نانوسيلفير مقابل نانوتيتراسيكلين في علاج الإصابة المستحثة للفئران للغشاء المخاطي الشدقى بجينجيفاليس بورفيروموناس

بحث مقدم لكلية طب الأسنان- جامعة قناة السويس- توطئة للاتمام الجزئي للحصول على درجة الدكتوراة فى علوم طب الاسنان (بيولوجيا الفم)

مقدم من

ط/ منى محمد مجدى على دهب

بكالوريوس طب وجراحة الفم والأسنان - جامعة قناة السويس (٢٠٠٧)

ماجستير طب وجراحة الفم والأسنان - جامعة قناة السويس (٢٠١٦)

مدرس مساعد بيولوجيا الفم كلية طب الفم والأسنان - جامعة الفيوم

المشرفون

د/ ليلى صادق غالى

أستاذ بيولوجيا الفم

كلية طب الفم والأسنان

جامعة القاهرة

د/ رشا محمد طه

أستاذ مساعد بيولوجيا الفم

كلية طب الفم و الأسنان

جامعة قناة السويس

كلية طب الأسنان

جامعة قناة السويس

٢٠٢١

الملخص العربى

يهدف هذا البحث الي دراسة تأثير جسيمات نانوية فضية مقابل التتراسيكلين المصنع في حجم النانو المستخدم موضعياً في علاج الإصابة المستحثة في الغشاء المخاطي الشدقى للفئران بجينجيفاليسبورفيروموناس.

أستخدم في هذا البحث ستون فأرا ذكرا بالغا ١٥٠-١٨٠ غرام في الوزن. قد تم في هذا البحث إيواؤهم في أقفاص الجرذان والمسمى بالأرقام العددية في منزل للحيوان ،جيد التهوية، بكلية طب الأسنان، جامعة قناة السويس في درجة حرارة من ٢٧-٣٠ درجة مئوية، ومعرضة الي ١٢ ساعة ضوء طبيعي و ١٢ ساعة ظلام ، ومع حرية الوصول إلى ماء الصنبور وطعام الفئران الجاف.

حيث تم تقسم الفئران عشوائياً إلى ست مجموعات على النحو التالي:

- **المجموعة الاولى:** تكونت من ستة فئران، بمثابة المجموعة الضابطة السلبية العادية.
- **المجموعة الثانية:** تكونت من ستة فئران، أصيبت مرة واحدة بالحقن في الغشاء المخاطي الشدقى المقابل للضرس الاول للفك العلوي ب ١ $\times ١٠^{٨}$ وحدة تشكيل مستعمرة /مل من الجينجيفاليسبورفيروموناس ويتركوا لمدة اربعة عشر يوما.
- **المجموعة الثالثة:** تكونت من ستة فئران، تم تعريضهم لنفس الإجراءات كما في المجموعة الثانية، ثم تم حقنهم بنفس مكان العدوى يوميا بمسحوق التيتراسيكلين المخفف بتركيز ٥ميكروجرام/مل من الماء المقطر لمدة اربعة عشر يوما.
- **المجموعة الرابعة:** تكونت من ستة فئران، تم تعريضهم لنفس الإجراءات كما في المجموعة الثانية، ثم تم حقنهم بنفس مكان العدوى يوميا ب٢٠ نانومتر بنانوسيلفير بتركيز ١٥ميكروجرام/مل من الماء المقطر لمدة اربعة عشر يوما.
- **المجموعة الخامسة:** تكونت من ستة فئران، تم تعريضهم لنفس الإجراءات كما في المجموعة الثانية، ثم تم حقنهم بنفس مكان العدوى يوميا ب ١٤٠ ميكروجرام/مل ب تيتراسيكلين محمل علي كيتوزان ٥٠ نانوميتر والماء المقطر لمدة اربعة عشر يوما.
- **المجموعة السادسة:** تكونت من ستة فئران، تم تعريضهم لنفس الإجراءات كما في المجموعة الثانية، ثم تم حقنهم بنفس مكان العدوى يوميا ب ٥ ميكروغرام /مل من ٢٠ نانومتر نانوسيلفير التي

سيتم تحميلها بواسطة نانوتيتراسيكلين بتركيز ٣٠ ميكروغرام/مل من الماء المقطر لمدة اربعة عشر يوما.

