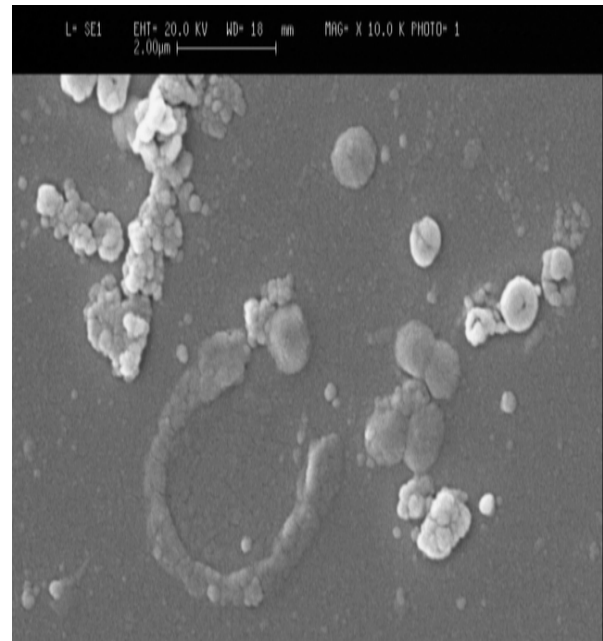
در آزمایش مجاورت آلیاژهای فلزی با /استافیلوکوک اورئوس پنج سوسپانسیون میکروبی با تعداد شمارش شده اولیه CFU/mL $4/01 \times 10^2$ ، CFU/mL $3/71 \times 10^2$ ، CFU/mL $1/51 \times 10^2$ و CFU/mL $1/49 \times 10^2$ با میانگین CFU/mL $2/46 \times 10^2$ انتخاب شدند. در مجاورت با فرم لایه نازک، تعداد باکتری‌ها به میانگین تعداد CFU/mL $1/70 \times 10^2$ (با درصد کاهش ۳۰/۹ درصد) و در مجاورت با فرم کپه‌ای تعداد باکتری‌ها به میانگین تعداد CFU/mL $0/92 \times 10^2$ (با درصد کاهش ۶۱/۹ درصد) کاهش یافت.

در آزمایش مجاورت آلیاژهای فلزی با باسیلوس سرئوس، پنج سوسپانسیون میکروبی با تعداد شمارش شده اولیه CFU/mL $2/27 \times 10^6$ ، CFU/mL $2/60 \times 10^6$ ، CFU/mL $2/40 \times 10^6$ ، CFU/mL $2/70 \times 10^6$ و CFU/mL $2/23 \times 10^6$ با میانگین تعداد CFU/mL $2/60 \times 10^6$ انتخاب شدند. در مجاورت با فرم لایه نازک، تعداد باکتری‌ها به میانگین تعداد CFU/mL $2/03 \times 10^6$ (با درصد کاهش ۲۲ درصد) و در مجاورت با فرم کپه‌ای به میانگین تعداد CFU/mL $1/35 \times 10^6$ (با درصد کاهش ۴۹ درصد) کاهش یافت (شکل ۱).

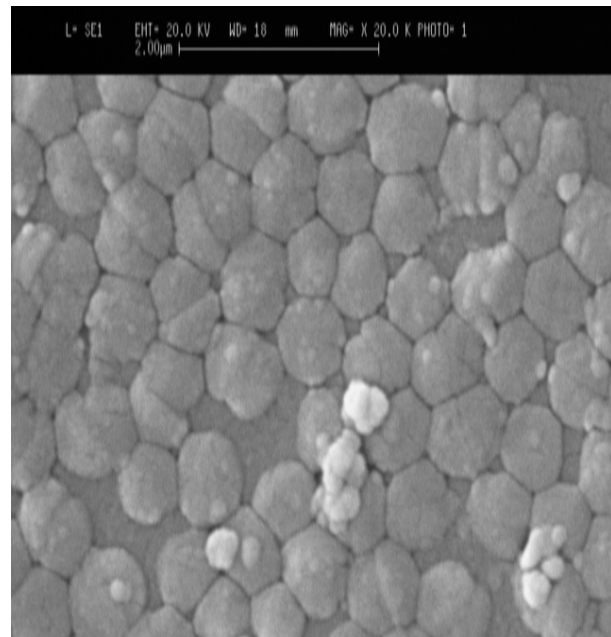
۷/۶۰ (درصد کاهش ۶/۴ درصد) و در مجاورت با فرم کپه‌ای، تعداد مخمرها به میانگین تعداد 5×10^2 CFU/mL (با درصد کاهش ۳۱ درصد) کاهش یافت (جدول ۱).