في نهاية التجربة، تم التضحية بجميع الفئران عن طريق كسر العنق. و استئصال عينات من الغشاء المخاطي الشدقى من موقع الإصابة للفئران بجميع المجموعات المختلفة.و ثم تثبيتها في ١٠% فورمالين متعادل ووضعها في شمع البارافين وتجهيزها للصبغات التالية :-

١. هيماتوكسلينوايوسين لفحص الانسجة هستولوجيا.
٢. تحديد أماكن توزيع ال PCNA بطريقة الستريبتافيدين-البيوتين لتقييم قدرة تكاثر الخلايا في موقع الإصابة.
٣. تحديد أماكن توزيع الانترلوكين ١ بيتا (IL-1β) بواسطة الهستوكسيمياء المناعية.

تم أخذ عينات صغيرة جداً في حجم واحد ملليمتر مكعب من عينات الفئران من مختلف المجموعات ووضعها في ٣% جلوترالديهايدي ثم معالجتها ووضعها في راتنجالإيبوكسي وتصبغ باسيتاتاليورانيل ثم سترات الرصاص لفحصها بالمجهر الإلكتروني.

الغشاء المخاطي الشدق للفئران غير المعالجة كعنصر تحكم إيجابي مع P. gingivalis أظهر تغيرًا جذريًا في المظهر النسيجي مقارنةً بالضوابط غير المصابة ، مع زيادة سمك الظهارة التي تظهر ظهارة مع فجوة حشوية ومناطق اندماج هذه الفجوات لتشكيل فجوات أكبر. ظهر الكثير من الخلايا الصافية بمستويات مختلفة في الطبقات الظهارية.كما تم الكشف عن هجرة طبقة الخلايا القاعدية إلى الطبقة الحليمية من الصفيحة المخصوصة مع وقف الغشاء القاعدي. أظهر ايضا تدميرًا في ألياف النسيج الضام مع منطقة موضعية من تسلل الخلايا الالتهابية وتوسع الأوعية الدموية والنزيف. أظهرت الطبقة تحت المخاطية مناطق تفكك الكولاجين مع حزم عضلية غير محددة بينما أظهرت الغدد اللعابية الشدقية الصغرى فجوة هيولي ذات أحجام متغيرة

أظهرتالنتائجبالفحصالهيستولوجيللعيناتالمصبوغةبهيماتوكسلينوايوسينتحتالمجهرالضوئيتحسيناتنسيجيةفي يقشرةوبشرةالغشاء المخاطي الشدقفيكلالمجموعاتالمعالجةبالمقارنةبالمجموعةالثانية (مجموعةالتحكمالايجربي)التيأصيبت بالعدوى البكتيريا و بالاخصنتائج المجموعة السادسة بالمواد المصنع في حجم النانو و المحملة بالتيتراسيكلين درجة كبيرة من التشابه مع نهجالنمطالطبيعيالغشاء المخاطي الشدقيكمظهرتفيالمجموعة الاولية (مجموعةالتحكمالسلبي).

وهذا ما اكده فحص العينات تحت المجهر الإلكتروني حيث تم اكتشاف ارتشاح الخلايا الالتهابية في الأنسجة قيد الدراسة والتي تتكون من الضامة والخلايا الليمفاوية وخلايا البلازما وبعض العدلات. تم الكشف عن انحطاط وتشويه كامل وتفكك لحزم الكولاجين من خلال الصفيحة المخصوصة وفجوات السيتوبلازم التي تشير إلى التحلل السيتوبلازميلاجزاء الخلية التي تترك مساحات فارغة في عينات المجموعة الايجابية الثانية. تواجدت بعض هذه العلامات بدرجات متوافقة بين المجموعات المعالجة ولكن انحصرت كثيرا في العينات التي تم علاجها ب AgNPs المحمل بالتيتراسيكلين في المجموعة السادسة عن باقي المجموعات.

بالنسبة لتكاثر الخلايا ، أظهرت خلايا المجموعة الطبيعية الأولى أن التوطين المشترك لتلطيخ PCNA تم حسابه على أنه إيجابي المناعة بشدة ، بينما انخفض مؤشر وسم PCNA للمجموعة الثانية بشكل كبير في حيوانات المجموعة الثانية المصابة بـ P. gingivalis. يشير هذا إلى احتمال حدوث تأخير في معدل دوران الغشاء المخاطي للفم لدى الفئران.

كانت هناك زيادة ذات دلالة إحصائية في النشاط المناعي PCNA لجميع المجموعات المعالجة مقارنة مع المجموعة الضابطة الأولى ، كما كانت هناك زيادة ذات دلالة إحصائية في النشاط المناعي PCNA للمجموعتين الخامسة و السادسة التي عولجت بالتتراسيكلين المحملة على الكيتوسانوالتتراسيكلين المحملة على AgNPs على التوالي ، تليها المجموعة الرابعة التي عولجت بـ AgNPs مقارنة بالمجموعات الثالثة المعالجة بمسحوق التتراسيكلين.

تم تحضير جميع العينات في هذه الدراسة بجسم مضاد أحادي النسيلة للفأر من أجل الفحص الكيميائي المناعي IL-1β . أظهرت المقاطع السالبة العادية من المجموعة الأولى التي تم فحصها تحت المجهر الضوئي تفاعلاً سلبيًا مع IL-1β جميعًا من خلال الطبقات الظهارية المختلفة والصفيحة المخصوصة وكذلك الطبقة تحت المخاطية على العكس من ذلك ، أظهرت المقاطع الموجبة من المجموعة الثانية تفاعلاً إيجابيًا قويًا عند جميع طبقات الظهارة وأكثر شدة في الطبقات السطحية بجانب الطبقات القاعدية. وجد تفاعل إيجابي مبعثر في الصفيحة المخصوصة خاصة في الطبقات الشبكية.

أظهر فحص أقسام المجموعة الخامسة والسادسة المعالجة بالإعطاء المحلي للتتراسيكلين المحمل على الكيتوزان والمحمّل على AgNPs على التوالي ، رد فعل إيجابي ضعيف على IL-1β كبقع موضعية من تلطيخ من خلال الظهارة وأكثر تكرارا في الطبقات السطحية نادرا في الطبقات القاعدية إلى جانب بعض ينتشر البقع خاصة في الطبقات السطحية. تم العثور على تفاعل تلطيخ مماثل لـ IL-1β في الصفيحة

المخصوصة ، والتي تم إثباتها على أنها تفاعل تلطيخ إيجابي ضعيف في ألياف الأنسجة الضامة والخلايا والأوعية الدموية ، علاوة على ذلك كانت محدودة للغاية في المناطق الموضعية.

فحص باقي عينات المجموعة الثالثة المعالجة ب TC. أظهر رد فعل قوي إيجابي تجاه IL-1β كبقع من خلال الظهارة وأكثر تكرارا في الطبقات السطحية و في الطبقات القاعدية. تم العثور على تفاعل تلطيخ مماثل لـ IL-1β في الصفيحة المخصوصة ، والتي تم إثباتها على أنها تفاعل تلطيخ قوي إيجابي في ألياف النسيج الضام والخلايا والأوعية الدموية ،. بينما اوضح فحض عينلت المجموعة الرابعة بـ AgNPs وأظهر تفاعلاً إيجابيًا متوسطًا في بقع موضعية للغاية من خلال الظهارة ورد فعل متوسط ايضا عند الطبقات السطحية والقاعدية. تم الحصول على نتائج مماثلة داخل الصفيحة المخصوصة.

أظهرت جميع النتائج السابقة التي شوهدت في الأنسجة قيد الدراسة المتأثرة بـ AgNPs المحملة بالتتراسيكلين في المجموعة السادسة خطوات نحو الشفاء والتعافي وتحسين بنيتها عن طريق زيادة معدل تجديد الخلايا الظهارية وإعادة بناء ألياف الكولاجين مع وجود الخلايا الليفية وخلية أقل التهابية تتسرب وكذلك السيتوكينات الوسيطة مقارنة بالمجموعات المعالجة الأخرى.