بحث

مجاور کردن میکروارگانیسم‌ها با آلیاژهای فلزی در مقایسه با کنترل نشان داد که در تمامی موارد، آلیاژهای فلزی موجب کاهش تعداد ارگانیسم‌ها شده بودند. در مورد فرم لایه نازک، این کاهش به میزان ۱۴ درصد برای اشیریشیاکولی، ۴۴ درصد برای پseudomonas آئروژینوزا، ۳۰/۱ درصد برای استافیلوکوک اورئوس، ۲۲ درصد برای باسیلوس سرئوس و ۶/۴ درصد برای کاندیدا آلبیکانس با میانگین کلی ۳۴/۸ درصد برای تمامی ارگانیسم‌ها مشاهده گردید. اما در مورد فرم کپه‌ای، کاهش تعداد ارگانیسم‌ها به میزان ۳۹ درصد برای اشیریشیاکولی، به میزان ۶۲ درصد برای پseudomonas آئروژینوزا، به میزان ۶۱/۹ درصد برای استافیلوکوک اورئوس، به میزان ۴۹ درصد برای باسیلوس سرئوس، به میزان ۳۱ درصد برای کاندیدا آلبیکانس و با میانگین کلی ۴۸/۶ درصد برای تمامی ارگانیسم‌ها مشاهده گردید. در مجموع، نتایج فوق نشان داد که در فرم لایه نازک نسبت به فرم کپه‌ای، میانگین کلی کاهش تعداد ارگانیسم‌ها، کم‌تر بود (کاهش ۳۴/۸ درصد در فرم لایه نازک نسبت به کاهش ۴۸/۶ درصد در فرم کپه‌ای؛ $P < 0.05$). این اختلاف معنی‌دار که در بین دو آلیاژ فوق دیده می‌شود، حکایت از آن دارد که احتمالاً در فرم لایه نازک، آزاد شدن ذرات فلز، کم‌تر است و اثرات تخریب سلولی کم‌تری را نشان می‌دهد. این آلیاژها در بدن میزبان انسانی می‌توانند از طریق آزاد نمودن ذرات فلز علاوه بر اثرات تخریبی بر روی میکروارگانیسم‌ها، بر روی سلول‌های میزبان نیز اثرات آسیب سلولی و تخریب بافتی را به همراه داشته باشند. لذا در مقایسه به نظر می‌رسد که قدرت زیست سازگاری فرم لایه نازک آلیاژ نایتینول بیش‌تر باشد. این فرم در مجاورت ارگانیسم‌های زنده از قبیل باکتری‌ها و قارچ‌ها به علت داشتن خاصیت زیست سازگاری بیش‌تر توانست شرایط زیستی مناسب‌تری را برای آن‌ها فراهم سازد. بنابراین در هنگام مجاورسازی فرم لایه نازک، کاهش تعداد ارگانیسم‌ها نسبت به فرم کپه‌ای به میزان قابل توجهی (با اختلاف معنی‌داری $P < 0.05$) کم‌تر بود. در مطالعه مداوار در سال ۲۰۰۲، لایه‌ای از آلیاژ نایتینول برای ارتودنسی دندان‌ها مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این‌که آلیاژ فوق توانست دندان‌ها را به شکل بیولوژیک طبیعی



(الف)



(ب)

شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی مقطع‌نگار از آلیاژ فلزی مجاور شده با باسیلوس سرئوس. (الف): شکل لایه نازک، (ب): شکل کپه‌ای. به چسبیدن تعداد بیشتری از باکتری‌ها به شکل کپه‌ای توجه کنید.

در آزمایش مجاورت آلیاژهای فلزی با کاندیدا آلبیکانس، پنج سویستاسیون میکروبی با تعداد شمارش شده اولیه 1×10^3 CFU/mL، 6×10^2 CFU/mL، $7/85 \times 10^2$ CFU/mL، $9/95 \times 10^2$ CFU/mL و $6/80 \times 10^2$ CFU/mL با میانگین تعداد $8/12 \times 10^2$ CFU/mL انتخاب شدند. در مجاورت با فرم لایه نازک، تعداد مخمرها به میانگین تعداد 5×10^2 CFU/mL

برگرداند، زیست سازگاری بالایی را با سلول‌های بدن نشان داد و موجب گردید دندان‌ها به شکل طبیعی برگردند و نیاز به درمان‌های دارویی کاهش یابد (۵). این پژوهش در مقایسه با مطالعه ما زیست سازگاری آلیاژ نایتینول را تأیید کرد، اما در آن از فرم کپه‌ای استفاده شده بود. استنت‌های درون نای که از جنس نایتینول هستند، درمان نگهدارنده مناسبی برای کولپس نای می‌باشند و برای ماه‌ها تا سال‌ها موجب بهبود در عملکرد تنفسی می‌شوند (۱۵). در مطالعه ویرث در سال ۲۰۰۵، اثرات خشونت سطحی نایتینول بر روی پاسخ سلول‌های فیبروبلاست و اوستئوبلاست در شرایط آزمایشگاه مطالعه شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسانس و مشاهده آن در زیر میکروسکوپ و همچنین با استفاده از روش آلکالین فسفاتاز، کم بودن خشونت سطحی بر روی کاهش چسبندگی و افزایش زیست سازگاری نشان داده شد. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه ما هماهنگی دارد. چون در مطالعه ما نیز فرم لایه نازک که خشونت سطحی کم‌تری دارد، زیست سازگاری بهتری را نشان داد و میکروآرگانیسم‌های کم‌تری به آن چسبیدند (۱۶). در مطالعه مورگان در سال ۲۰۰۳، کاربردهای آلیاژ نایتینول در پزشکی نشان داده شد. در این پژوهش، اثرات سیتوتوکسیسیته نایتینول نسبت به بقیه آلیاژهای فلزی مقایسه شد و پاسخ‌های آلرژیک یا ژنوتوکسیک نایتینول نشان داده شد. در این مطالعه نتیجه‌گیری شد که فن‌آوری و ساختار سطحی فلز بر روی اثرات سیتوتوکسیسیته تأثیر به‌سزایی دارد (۱۷). در مطالعه کلارک دالتون و

همکارانش، کاهش باکتری‌های داخل کانال در مورد نیکل-تیتانیوم با کاهش باکتری‌ها در استیل بدون لعاب مقایسه شد. در ۴۸ بیمار، شمارش باکتری‌ها در قبل، در هنگام و بعد از جای‌گذاری پیچ‌ها انجام گرفت. هیچ‌گونه عفونت یا افزایش باکتری‌ها بعد از جای‌گذاری نیکل-تیتانیوم مشاهده نشد (۱۸). در مطالعه فراگو و همکارانش اثر فلوراید بر روی آلیاژهای تیتانیوم بررسی شد. میزان آزاد شدن نیکل احیا شده مورد محاسبه قرار گرفت. سیم‌های ارتودنسی نیکل-تیتانیوم که در دهان بیماران قرار داده شدند، توسط به‌کارگیری محلول‌های فلوراید، محافظت شدند. کاهش معنی‌داری در بروز عفونت و عوارض جانبی در مقایسه با موارد شاهد که توسط فلوراید محافظت نشده بودند مشاهده گردید (۱۹). در مطالعات گذشته ما نیز نشان داده شد که صیقلی بودن هر چه بیشتر سطح فلز که در آلیاژ لایه نازک دیده می‌شود موجب اثرات سیتوتوکسیک کم‌تری بر روی ارگانیسم‌ها شده و همچنین چسبیدن میکروآرگانیسم‌ها به سطح فلز و تشکیل بیوفیلم کاهش می‌یابد. بدیهی است که هرچه امکان تشکیل بیوفیلم کمتر باشد، احتمال کلونیزاسیون بر روی پروتورها و شروع عفونت کمتر است. فرم لایه نازک، قدرت ضد میکروبی پایینی را داشت اما به دلیل نداشتن واکنش‌های آلرژیک، توکسیک و همچنین جلوگیری از تشکیل بیوفیلم استفاده از آن توصیه می‌شود. لذا بر اساس پژوهش حاضر، پیشنهاد می‌شود که برای ساختن استنت‌ها و پروتورهای پزشکی از فرم لایه نازک به جای فرم کپه‌ای استفاده شود.

REFERENCES

1. Dinca VC, Soare S, Barbalat A, Dinu CZ, Moldovan A, Stoica I, et al. Nickel-titanium alloy: cytotoxicity evaluation on microorganism culture. *Appl Surf Sci* 2006; 252: 4619-24.
2. Yahina L, ed. Shape memory implants. Berlin: Springer; 2000.
3. Santos AC, Tortamano A, Naccarato SR, Dominguez-Rodriguez GC, Vigorito JW. An in vitro comparison of the force decay generated by different commercially available elastomeric chains and NiTi closed coil springs. *Braz Oral Res* 2007; 21: 51-57.
4. Stock UA, Degenkolbe I, Attmann T, Schenke-Layland K, Freitag S, Lutter G. Prevention of device-related tissue damage during percutaneous deployment of tissue-engineered heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131: 1323-30.
5. Mani G, Johnson DM, Marton D, Feldman MD, Patel D, Ayon AA, et al. Drug delivery from gold and titanium surfaces using self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2008; 29: 4561-73.
6. Brantley WA, Iijima M, Grentzer TH. Temperature-modulated DSC study of phase transformations in nickel-titanium orthodontic wires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 124: 387-94.
7. Kim K, Oh K, eds. Corrosion properties on dental restorative alloys. In proceedings of international conference on electrochemistry. SAEST: Chennai; 2002.
8. Sipert CR, HussneRP, NishiyamaCK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of fill canal, seal apex, mineral trioxide aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endodont J* 2005; 38: 539-43.
9. Es-Souni M, Es-Souni M, Brandies HF. On the transformation behaviour, mechanical properties and biocompatibility of two niti-based shape memory alloys: NiTi42 and NiTi42Cu7. *Biomaterials* 2001; 22: 2153-61.

10. Maruthamuthu S, Rajasekar A, Sathiyarayanan S, Muthukumar N, Palaniswamy N. Electrochemical behavior of microbes on orthodontic wires. *Current Science* 2005; 89: 988-96.
11. Es- Souni M, Fischer-Brandies H, Kock N, Bock O, Ratzke K. Chemische Zusammensetzung, Unwandlungs Verhalten und mechanische Biegeeigenschaften ausgewählter kieferorthopädischer NiTi-Drahtbogen. *Informationen aus Orthodontie und Kieferorthopädie* 2001; 33: 87-106.
12. Liatsikos EN, Dinlenc CZ, Kapoor R, Fogarty J, Bernardo NO, Isenberg HD, et al. In vitro bactericidal effect of a modified thermal Nitinol electrode. *J Endourol* 2001; 15: 303-306.
13. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001; 65: 1028-37.
14. Ijima M, Ohno H, Kawashima I, Endo K, Brantley WA, Mizoguchi I. Micro X-ray diffraction study of super elastic nickel-titanium orthodontic wires at different temperatures and stresses. *Biomaterials* 2002; 23: 1769-74.
15. Sura PA, Krahwinkel DJ. Self-expanding nitinol stents for the treatment of tracheal collapse in dogs: 12 cases (2001-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 228-36.
16. Wirth C, Comte V, Lagneau C, Exbrayat P, Lissac M, Jaffrezic-Renault N, et al. Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts. *Mater Sci Eng C* 2005; 25: 51-60.
17. Morgan NB. Medical shape memory alloy applications- the market and its products. *Mater Sci Eng A* 2004; 378: 16-23.
18. Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998; 24: 763-67.
19. Pataky L, Iványi I, Grigár A, Fazekas A. Antimicrobial efficacy of various root canal preparation techniques: an in vitro comparative study. *J Endod* 2002; 28: 603-605.